

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Biomediche**

Ciclo XXIX

Settore Concorsuale di afferenza: 05/E1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/10

**IMPATTO DELL'ESERCIZIO FISICO SULLA SALUTE DELL'OSSO:
STUDIO SUI MECCANISMI BIOCHIMICI E CELLULARI**

Presentata da: Dott.ssa Luna Rizzo

Coordinatore Dottorato

PROF. LUCIO ILDEBRANDO COCCO

Relatore

PROF. CLAUDIO STEFANELLI

Esame finale anno 2017

**Al di là di me stesso,
in un luogo che ignoro,
aspetto il mio arrivo.**

Octave Paz

INDICE

ABBREVIAZIONI	3
1. INTRODUZIONE	4
1.1. ESERCIZIO FISICO E OSSO	4
1.1.1 Metabolismo minerale e osseo: meccanismi cellulari e biomolecolari dell'osso.....	9
1.1.2 Differenziamento e regolazione delle cellule ossee.....	11
1.1.3 Effetti dell'esercizio fisico sul metabolismo dell'osso.....	16
1.1.3.1 Processi di adattamento dello scheletro.....	17
1.1.3.2 Densità minerale ossea: considerazioni sullo sviluppo.....	19
1.1.3.3 Stato ormonale e acquisizione minerale ossea	24
1.1.4 Sviluppo dell'osso: carico meccanico e attività fisica durante la fase di crescita....	25
1.1.5 Impatto della ginnastica ritmica sulla crescita dell'osso.....	28
1.1.6 La sclerostina come modulatore del metabolismo osseo	31
1.2. AUTOFAGIA.....	32
1.2.1 Autofagia ed esercizio fisico.....	33
2. PARTE SPERIMENTALE	
2.1. PREMESSE.....	37
2.2. METODI.....	37
2.2.1 Colture cellulari.....	37
2.2.2 Differenziamento.....	38
2.2.3 Livelli di sclerostina.....	39
2.2.4 Trattamenti.....	39
2.2.5 Analisi di proteine tramite sds page e western blotting.....	40
2.2.6 Analisi delle poliamine.....	41
2.2.7 RNA Interference.....	41
2.2.8 Apoptosi e morte cellulare.....	41
2.2.9 Autofagia.....	43
2.3. RISULTATI.....	43
3. DISCUSSIONE.....	61
BIBLIOGRAFIA.....	66

ABBREVIAZIONI

BMC	bone mineral content
BMD	bone mineral density
BMP	bone morphogenetic protein
BMS	bone mineral status
Ca	calcium
FFM	fat free mass
FM	fat mass
FN	femoral neck
GH	growth hormone
IGF-1	insuline-like growth factor
IL-6	interleuchina 6
LS	lumbar spine
M-CSF	monocyte colony stimulation factor
MSC	mesenchymal stem cells
OPG	osteoprotegerin
PA	physical activity
PBM	peak bone mass
PHV	peak height velocity
PTH	parathyroid hormone
RANK	receptor activator of nuclear factor-kB
RANKL	receptor activator of nuclear factor-kB ligand
RG	rhythmic gymnastics
TNF- α	tumor necrosis factor

1. INTRODUZIONE

1.1. ESERCIZIO FISICO E OSSO

In accordo con l'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization), per attività fisica (PA) si intende “qualunque sforzo esercitato dal sistema muscolo- scheletrico che si traduce in un consumo di energia superiore a quello che si verifica in condizioni di riposo”. In questa definizione rientrano quindi non solo le attività sportive ma anche semplici movimenti quotidiani come camminare, andare in bicicletta, ballare, giocare, fare giardinaggio e lavori domestici. La pratica regolare di PA svolta ad intensità moderata – come ad esempio camminare, o andare in bicicletta – fornisce significativi benefici per la salute. Per esempio, l'attività motoria può ridurre il rischio di malattie cardiovascolari, diabete, obesità, e altre malattie croniche. Inoltre, la pratica di adeguati livelli di attività sportiva potrebbe ridurre il rischio di frattura ossea e migliorare la salute funzionale e il controllo del peso corporeo. Lo svolgimento di PA da parte dei bambini e adolescenti, è necessario per lo sviluppo e per una sana crescita, e fornisce una vasta gamma di benefici per persone di ogni età. Tra questi benefici ci sono gli effetti che l'esercizio fisico può esercitare sull'apparato scheletrico. La pratica di PA può indurre miglioramenti nella struttura ossea. In questo scenario, molti sono i fattori che possono influenzare la risposta da parte dell'apparato scheletrico sottoposto a esercizio fisico, come ad esempio: tipo di PA praticata, intensità e durata della stessa, tipo di nutrizione, fattori individuali del soggetto. Tra i fattori individuali possono essere evidenziati: stato di allenamento iniziale, fattori di rilascio ormonale, ed età in cui il soggetto inizia a praticare la disciplina sportiva. Queste condizioni sono importanti in quanto potrebbero contribuire alla risposta da parte del sistema scheletrico quando viene sollecitato (dal carico meccanico sotto forma di esercizio fisico).

In accordo con la Fondazione Nazionale per l'Osteoporosi (National Osteoporosis Foundation), differenti tipologie di sport possono esercitare un differente impatto sull'apparato scheletrico. È sottoscritto dalle linee guida del FNO che alcuni esercizi sono maggiormente consigliati rispetto ad altri, in base alla condizione ossea iniziale del paziente e ad eventuali problematiche legate all'apparato scheletrico dello stesso. Appartengono ad una determinata categoria gli esercizi definiti con il termine “weight-bearing exercise”. Tali esercizi prevedono che muscoli e ossa lavorino esclusivamente contro la forza di gravità mentre sostengono il peso del corpo, esercitando così un impatto fisico sul terreno per via del carico naturale.

Le discipline sportive annoverate nella categoria “weight-bearing exercise” sono definite come attività strutturate che generano forza e forniscono un carico alle regioni scheletriche, superiore a

quello fornito dalle attività giornaliere svolte quotidianamente. Tra queste discipline sportive dette anche “discipline di carico” ricordiamo: ginnastica ritmica (RG), pallavolo, corsa, ginnastica aerobica, marcia, e tutte quelle discipline sportive che provocano un diretto impatto tra l’apparato muscolo-scheletrico e il suolo. Gli sport in cui i muscoli e le ossa non sostengono il peso del corpo (nuoto, bicicletta, ecc..) appartengono alla categoria di esercizi definiti con il termine “non weight-bearing exercise”. L’incremento degli studi condotti in questo settore ha mostrato che bambini e adolescenti che praticano regolarmente discipline sportive ad alto impatto fisico, presentano un miglioramento del loro stato osseo durante la crescita; quindi la pratica di PA ad alto impatto può essere vista come una strategia effettivamente valida per apportare miglioramenti all’apparato scheletrico (Hind *et al.*, 2007). Un evidente risultato ci viene proposto da uno studio condotto su bambini e adolescenti. Lo studio mette in rilievo come gli anni dell’infanzia e dell’adolescenza rappresentino un periodo durante il quale l’osso si adatta in modo particolarmente efficiente al carico a cui viene sottoposto (Bass, 2000). Non tutti gli sport influenzano positivamente la massa ossea dell’individuo; gli sport, in accordo con le loro caratteristiche, possono essere catalogati come osteogenici (è il caso delle discipline sportive ad impatto elevato) e non-osteogenici (è il caso delle discipline sportive non ad impatto elevato). Il football per esempio, oltre ad apportare numerosi benefici alla salute (Krustrup *et al.*, 2010), è considerato uno sport osteogenico per entrambi bambini e adolescenti, in quanto è stata rilevata una crescita della massa ossea in soggetti che praticano tale disciplina sportiva (Ara *et al.*, 2006). Al contrario, gli sport come il ciclismo (Rico *et al.*, 1993) o il nuoto (Andreoli *et al.*, 2012) non sono stati associati al cambiamento o riduzione della massa ossea quando confrontati con i gruppi di controllo. Tali discipline sportive (ciclismo, nuoto) potrebbero rappresentare una barriera per lo sviluppo della massa ossea compromettendo così la salute dell’osso (Andreoli *et al.*, 2012).

La pubertà rappresenta una fase molto importante per la crescita e lo sviluppo dell’osso, durante la quale si verifica la formazione della maggior parte della massa ossea individuale. Dall’età di circa dieci anni e per tutti gli anni dell’adolescenza si verifica un drammatico aumento di crescita della densità ossea sia nei ragazzi che nelle ragazze. Negli anni in cui si verifica il picco di crescita dello scheletro, gli adolescenti accumulano più del 25% di osso maturo e con il trascorrere del tempo completano il loro scatto di crescita a circa 17 anni; a questo punto avranno sviluppato circa il 90% della loro massa ossea adulta. La quantità di massa ossea accumulata durante l’infanzia e l’adolescenza stabilisce il livello della salute dell’osso per la parte di vita successiva dell’individuo. Quanto maggiore è la densità ossea individuale quanto minore sarà la probabilità da parte dell’individuo di sviluppare la condizione di osteoporosi durante il processo di invecchiamento. Gli anni della pubertà rappresentano quindi un’opportunità unica per la costruzione di ossa più forti e

sane possibili. L'osteoporosi è una malattia scheletrica, sistematica, caratterizzata da una bassa densità ossea e deterioramento microarchitetturale del tessuto osseo, con un conseguente aumento della fragilità ossea (Kanis *et al.*, 1994). L'osteoporosi è una patologia seria che sta crescendo in maniera esponenziale soprattutto nei paesi occidentali. Durante il processo di invecchiamento molte persone diventano fisicamente inattive, ed entrambi questi due fattori invecchiamento ed inattività, portano alla crescita di incidenza dell'osteoporosi specialmente nelle donne in menopausa. C'è quindi una forte enfasi sulle misure di prevenzione per combattere o compensare l'osteoporosi ed eventuali fratture che tale patologia potrebbe provocare. Una delle maggiori misure preventive considerate è l'ottimizzazione del picco di massa ossea (PBM) durante gli anni di giovinezza dell'individuo. Il parametro di PBM può essere definito come la maggiore quantità di massa ossea sviluppata durante l'esistenza a livello di specifici siti scheletrici. La massa ossea aumenta durante il periodo dell'infanzia e della pubertà, si consolida durante la prima parte dell'età adulta, e decade con l'aumentare degli anni del soggetto (Matkovic, 1994). Una valida strategia per aumentare il parametro di PBM è la pratica regolare di discipline sportive che prevedono un forte impatto fisico con il suolo (Genant *et al.*, 1999).

Gli sport che prevedono un elevato impatto fisico favoriscono: l'accrescimento dell'osso, il raggiungimento di PBM, una più elevata densità minerale dell'osso (BMD), e dal quarto decennio anche la conservazione della massa ossea stessa (Blinkie *et al.*, 1996). La RG che comprende anche il balletto e il pattinaggio artistico, è una disciplina sportiva che generalmente l'individuo inizia a praticare durante il periodo dell'infanzia, tale disciplina richiede all'atleta elevate capacità funzionali ed energetiche che potrebbero influenzare lo sviluppo fisico del corpo e la sua composizione (Misigoj-Durakovic *et al.*, 2005). Le atlete che praticano RG sono sottoposte ad alti livelli di stress fisico e psicologico dovuto all'intenso allenamento fisico a cui vengono sottoposte. In particolare, lo stress psicologico è dato dalle competizioni atletiche a cui le ginnaste partecipano (Theodoropoulou *et al.*, 2005). Le atlete ginnaste mostrano un ritardo modesto ma comunque significativo nello sviluppo della maturazione scheletrica, che si è visto essere correlato al tipo di esercizio fisico, frequenza, intensità, e durata dello stesso (Theodoropoulou *et al.*, 2005). È molto comune che gli sport estetici siano responsabili dell'insorgenza di disturbi alimentari, infatti tali discipline artistiche richiedono all'atleta di mantenere un'adeguata forma fisica per rientrare nei canoni fisici standard dell'atleta ginnasta, e per avere una maggiore flessibilità e leggerezza durante l'esibizione di tale disciplina (Krentz & Warschburger, 2011; Martinsen *et al.*, 2010; Thompson & Sherman, 2010). Facendo un paragone tra le ginnaste professioniste e quelle di minor successo, e con anche i gruppi di controllo non allenati, si è notato che le ginnaste professioniste sono significativamente più alte, hanno cosce più lunghe e valori superiori di massa magra (FFM) (Di

Cagno *et al.*, 2008). Nella disciplina di RG ci sono alcuni parametri tra cui forza aerobica, flessibilità, forza esplosiva, massa corporea, grado di apertura delle braccia, circonferenza della coscia, che sono di basilare importanza per il successo dell'esecuzione della performance e per l'identificazione del talento dell'atleta (Douda *et al.*, 2008).

Le atlete ginnaste solitamente presentano un corpo magro e con poca massa grassa (FM), la disciplina di RG comporta, come accennato pocanzi, questo genere di ideale estetico (Courteix *et al.*, 2007). L'ideale estetico non rappresenta soltanto un requisito della RG, ma anche un pregiudizio selettivo sia da parte delle ginnaste che da parte degli allenatori i quali privilegiano la partecipazione di atlete con idonea forma fisica a questa disciplina (Theodoropoulou *et al.*, 2005). Nei ballerini di danza classica si può notare una più lenta progressione della maturazione ossea, come si verifica similmente anche nelle ginnaste. Durante un periodo di tempo esteso, il raggiungimento di un'adeguata crescita ossea è giustificata dal recupero di una crescita potenziale, come quella che si verifica durante il periodo della pubertà (Donoso *et al.*, 2010). Nelle atlete ginnaste la fase prepuberale potrebbe essere più prolungata, e lo sviluppo puberale potrebbe essere completamente spostato ad un'età più avanzata, seguendo così la maturazione ossea piuttosto che l'età cronologica (Georgopoulos *et al.*, 2010). Uno studio condotto da Georgopoulos *et al.* (2001) ha rivelato che le ginnaste controbilanciano il ritardo della loro maturazione scheletrica e sviluppo puberale con un'accelerazione della velocità di crescita lineare verso la fine della pubertà. Inoltre, a causa del ritardo dello sviluppo puberale, nelle ginnaste, la comparsa della prima mestruazione può essere ritardata fino a 1.5–2.0 anni (Klentrou & Plyley, 2003). In passato, diversi studiosi hanno indagato su come gli effetti della RG possano influenzare processi fisiologici come la crescita, maturazione scheletrica, e sviluppo puberale nelle atlete ginnaste (Georgopoulos *et al.*, 2010; Georgopoulos *et al.*, 2012; Helge & Kanstrup, 2002; Tournis *et al.*, 2010). La tarda maturazione fisica che si verifica nelle ginnaste contribuisce alla decisione delle stesse di continuare a praticare questo sport nonostante gli allenamenti intensi provochino un ritardo della comparsa del menarca (Baxter-Jones *et al.*, 1994). La RG è risaputo essere una disciplina sportiva ad alto carico d'impatto per le ossa, in quanto le ginnaste eseguono molti salti durante i loro allenamenti giornalieri (Tournis *et al.*, 2010). Un esercizio ad alto impatto fisico come per esempio il salto, influenza fortemente sia lo sviluppo di BMD che il contenuto minerale osseo (BMC) (Fuchs *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2005). Studi condotti sulle ginnaste hanno evidenziato che giovani atlete presentavano valori di BMD superiori rispetto a bambini che praticavano altre discipline sportive o rispetto ad individui non allenati facenti parte di gruppi di controllo. Le ginnaste iniziano ad allenarsi utilizzando carichi piuttosto pesanti e partecipano alle competizioni già in età giovanile (Misigoj-Durakovic *et al.*, 2005; Tournis *et al.*, 2010). La partecipazione delle ginnaste ad eventi sportivi agonistici in età

eccessivamente precoce potrebbe portare come conseguenza il calo di FM e del bilancio energetico. È stato osservato che l'esercizio fisico di tipo "weight-bearing" influenza positivamente la salute dell'osso migliorando il valore di BMD (Etherington *et al.*, 1996). Contrariamente, studi condotti in passato hanno riportato che l'esercizio fisico di tipo "non weight-bearing" come ad esempio il nuoto, non ha gli stessi effetti benefici sui valori di BMD. È stato asserito che soggetti che praticavano un programma di allenamento di nuoto non mostravano una differenza significativa dei loro valori di BMD rispetto al gruppo di controllo preso in esame (Cassell *et al.*, 1996). Per esempio, la RG è una di quelle discipline conosciute come sport in cui il soggetto viene sottoposto a un carico meccanico che ha elevato impatto sull'osso. Il carico meccanico ad elevato impatto è stato dimostrato essere uno dei fattori maggiormente efficaci per la determinazione e il miglioramento di BMD (MacKelvie *et al.*, 2002).

In accordo con quanto considerato finora, è importante studiare l'impatto che l'esercizio fisico può avere sulla salute dell'osso analizzando più da vicino i meccanismi biochimici e cellulari coinvolti in questo tipo di indagine; e quindi valutare eventuali effetti che la disciplina di RG può avere sull'apparato scheletrico delle atlete ginnaste professioniste. Ad oggi, non risultano molti studi pubblicati sugli effetti che l'esercizio di tipo "weight-bearing" può avere sullo sviluppo dell'osso rispetto all'esercizio di tipo "non weight-bearing". Tuttavia, si è notato che sono presenti parecchi studi che trattano invece tale tematica separatamente, analizzando in modo slegato i diversi effetti che questi due tipi di esercizi possono avere individualmente sull'osso. Uno studio, per esempio, prendeva in esame le intensità di due esercizi differenti nel tentativo di confrontare la spesa energetica tra i due programmi di allenamento. Lo studio ha rilevato che soltanto i ratti sottoposti al protocollo della corsa mostravano maggiori siti specifici per BMD confrontati con quelli di nuotatori e gruppi di controllo. Comunque, entrambi corridori e nuotatori mostravano aumentate proprietà biochimiche dell'osso rispetto ai gruppi di controllo (Huang *et al.*, 2003). Ad oggi, sono presenti pochi dati sull'impatto che la pratica di RG può avere sullo stato dell'osso, soprattutto in ginnaste professioniste che nonostante la previsione di allenamenti pesanti decidono di iniziare la pratica di tale disciplina in età molto precoce. Il frangente di tempo in cui l'atleta giovane inizia a seguire gli allenamenti a carico elevato, è stato notato essere molto propenso per l'accumulo di minerale osseo soprattutto nei bambini (MacKelvie *et al.*, 2002). Sulla base delle nostre migliori conoscenze, sono stati condotti solo pochi studi longitudinali sull'influenza che la disciplina di RG può avere sull'integrità dell'osso, sui meccanismi biochimici e cellulari correlati ad esso, e sui valori di BMD e BMC. Ginnaste differenziate per tipo di allenamento, età, e livello di professionalità, potrebbero presentare valori di BMD e BMC differenti. Pertanto, il principale scopo di questa tesi è quello di analizzare possibili correlazioni tra i meccanismi biochimici e cellulari

coinvolti nello sviluppo osseo, e la pratica di RG da parte di atlete giovani e di elite. Inoltre, la predizione dello sviluppo dell'osso attraverso variabili quali i differenti protocolli di allenamento in atlete professioniste vs gruppi di controllo, rappresenta un altro oggetto d'indagine della presente tesi.

1.1.1 Metabolismo minerale e osseo: meccanismi cellulari e biomolecolari dell'osso

Il tessuto osseo è il principale tessuto connettivo strutturale e di supporto del corpo. Le ossa sono modulate dalla parte rigida del tessuto osseo, e queste sono responsabili del mantenimento eretto del sistema scheletrico. La funzione più importante del tessuto osseo è quella di essere resistente e di trasmettere le forze alle ossa senza provocare alcuna rottura. La forza dell'osso dipende dalla quantità di tessuto, dalla composizione del suo materiale, e dal modo in cui il materiale osseo è organizzato microarchitetturalmente e geometricamente (forma e dimensione) (Bouxsein *et al.*, 2006; Viguier-Carrin *et al.*, 2006). Come è stato riportato nello studio condotto da Seeman e Delmas (2006), le caratteristiche ottimali del tessuto osseo sono determinate da un buon livello di durezza, flessibilità, e leggerezza. Per sostenere e trasmettere i carichi in modo efficiente, l'osso deve essere rigido e capace di resistere alla deformazione. Tuttavia, l'osso non può essere troppo rigido perché tale condizione potrebbe provocare una minore capacità di assorbimento dell'energia nel corso dei processi di allungamento e accorciamento, tipici del movimento dell'apparato scheletrico. Al contrario, l'osso non può essere troppo flessibile perché durante il carico questo potrebbe essere facilmente deformato dallo sforzo acuto e da una eventuale frattura. L'osso deve anche avere la capacità continuativa di adattarsi ai cambiamenti meccanici e fisiologici a cui è sottoposto. L'effetto osteogenico (pertinente alla formazione del tessuto osseo) dell'esercizio è principalmente prodotto dagli impatti e carichi meccanici applicati sull'osso durante lo svolgimento dell'esercizio. Il processo di modellamento e rimodellamento dell'osso adatta l'osso stesso a nuove esigenze e, come conseguenza, avviene la modificazione di BMC e BMD. È possibile che si verifichino anche adattamenti strutturali e di microarchitettura trabecolare dell'osso (Bergmann *et al.*, 2010). L'osso è un tessuto connettivo indurito dalla mineralizzazione, la quale si verifica grazie ai fosfati di calcio. L'osso svolge delle funzioni meccaniche importanti: fornisce rigidità e forma, protezione e sostegno alla struttura del corpo, e supporta la locomozione. Contrariamente a quanto si possa credere, l'osso è una struttura altamente dinamica in fase di costante rimodellamento. Questo rimodellamento costante permette all'osso stesso di essere riparato, per esempio in seguito a una frattura, adattandosi così anche alle forze poste su di esso. Durante l'infanzia si verifica un ritmo accelerato di ricambio dell'osso in cui la formazione ossea supera il riassorbimento. In età adulta, la formazione e il riassorbimento dell'osso sono abbastanza bilanciati, mentre l'invecchiamento porta

a una netta perdita dell'osso. Alcuni fattori come andamento di ricambio dell'osso, matrice di collagene, struttura, dimensione, densità, geometria, combinati insieme determinano soprattutto le proprietà meccaniche dell'osso. Imperfezioni a livello di tali fattori possono provocare serie malattie come l'osteoporosi, osteopetrosi, osteogenesi imperfetta, morbo di Paget. Affinché la resistenza dell'osso venga mantenuta, il processo di ricambio dell'osso deve essere accuratamente equilibrato.

L'apparato scheletrico comprende ossa lunghe come omero, femore e tibia, e ossa piatte come cranio, scapola e ileo. Ci sono due tipi principali di ossa mature: l'osso corticale o compatto che ha una struttura densa e ordinata, e l'osso trabecolare o spugnoso che è più leggero, meno compatto e ha una struttura irregolare. L'osso corticale o compatto si trova principalmente a livello iniziale delle ossa lunghe e sulla superficie delle ossa piatte. L'osso corticale è composto da un osso adagiato concentricamente attorno ai canali centrali conosciuti come sistemi Haversiani (osteoni). Questi contengono vasi sanguigni, vasi linfatici, nervi e tessuto connettivo. Uno strato concentrico di anelli o lamelle di matrice ossea circonda ciascun canale Haversiano. All'interno delle lamelle sono presenti piccoli spazi chiamati lacune e contenenti gli osteociti. L'osso trabecolare o spugnoso è meno comune e compone la fine delle ossa lunghe e le parti interne delle ossa piatte. L'osso trabecolare contiene le trabecole, formate a loro volta da lamelle, ossia strati distinti di fibre e cellule ossee tenute assieme da fibre collagene, e interconnesse tra loro. All'interno delle trabecole sono contenuti il midollo osseo, i vasi, e i nervi. La specifica distribuzione anatomica dell'osso corticale e trabecolare riflette la compressione e la resistenza alla trazione da parte dell'osso. Così, l'osso trabecolare è idealmente adatto a sostenere lo stress compressivo e rappresenta l'osso predominante all'interno delle vertebre. Un ulteriore importante elemento nella struttura dell'osso è la rete di collagene. Negli adulti, le fibre di collagene adottano un orientamento preferenziale partecipando alla formazione dell'osso lamellare. All'interno dell'osso corticale le lamelle sono organizzate concentricamente, mentre nell'osso trabecolare sono parallele una all'altra. Il tessuto osseo si forma durante la crescita dello scheletro e in varie condizioni patologiche dell'adulto. Questo tipo di osso presenta una disposizione casuale delle fibre di collagene, le quali non hanno una dimensione uniforme né osteociti distribuiti uniformemente.

In generale ciascun osso possiede uno strato esterno di osso corticale sovrapposto all'osso trabecolare e alla cavità midollare. L'osso corticale possiede una membrana esterna chiamata periostio. Il periostio ha due strati: uno strato fibroso esterno e uno interno; lo strato fibroso interno possiede un potenziale osteogenico il quale dà vita a un nuovo osso e a cui permette di crescere gradualmente, processo noto come "apposizione periostale". La superficie interna della corteccia ossea ha un altro rivestimento chiamato endostio; e l'osso tende ad essere riassorbito dalla

superficie endostale. Entrambi, il periostio e l'endostio, contengono gli osteoblasti, gli osteoclasti e i loro progenitori. Gli osteoclasti e gli osteoblasti funzionano in modo coordinato grazie alla rispettiva forma dell'osso e all'attività di riassorbimento, per far fronte al rimodellamento, crescita e riparazione dell'osso.

1.1.2 Differenziamento e regolazione delle cellule ossee

L'unità multicellulare dell'osso è formata da osteociti, osteoclasti, e osteoblasti. L'osteocita è un ex-osteoblasto il quale rimane intrappolato nella lacuna ossea dopo aver secreto la matrice extracellulare, e si trasforma in una cellula quiescente. L'osteocita è la cellula più abbondante presente nel tessuto osseo. Prolungamenti specifici fungono da tramite e permettono agli osteociti di rimanere comunque collegati tra loro e giungere fino al canale di Havers, canale che consente il loro nutrimento. In caso di trauma o frattura ossea, l'ex-osteoblasto può riprendere la sua attività sintetica (perché liberato) ritrasformandosi quindi in un osteoblasto attivo. L'osteocita è ospitato all'interno di spazi di forma lenticolare detti lacune o osteoplasti. I prolungamenti citoplasmatici dell'osteocita sono alloggiati in canali o tunnel scavati nella matrice che prendono il nome di canalicoli, i quali sfociano nel canale di Havers contenente i vasi sanguigni. La funzione degli osteociti è quella di partecipare al rimodellamento osseo in risposta a stimoli di varia natura. Sotto lo stimolo di calcitonina e paratormone, per esempio, gli osteociti partecipano alla regolazione dei livelli ematici di calcio e fosforo, controllando sia l'attività degli osteoclasti che quella degli osteoblasti.

L'osteoclasto è una cellula molto grande, polinucleata e ricca di lisosomi. Appartiene alla linea dei monociti-macrofagi, deriva cioè dalla cellula mesenchimale emopoietica. Presenta molte estroflessioni ed increspature nella membrana plasmatica. Gli osteoclasti sono cellule specializzate nel riassorbimento del tessuto osseo il quale svolge un ruolo importante nel corso dei processi di rigenerazione e rimodellamento dello stesso tessuto osseo. Gli osteoclasti sono a contatto con la matrice ossea e hanno la funzione di riassorbire l'osso corrodendolo mediante enzimi di esocitosi e pH acido, collaborano cioè all'omeostasi calcica. Questa attività degli osteoclasti è svolta in tre fasi: la prima fase è l'adesione alla matrice ossea da riassorbire, la seconda fase è la creazione di un ambiente acido che solubilizza la matrice minerale, la terza fase è la digestione enzimatica della matrice organica. L'attività degli osteoclasti viene inibita dall'ormone calcitonina, prodotto dalla tiroide, che agisce direttamente su di essi.

L'osteoblasto è una cellula che elabora la matrice extracellulare del tessuto osseo. È una cellula ricca di reticolo endoplasmatico e apparato di Golgi, la sua superficie cellulare è provvista di corti e sottili prolungamenti, e ha un citoplasma basofilo. L'osteoblasto origina dai preosteoblasti che sono

cellule osteoprogenitrici. La sua funzione è quella di produrre la matrice organica del tessuto osseo, la quale matrice è costituita da fibre collagene di tipo I, proteoglicani e glicoproteine. La matrice ossea precoce prodotta dagli osteoblasti, non cristallizzata, è chiamata tessuto osteoide. All'interno della matrice si trovano numerose vescicole di secrezione ricche di un enzima caratteristico, la fosfatasi alcalina, e di ioni Ca^{2+} e $(\text{PO}_4)^{3-}$. I primi nuclei di mineralizzazione della matrice sono costituiti da queste vescicole. Gli osteoblasti sono presenti sia nell'embrione, durante la formazione delle ossa, sia nell'adulto, durante i processi di rimaneggiamento e riparazione del tessuto osseo. L'osteoblasto contiene al suo interno delle granulazioni PAS-positivo dette matrix vesicles o globuli calcificanti, provvisti di membrana e ritenuti responsabili del processo di mineralizzazione. La membrana cellulare aderisce alla matrice pericellulare per mezzo di proteine integrine specifiche. Tra le varie proteine secrete dall'osteoblasto troviamo la procollagenasi e la collagenasi. La procollagenasi è un enzima che, deposto nella matrice verrà trasformato nella sua forma attiva. La collagenasi è invece un enzima impiegato dagli osteoclasti nella demolizione delle fibre collagene. L'attivazione della procollagenasi è a carico degli stessi osteoclasti che tramite l'intervento di una serie di proteine arrivano a disporre della collagenasi matura. Inoltre, l'osteoblasto (e la sua forma più differenziata l'osteocita) presenta sulla membrana anche dei recettori per il paratormone (PTH) grazie ai quali, una volta avvenuta l'interazione con il suddetto ormone, vengono liberati gli OAF (osteoclast activating factors), ovvero fattori di attivazione per gli osteoclasti, che inizieranno il processo di riassorbimento della matrice calcificata. Una volta cessata la funzione biosintetica, gli osteoblasti diventano osteociti, ossia le cellule del tessuto osseo adulto che occupano le lacune ossee.

Durante lo sviluppo scheletrico, si verifica a livello della cellula ossea la differenziazione (maturazione di una cellula da una forma primitiva a una forma matura) dell'osteoblasto e la deposizione della matrice ossea; questo comporta l'interazione tra fattori endocrini, paracrini, e autocrini. La differenziazione dell'osteoblasto è stimolata da più fattori ed è un processo che avviene seguendo diversi stadi. Quindi, il fattore di crescita epidermico promuove il rinnovo di cellule staminali mesenchimali (MSC), e l'auto rinnovo è stato trovato essere criticamente dipendente dall'espressione di alcuni geni, come per esempio l'antigene-1 delle cellule staminali (Sca1;Ly6A/E) (Tamama *et al.*, 2006). Il fattore stimolante dell'osteoblasto (OSF-1) è conosciuto anche come pleiotrofina (PTN) o molecola associata alla crescita dell'eparina vincolante (HB-GAM), la quale è chemiotattica per l'osteoprogenitore e stimola l'attività dell'osteoblasto maturo (Yang *et al.*, 2001). Altri fattori come PTH, ormone della crescita (GH), prostaglandine (PG), fattore di crescita insulino simile (IGF-1) presentano effetti maggiormente pervasivi, influenzando il rinnovamento di MSC e stimolando la differenziazione osteogenica della proteina morfogenetica

dell'osso (BMP). BMP è ampiamente espressa nel corso della vita fetale, svolge un ruolo importante nello stimolare la sintesi di tessuto osseo e la deposizione di grasso bruno. Esistono almeno 30 tipi di BMPs che formano il più grande gruppo delle proteine TGF (transforming growth factor) (Wozney *et al.*, 1988). Per esempio, BMP-7 può essere utilizzata a scopo terapeutico, per indurre la produzione di tessuto osseo nelle fratture tibiali che non si siano consolidate a distanza di parecchi mesi. Queste proteine sono quindi denominate per le loro proprietà osteoinduttive, e regolano la differenziazione di MSC nei componenti dell'osso, della cartilagine o del tessuto adiposo (Wozney *et al.*, 1988).

Gli osteoblasti sono racchiusi all'interno della matrice che loro stessi sintetizzano, fino a trasformarsi in osteociti. Gli osteociti che anch'essi si trovano dispersi all'interno della matrice sono cellule differenziate terminali che svolgono un'attività di formazione ossea inferiore rispetto agli osteoblasti, ma costituiscono oltre il 90% delle cellule ossee degli adulti (Knothe-Tate *et al.*, 2004). Nonostante la loro relativa inattività, paragonati agli osteoblasti, gli osteociti giocano un ruolo centrale nella determinazione e mantenimento della struttura dell'osso (Zhao *et al.*, 2002). La matrice ossea isola gli osteociti l'uno dall'altro, così gli osteociti interagiscono con altri osteociti e cellule ossee grazie ad una rete elaborata di osteociti dendritici i quali si trovano all'interno di specifici canalicoli. Tale processo secondo uno studio potrebbe stimolare il riassorbimento osseo (Zhao *et al.*, 2004). È stato a lungo riconosciuto che lo stress meccanico indotto da PA ad elevato impatto (weight-bearing exercise) aumenta l'attività degli osteoblasti. Infatti, l'assenza di stimolazione meccanica, per esempio provocata da un periodo prolungato di immobilizzazione, può causare una grave perdita di massa ossea (Semb *et al.*, 1969). Una teoria emergente asserisce che gli osteociti agiscono come cellule meccanosensoriali occupandosi di trasportare le molecole di segnalazione che sono responsabili per il mantenimento della struttura e della massa ossea. Tale modello è stato proposto per spiegare come il carico meccanico induca la trasmissione biochimica la quale promuove la formazione e il rimodellamento dell'osso (Duncan *et al.*, 1995).

Il processo di osteocitogenesi o differenziazione degli osteociti, che vede gli osteoblasti diventare parte della matrice ossea mineralizzata, non è ancora molto chiaro, sono emerse però importanti evidenze a riguardo. La proteina più abbondante della matrice ossea, all'interno dell'ambiente dell'osteocita, è il collagene di tipo-1. È stato dimostrato che, sia il fenotipo dell'osteocita che la formazione degli osteociti stessi, dipendono dalla rottura della proteina collagene di tipo-1 (Holmbeck *et al.*, 2005). È stato anche provato che modificazioni nel numero del dendrite degli osteociti potrebbe influenzare la funzione e la vitalità degli stessi osteociti, come anche le proprietà meccaniche dell'osso (Zhang *et al.*, 2006). Uno studio ha rivelato che le proteine della matrice ossea, come ad esempio la fosfoproteina acida della matrice dentina-1 (Dmp1), la

fosfoglicoproteina detta anche osteociti/osteoblasti fattore-45 (MEPE/OF45), e la sclerostina (SOST), aumentano la loro espressione una volta che l'osteoblasto inizia a trasformarsi in osteocita (Toyosawa *et al.*, 2001). La trasformazione dello stress meccanico in segnali biochimici si verifica negli osteociti e negli osteoblasti, e tale processo coinvolge una varietà di proteine di membrana includendo le integrine, le connesine, e i canali ionici attivi. Tra i potenziali mediatori intracellulari biochimici del segnale, troviamo IP3 (inositolo trifosfato), Ca (calcio intracellulare), cAMP (adenosina monofosfato ciclico), proteine regolatrici della guanina, e MAPK (mitogen activated protein kinase) (Gudi *et al.*, 2003). La stimolazione meccanica aumenta l'espressione delle connesine (Alford *et al.*, 2003), proteine di membrana che formano canali ordinati; questo permette lo scambio diretto tra piccole molecole e cellule adiacenti, che risulta in una comunicazione intracellulare tra cellule. Inoltre, le connesine possono anche formare canali regolatori tra la cellula e il proprio ambiente extracellulare.

Il rispettivo riassorbimento dell'osso e l'attività di formazione degli osteoclasti e degli osteoblasti sono finemente associati, per questo motivo nei soggetti adulti e sani, la massa ossea si mantiene notevolmente stabile. Nonostante questo, ci sono molte malattie come l'osteoporosi, morbo di Paget, cancro delle ossa, artrite infiammatoria, in cui il sano equilibrio viene leso a causa di un netto aumento dell'attività di riassorbimento dell'osso da parte degli osteoclasti. In vista del ruolo critico che gli osteoclasti potrebbero avere in diverse patologie, sono stati condotti parecchi studi per esplorare e capire la biologia di queste cellule uniche. Gli osteoclasti, come già accennato, sono cellule multinucleate differenziate di monociti/macrofagi formate per espletare l'unica funzione di riassorbimento della matrice ossea. L'osteoclastogenesi è il processo che prevede lo sviluppo degli osteoclasti. Studi condotti hanno mostrato che l'osteoclastogenesi è criticamente dipendente da due citochine chiave chiamate RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand), anche conosciuta come TRANCE (TNF-related activation-inducing cytokine), e M-CSF (monocyte-colony stimulation factor). M-CSF si è ipotizzato essere critico per la proliferazione dei progenitori degli osteoclasti, mentre RANKL controlla direttamente il processo di differenziazione attraverso l'attivazione di RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B) (Lacey *et al.*, 1998). Recenti indagini approfondiscono la natura di interazione tra sistema scheletrico e immunitario. La realizzazione della natura complicata di tale interazione è stata supportata dal fatto che un numero di recettori di superficie della cellula, citochine e pathways metabolici, giocano un ruolo critico in entrambi, sistema immunitario e sistema scheletrico. La stretta interazione tra progenitori immuni e scheletrici, è facilitata dalla loro vicinanza nel midollo osseo. Pertanto, negli ultimi anni è emersa l'osteoinmunologia, una disciplina che tratta le interazioni complesse e sovrappone le funzioni del sistema immunitario e delle cellule ossee.

Le cellule T sono adibite a regolare rapidamente l'espressione di RANKL durante la sua attivazione, e sono quindi capaci di regolare anche la differenziazione e attività degli osteoclasti. Infatti, è stato dimostrato che le cellule T attivate promuovono l'osteoclastogenesi in vitro, mediano il deterioramento dell'osso nelle malattie infiammatorie delle articolazioni, e svolgono un ruolo essenziale nella patogenesi dell'osteoporosi nei ratti, come dimostrato in alcuni esperimenti (Kong *et al.*, 1999). Oltre a RANKL, le cellule T producono molte altre citochine che modulano l'attività degli osteoclasti e l'osteoclastogenesi. Tra queste vanno ricordate: il fattore di necrosi tumorale (TNF- α), interleuchina 6 (IL-6), e interleuchina 17 (IL-17) che sono stimolatori, mentre interleuchina 4 (IL-4), interleuchina 13 (IL-13) e interleuchina 10 (IL-10) sono inibitori (Gillespie *et al.*, 2007). Dato che la gamma di citochine prodotte da differenti sottoinsiemi di cellule T mostrano una rilevante variabilità, queste influenzano quindi l'attività e il numero degli osteoclasti. In aggiunta alla loro influenza sull'attività degli osteoclasti, le cellule T potrebbero anche interagire direttamente con gli osteoblasti ed avere degli effetti sul ricambio osseo, indirettamente e attraverso le loro interazioni con i dendriti e con le cellule B (Yun *et al.*, 1998). Il ruolo di altri tipi di cellule immunitarie sul metabolismo dell'osso non è stato ancora chiarito del tutto, sebbene alcuni dati emergenti suggeriscono che la cellula B potrebbe ricoprire un ruolo importante (Choi *et al.*, 2003). Per esempio, è stato riportato che i progenitori delle cellule B sono capaci di differenziarsi in osteoclasti, in vitro, e che le cellule B di sangue periferico reprimono il processo di osteoclastogenesi. Recentemente, è stato dimostrato che le cellule B sono un'importante risorsa di osteoprotegerina (OPG), e che la carenza di cellule B nei ratti ha portato ad una riduzione della massa ossea, la quale può essere evitata grazie al trasferimento artificiale di cellule B (Choi *et al.*, 2003). OPG, anche chiamata recettore del fattore di necrosi tumorale 11B, è una proteina recettoriale facente parte della superfamiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale. È deputata all'inibizione dell'osteoclastogenesi.

Molte citochine sono importanti regolatori della funzione degli osteoclasti e osteoblasti, e la maggiorparte di queste citochine sono prodotte da cellule del sistema immunitario (Stashenko *et al.*, 1987). I meccanismi precisi di come queste citochine regolano l'attività degli osteoblasti e osteoclasti non è ancora stato del tutto chiarito; la maggiorparte di tali meccanismi agisce indirettamente regolando le interazioni tra gli osteoclasti e osteoblasti. Per esempio, è stato scoperto che molte citochine regolano l'espressione di RANK e RANKL rispettivamente, su osteoclasti e osteoblasti, o modulano il segnale intracellulare mediato da RANK. In generale, le citochine pro-infiammatorie, come IL-1, TNF- α , e IL-6, sembrano agire sinergicamente sull'osteoclastogenesi e promuovono la funzione degli osteoclasti (Ragab *et al.*, 2002). Studi condotti recentemente mostrano che la funzione degli osteoblasti potrebbe contribuire alla condizione di obesità e

intolleranza al glucosio. Questo suggerisce che il sistema scheletrico esercita una regolazione endocrina sul metabolismo energetico che potrebbe in tal modo contribuire all'insorgenza di disordini metabolici. A proposito di ciò, è stato notato che un particolare recettore chiamato Ptpv (Receptor Type Tyrosine Protein Phosphatase V), conosciuto anche come Esp, per la proteina OST-PTP che è espressa negli osteoblasti, regola la secrezione dell'insulina (Mauro *et al.*, 1994). Nei ratti invece è stata appurata la carenza di Esp a livello degli osteoblasti, che aumenta l'attività delle cellule B le quali proteggono i ratti dall'insorgenza di diabete ed obesità (Lee *et al.*, 2007).

1.1.3 Effetti dell'esercizio fisico sul metabolismo dell'osso

La fragilità scheletrica può essere responsabile di fratture ossee. Questo rappresenta ad oggi un problema di rilevante importanza per la sanità pubblica, a livello sia sociale che economico (Phillips *et al.*, 1988; Saito & Marumo, 2010). Nonostante l'osteoporosi rappresenti una delle principali patologie per le persone anziane, l'ottenimento di uno scheletro forte e sano durante gli anni di crescita e di sviluppo, potrebbe essere la soluzione migliore per prevenire l'insorgenza dell'osteoporosi in tarda età. Lo stato minerale osseo (BMS) del soggetto adulto, riflette la maturazione minerale ossea che è presente durante la crescita, e la successiva perdita ossea che invece si verifica con l'avanzare dell'età. Determinare il livello ottimale della mineralità dell'osso, soprattutto durante l'infanzia e l'adolescenza, è un problema critico in termini di permanente adeguatezza da parte del sistema scheletrico. A causa del fatto che la perdita minerale ossea è una normale conseguenza del processo d'invecchiamento, gli individui che acquisiscono un maggiore equilibrio di BMD durante i primi due decenni di vita, dovrebbero incorrere in un minor rischio di problemi di salute associati alla fragilità scheletrica in tarda età. L'impatto di PA sull'integrità dello scheletro rappresenta un'area di notevole interesse e di vasto studio, specialmente se considerato in vista della relazione tanto approfondita tra, lo stato di BMD nel soggetto adulto, e il rischio di contrarre fratture nel soggetto anziano. La possibilità di contrarre fratture ossee aumenta quando valori di BMD diminuiscono (Wasnich, 1993; Morin *et al.*, 2009); quindi, un maggiore fattore di rischio per la frattura ossea è dato da più bassi valori di BMD (Johnston & Slemenda, 1993; Morin *et al.*, 2009). Tra i principali fattori determinanti di BMS troviamo l'ereditarietà, che è stata approfondita in vari studi condotti su gemelli e nuclei familiari (Johnston & Slemenda, 1993). Tuttavia, uno studio recente, indica che quasi per metà la variabilità di BMD non è attribuibile solo a fattori di ereditarietà (Krall & Dawson-Hughes, 1993; Pirro *et al.*, 2010), ed esiste la dimostrazione che l'esercizio fisico, se praticato con una certa costanza, può essere un importante contributo. È stato dimostrato che l'immobilizzazione provoca la perdita di minerale osseo. Così, il potenziale da parte di un esercizio fisico di tipo "weight bearing" di ridurre la probabilità di una

minore mineralizzazione ossea correlata all'età, è stato ampiamente studiato soprattutto nei soggetti più adulti, ed in letteratura è presente un numero consistente di eccellenti manoscritti che trattano tale argomento (Burr, 1992; Scott *et al.*, 2011).

Lo scheletro umano è composto da 206 ossa individuali che fungono da struttura di sostegno per l'organismo, fornendo, tra le altre cose, supporto contro la gravità, protezione per gli organi vitali e tessuti, e sistema di leva per l'azione del muscolo. Le ossa svolgono anche un ruolo essenziale per alcuni processi vitali dell'organismo, quali: l'omeostasi di Ca e del fosfato (Pi), la funzione di sistema immunitario, e l'ematopoiesi. Quasi il 30% della massa di uno scheletro maturo è composto da minerale; mentre proteine, grassi, e acqua compongono il resto. L'apporto di Ca equivale a circa il 37% del totale BMC; mentre fosforo (P), sodio (Na), potassio (K), zinco (Zn), magnesio (Mg), e altre tracce di minerali compongono il resto (Sledge & Rubin, 1989; Markings B, 2004). Le fibre di collagene resistenti alla tensione forniscono flessibilità, permettendo così al tessuto di rispondere a considerevoli forze curvandosi, ma non spezzandosi. L'osso rimane elastico per un massimo di circa tre quarti del suo sforzo più elevato (Ascenzi & Bell, 1971; Markings B, 2004). Negli anni, sono stati utilizzati molti metodi per descrivere lo sviluppo scheletrico e valutare i cambiamenti che si verificano durante il processo di mineralizzazione ossea in diverse fasi dell'età. Recenti valutazioni, ottenute analizzando modelli anatomici deceduti, includevano il peso dello scheletro e la morfometria diretta delle ossa. In questo scenario le radiografie erano anche usate per l'analisi di tipo morfometrico, e la densitometria era usata per stimare il parametro di BMD. Negli ultimi 25 anni sono state sviluppate nuove tecniche non invasive che hanno fornito una stima maggiormente precisa, sensibile, ed accurata della mineralizzazione ossea. Tra queste nuove metodologie ricordiamo l'assorbimento di fotoni, l'assorbimetria a raggi X a doppia energia (DXA), la tomografia computerizzata quantitativa (QCT), e l'attenuazione ad ultrasuoni a banda larga. È inoltre importante evidenziare la distinzione tra BMC e BMD. Informazioni di tipo quantitativo sullo sviluppo dell'apparato scheletrico ci vengono fornite da BMC, mentre, informazioni di tipo qualitativo che mirano a controllare le differenze della dimensione delle ossa ci vengono fornite da BMD. Per esempio, la donna in generale presenta valori di BMC inferiori rispetto all'uomo in quanto lo scheletro della donna si presenta anatomicamente più piccolo.

1.1.3.1 Processi di adattamento dello scheletro

Il tessuto osseo è in un costante stato di mutamento durante tutto il corso della vita. Tre processi sono coinvolti in questa condizione di dinamismo: la crescita, il modellamento, il rimodellamento. Durante il ciclo della vita, un singolo processo potrebbe dominare in determinati momenti, oppure i tre processi potrebbero agire sinergicamente in altri momenti diversi. In un sistema scheletrico

ancora non del tutto formato e quindi immaturo, tutti e tre i processi sono attivi in maniera simultanea; ognuno di loro svolge una funzione utile e differente (Burr, 1992). Crescita: la crescita è l'espressione di un processo geneticamente programmato di ingrandimento dell'intero scheletro, che non prevede simultanei cambiamenti nella forma i quali invece potrebbero verificarsi in specifiche regioni in risposta a fattori locali di carico. Nell'uomo, la maturazione scheletrica è marcata dalla cessazione di sviluppo dello scheletro. La crescita è principalmente sotto il controllo del sistema endocrino (Ohlsson *et al.*, 1993; DiGirolamo *et al.*, 2012). Modellamento: il modellamento è un processo che altera la forma e la massa delle ossa in risposta a fattori meccanici di carico. Il modellamento si verifica principalmente durante gli anni di crescita e rappresenta una risposta a livello dei siti scheletrici sui quali vengono applicate specifiche condizioni di carico. La resistenza dell'osso aumenta grazie alla massa aggiunta e al miglioramento dell'architettura interna a livello dei siti scheletrici, su cui si attua uno specifico carico elevato. La risposta da parte del processo di modellamento dell'osso a una regolare pratica di PA ad elevato impatto, nel soggetto giovane, potrebbe risultare in una riserva di osso al di là di quella necessaria per lo svolgimento di una normale PA (Frost, 1989; Maïmoun & Sultan, 2011). L'abilità dell'osso di adattarsi ai fattori di carico è maggiore durante la crescita rispetto a dopo la maturità (Forwood & Burr, 1993; Guadalupe-Grau *et al.*, 2009). Nonostante il modellamento dell'osso si verifichi principalmente durante gli anni di crescita, recenti studi indicano che sotto determinate condizioni metaboliche o di carico, si può verificare un modellamento dell'osso più limitato in seguito alla maturazione scheletrica (Burr *et al.*, 1989; Robling *et al.*, 2006). Rimodellamento: il rimodellamento, sebbene sia un processo presente negli individui giovani, è allo stesso tempo un processo osseo dominante che modifica la forma e la massa ossea anche negli individui adulti. Il primo effetto del rimodellamento è quello di rimpiazzare il tessuto osseo danneggiato a causa di un'eccessiva sollecitazione con un nuovo osso; quindi, il processo di rimodellamento fornisce una funzione di mantenimento dell'osso. Il ciclo di rimodellamento inizia con una fase di attivazione, seguita in sequenza da una fase di riassorbimento, e in ultimo una fase di formazione. Tale sequenza di eventi permette allo scheletro di mantenere la sua integrità meccanica attraverso il rinnovo dell'osso e fornisce un meccanismo specifico per il mantenimento dell'omeostasi di Ca. Negli anni, comunque, il rimodellamento porta a una netta perdita dell'osso, come è anche vero che il nuovo osso non rimpiazza mai completamente l'osso che è stato riassorbito, in particolar modo a livello della superficie endostale, dove l'osso è in contatto con il midollo. Questo processo è responsabile della riduzione minerale ossea che insorge durante l'invecchiamento. Così, i processi di modellamento e rimodellamento possiedono effetti a lungo termine opposti, sebbene siano inizialmente entrambi sollecitati da stimoli di carico meccanico.

1.1.3.2 Densità minerale ossea: considerazioni sullo sviluppo

La stabilizzazione di un livello ottimale di BMD durante gli anni di crescita, e cioè quando il processo di modellamento è sovrapposto alla fase di crescita, è un'importante considerazione in termini di permanente stabilità dello scheletro. Due teorie determinanti sono state considerate per spiegare la causa di ridotti valori di BMD in alcuni individui anziani facenti parte della popolazione: un'eccessiva perdita ossea durante l'invecchiamento e un tentativo fallimentare di ottenere sufficiente BMC durante gli anni della crescita (Seeman, 1994; Zioupos, 2001).

Per esempio, è stato mostrato da uno studio condotto su bambini Canadesi, che con l'avanzare dell'età, il valore di BMC del cranio diminuiva laddove anche la percentuale di BMC dell'intero corpo diminuiva, in altre regioni e in particolare nelle gambe BMC aumentava. Nei ragazzi in età compresa tra 8 e 15 anni, gli arti inferiori rappresentavano quasi la metà del totale aumento di BMC (600-700 g), mentre in altri siti scheletrici l'aumento di BMC era di circa 100-200 g. Nelle ragazze, con l'aumentare dell'età si notava un più marcato aumento di BMC nel tronco, mentre nei ragazzi si notava un più marcato aumento di BMC nelle gambe (Seeman, 1994).

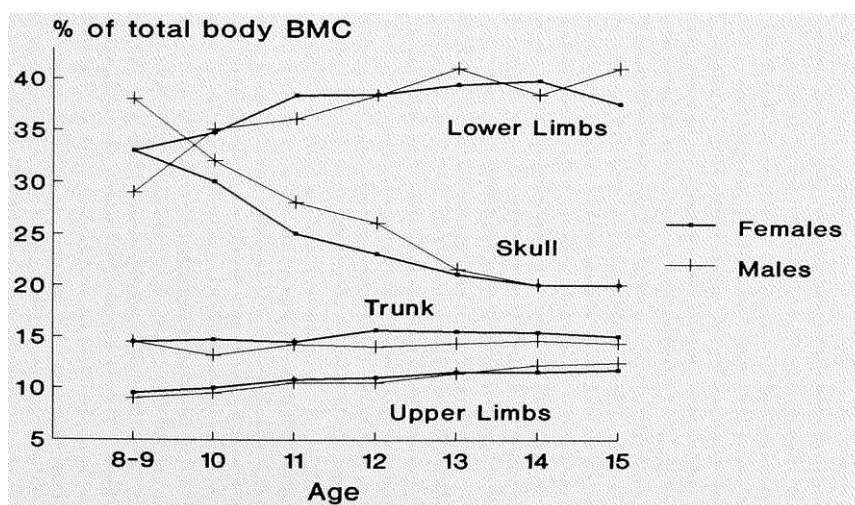


FIGURA 1.1.

Regional BMC at the skull, lower limbs, trunk, and upper limbs, expressed as a percentage of total Body BMC. (Seeman, 1994).

Durante l'infanzia si possono verificare piccole o quasi inesistenti differenze di genere di BMC a livello dei siti scheletrici assiali o appendicolari, ma durante il periodo di crescita puberale le differenze di genere di BMC osservate nei giovani adulti diventano invece evidenti (Rico *et al.*, 1993; Cheng, *et al.*, 2009). I dati longitudinali maggiormente esaustivi sono stati messi insieme durante uno studio condotto su soggetti adolescenti da Bailey *et al.* (1996); (Cheng *et al.*, 2009).

Durante questo studio sono stati reclutati più di 100 ragazzi e 100 ragazze in età compresa tra 8 e 19 anni. Durante l'indagine durata quattro anni sono stati monitorati annualmente nei soggetti reclutati, due parametri: la curva di distanza e di velocità di maturazione di BMC in relazione all'età e in riferimento a tutto il corpo, a livello dell'intero apparato scheletrico, del collo femorale (FN), e zona lombare L1/L4 (LS). Come indicato dai risultati di questo studio, valori di BMC dell'intero apparato scheletrico sono simili nei ragazzi e nelle ragazze fino a circa l'età di 13 anni, dopo questa età, valori di BMC risultano maggiori nei ragazzi.

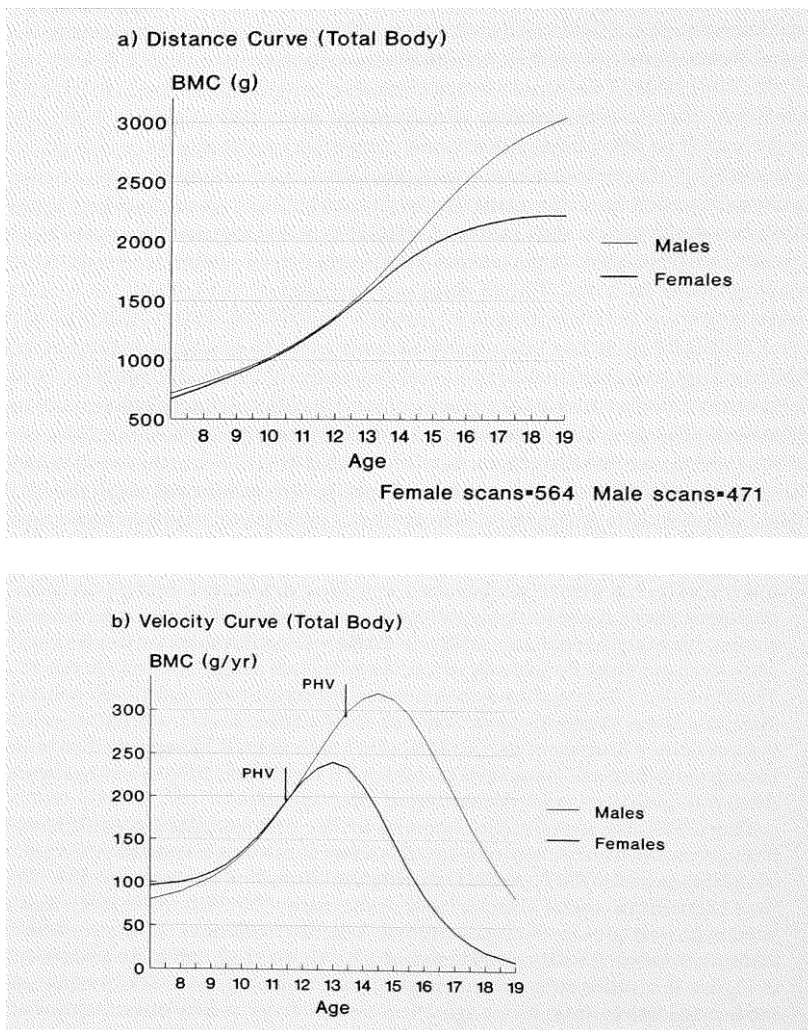


FIGURA 1.2. Total body BMC distance (a) and velocity (b) curves for males and females, derived from cross-sectional data, using a least-squares curve fitting model [100]. PHV indicates where peak height velocity occurs for boys and girls in this cross-sectional sample (Bailey *et al.*, 1996).

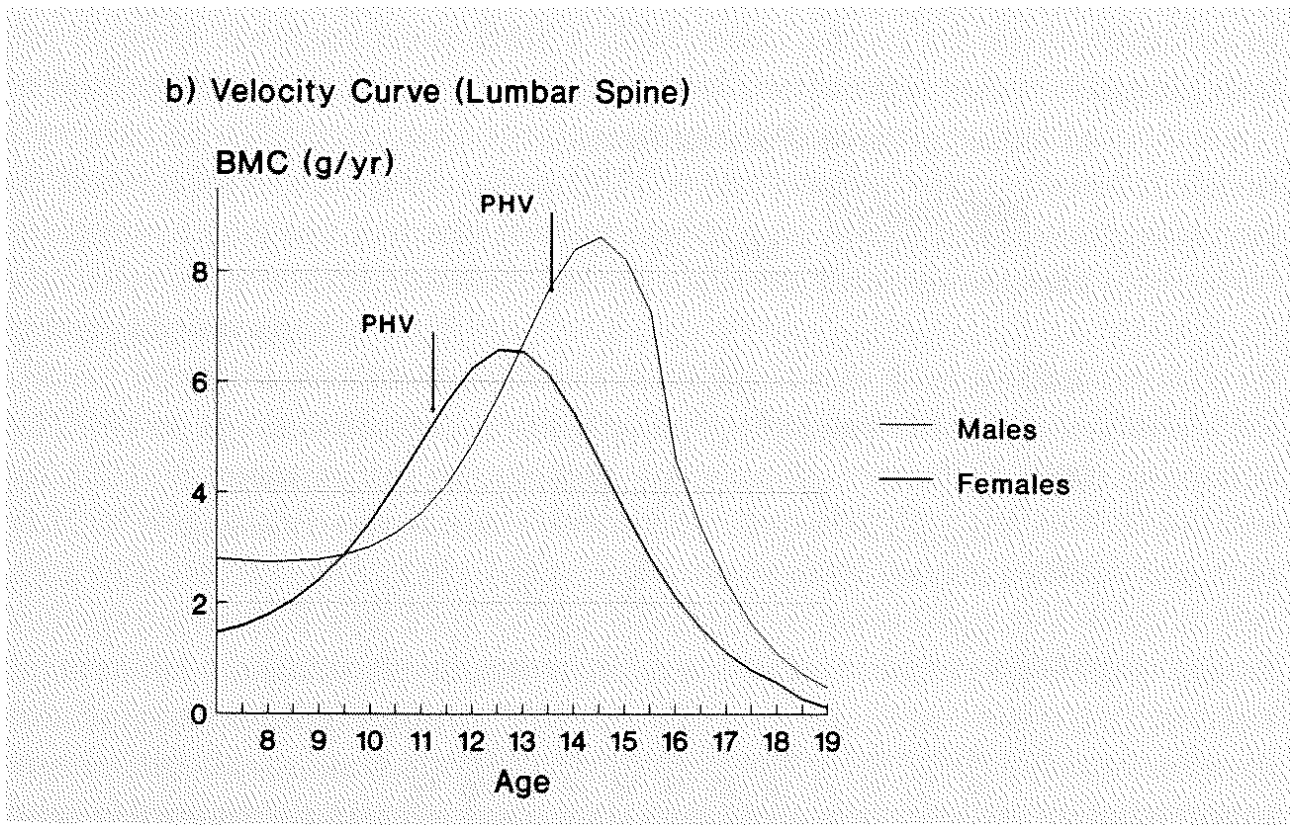
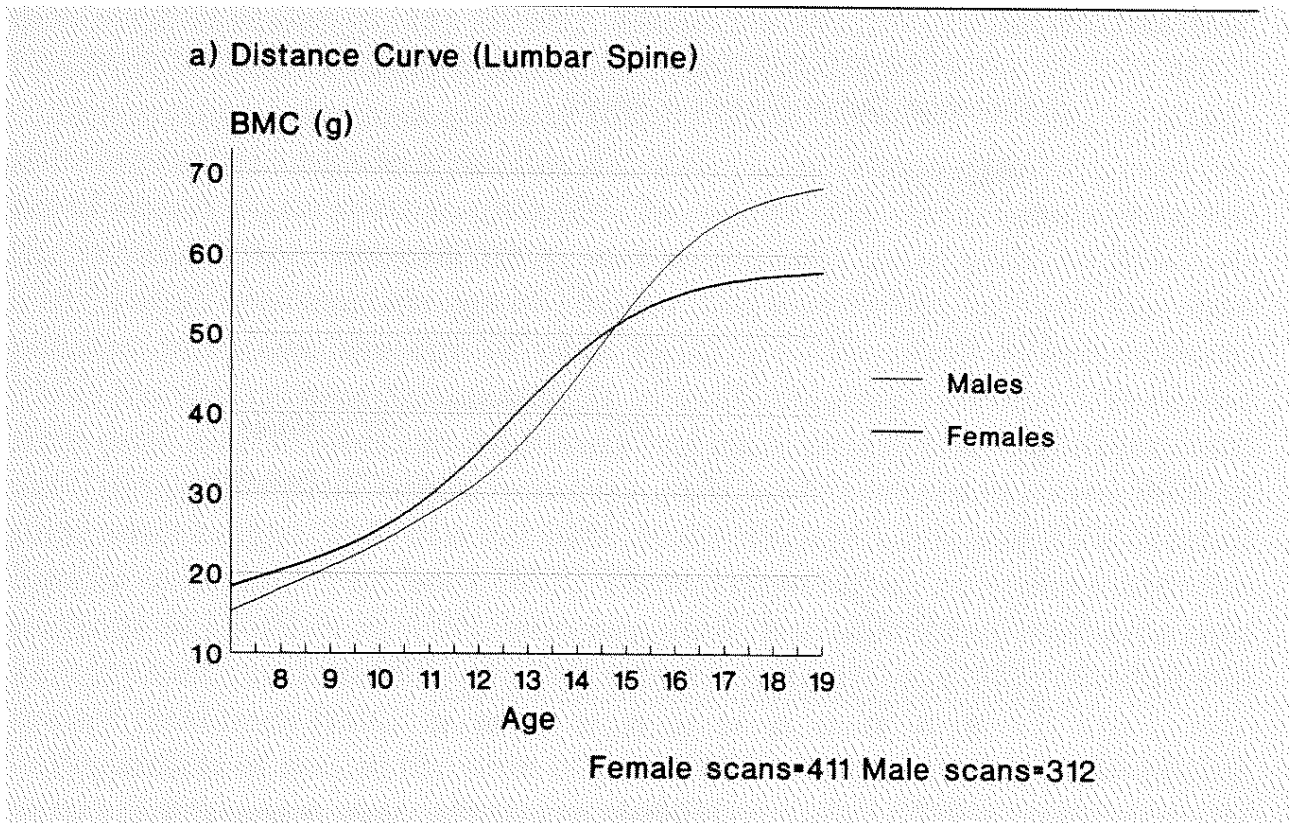


FIGURA 1.3. Femoral neck BMC distance (a) and velocity (b) curves for males and females, derived from cross-sectional data, using a least-squares curve fitting model. PHV indicates where peak height velocity occurs for boys and girls in this cross-sectional sample (Bailey *et al.*, 1996).

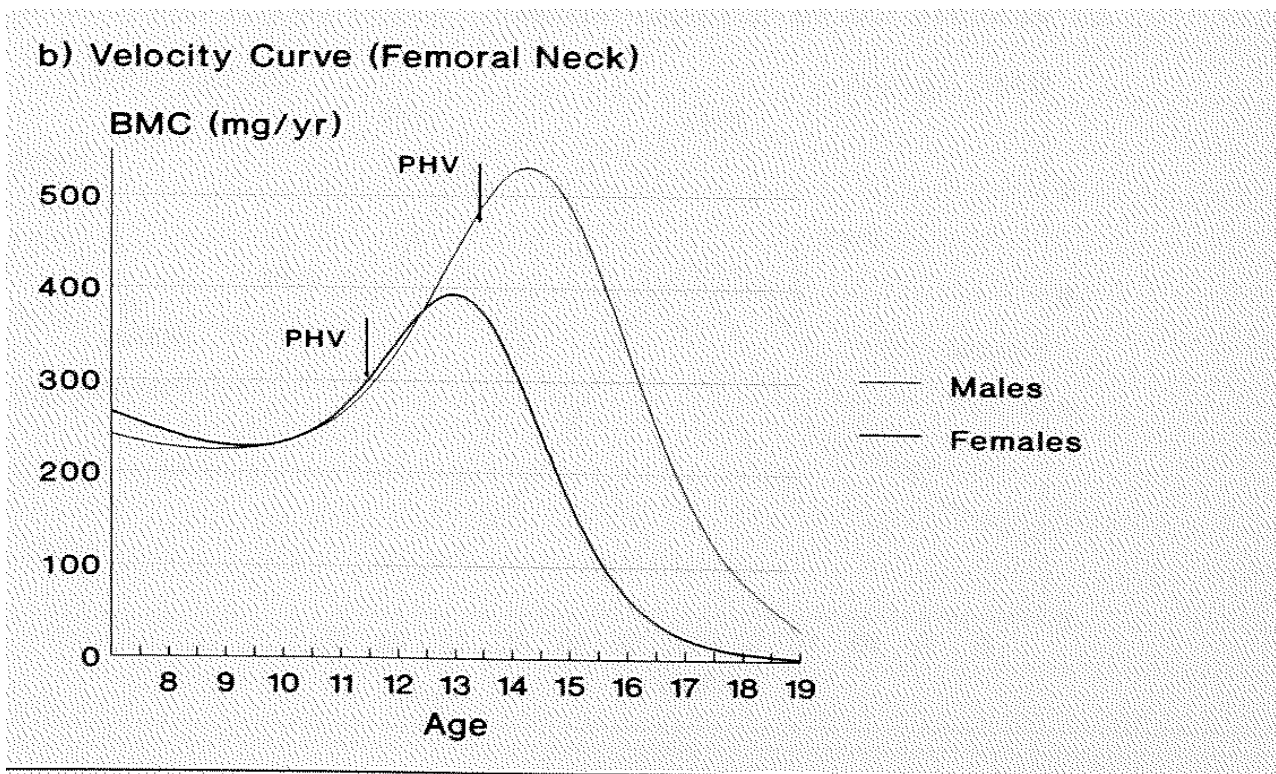
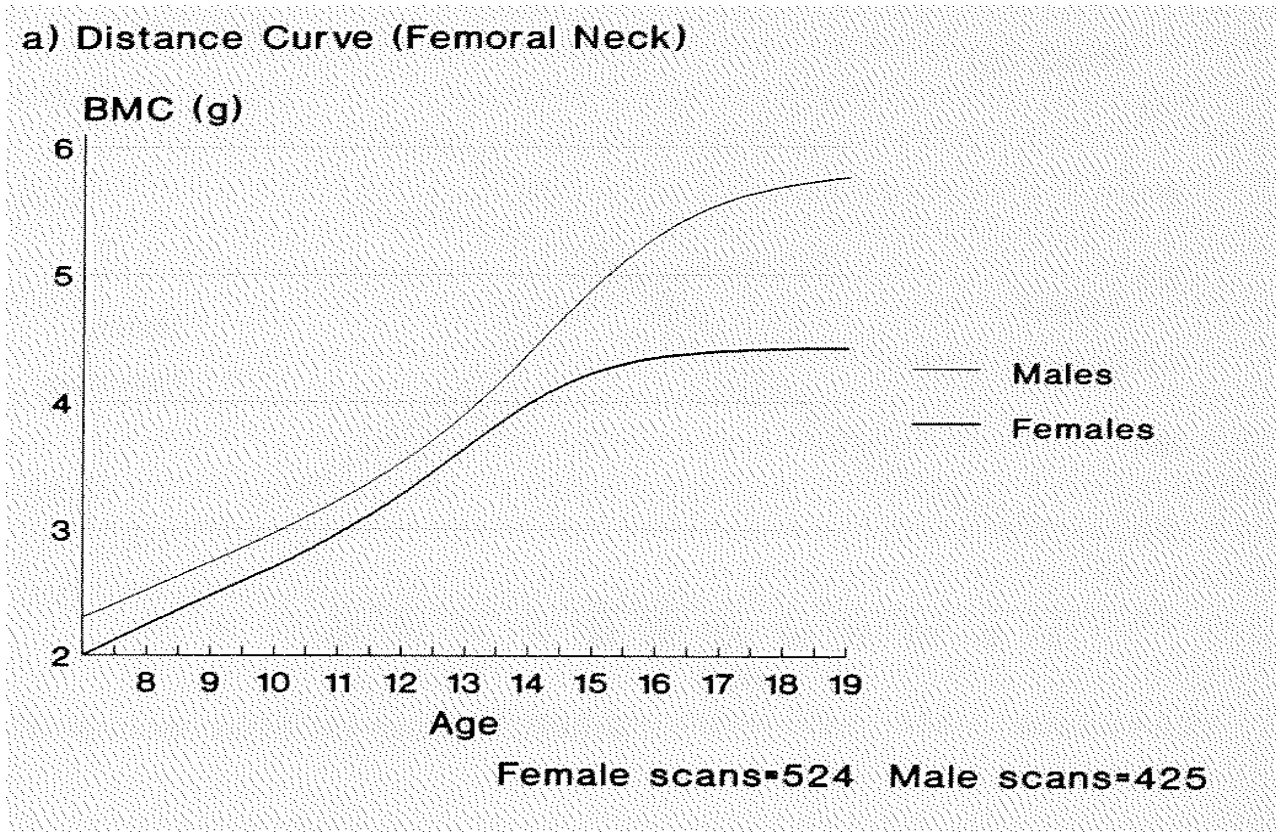


FIGURA 1.4. Lumbar spine (L1-L4) BMC distance (a) and velocity (b) curves for males and females, derived from cross sectional data, using a least-squares curve fitting model. PHV indicates where peak height velocity occurs for boys and girls in this cross-sectional sample (Bailey *et al.*, 1996).

Questi dati sono coerenti con quelli ricavati da altri autori in altri studi, dove non sono riportate differenze significative di BMC a livello radiale o dell'intero apparato scheletrico nei ragazzi e ragazze di età preadolescenziale, ma i dati indicano che i ragazzi mostrano un pronunciato aumento di BMC durante il periodo della pubertà e dello sviluppo dell'apparato scheletrico (Rico *et al.*, 1993). Sono emerse alcune variazioni di genere abbastanza evidenti riguardo lo sviluppo di BMC e BMD. Per esempio, alcuni studi hanno mostrato maggiori valori di BMC o BMD nel genere maschile, a livello di FN, nella fase di crescita o anche in tarda adolescenza (Bonjour *et al.*, 1991; Nieves *et al.*, 2005). Altri studi invece, nonostante non abbiano statisticamente riportato significative differenze di genere per valori di BMC o BMD a livello di FN, hanno comunque riscontrato una tendenza verso valori più elevati di BMC o BMD, nel genere maschile (Grimston *et al.*, 1992; Nieves *et al.*, 2005). I dati discussi invece da Bailey *et al.* (1996), indicano che i ragazzi hanno maggiori valori di BMC a livello di FN a tutte le età, ma che le differenze tra i ragazzi e le ragazze sono chiaramente accentuate solo dopo i 13 anni di età (Bailey *et al.*, 1996; Zemel *et al.*, 2011).

Nei bambini, la statura è strettamente correlata al parametro di BMC fino a 15 anni di età (Bonjour *et al.*, 1991; Hsu *et al.*, 2006), tale correlazione si interrompe dopo che la crescita lineare si conclude (Del Rio *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 2006). Nelle ragazze, dall'età di 14 anni diminuisce la crescita delle ossa lunghe, e dall'età di 16 anni tutte le epifisi ossee si chiudono consolidando il processo di sviluppo nella maggior parte di loro, mentre, la consolidazione del resto dello scheletro continua, così come le spalle e le anche continuano nel loro processo di crescita e quindi di allargamento (Matkovic *et al.*, 1991; Malina *et al.*, 2004).

Matkovic *et al.* (1994) ha condotto uno studio attraverso il quale ha dimostrato che nelle ragazze la statura scheletrica raggiungeva il picco massimo in età compresa da 1 a 7 anni, prima rispetto ai valori massimi di BMC e BMD (a seconda del sito scheletrico). Dai dati messi insieme da Bailey *et al.* (1996) si evince che entrambi, ragazze e ragazzi, raggiungevano circa il 90% della loro statura adulta finale a una velocità di crescita di picco (PHV), mentre invece avevano raggiunto solamente circa il 57% dei loro valori di BMC a livello dell'intero scheletro, in età adulta. Tale studio illustra chiaramente come la maturazione minerale ossea continua anche dopo che la crescita longitudinale sia cessata (Bailey *et al.*, 1996; Rizzoli *et al.*, 2010).

Esiste ancora qualche controversia circa l'età in cui il parametro di PBM viene raggiunto. Per esempio, alcuni studi più recenti indicavano che PBM non si verificava negli individui fino ai 30-39 anni di età (Ringe, 1993), ma dati più recenti indicano che il picco di BMD potrebbe verificarsi invece prima dei 30 anni di età (Lu *et al.*, 1994; Henry *et al.*, 2004). La maggior parte degli studi non mostrano differenze significative di BMC o BMD per la maggior parte dei siti scheletrici dal

trentesimo al cinquantesimo anno di età (Hui *et al.*, 1985); mentre molti altri studi hanno dimostrato una diminuzione di BMD a livello del femore prossimale nel periodo compreso tra 18 e 32 anni di età (Hui *et al.*, 1985; Kalkwarf *et al.*, 2007). Recker *et al.* (1992) conduce uno studio prospettico su giovani donne adulte, in cui viene scoperto che valori di BMC e BMD a livello dell'avambraccio, LS, e resto del corpo, continuavano ad aumentare tra i 18 e i 30 anni di età; tali valori erano invece stabili all'età di 30 anni indicando così che era stato raggiunto il punto massimo di sviluppo di BMC e BMD (Recker *et al.*, 1992; Baxter-Jones *et al.*, 2008).

1.1.3.3 Stato ormonale e acquisizione minerale ossea

I contributi da parte di IGF-1, GH, ormoni tiroidei quali tri-iodotironina (T₃) e tiroxina (T₄), steroidi sessuali quali testosterone, diidrotestosterone, estradiolo, progesterone, cortisolo, e androsterone, variano durante il processo di crescita. L'aumento di BMC durante la fase prepuberale sembra essere largamente dipendente da GH, mentre l'aumento della fase puberale è dipendente anche dagli ormoni sessuali (Geusens *et al.*, 1986; Drake *et al.*, 2003). Gli ormoni estrogeni e il testosterone sono ormoni critici che influenzano la mineralizzazione dell'osso durante l'adolescenza. Gli ormoni androgeni ed estrogeni si pensa abbiano effetti simili sull'osso trabecolare, mentre gli androgeni hanno relativamente un maggiore impatto sull'osso corticale (Geusens *et al.*, 1986; Ehrnborg *et al.*, 2003). Sono presenti anche differenze nella mineralizzazione ossea tra la parte di scheletro assiale (parte dello scheletro che consiste nelle ossa della testa e del tronco) e quella di scheletro appendicolare (porzione dello scheletro che consiste nelle ossa o cartilagine che supportano le appendici, come le articolazioni principali). La parte di scheletro assiale è relativamente più dipendente dagli ormoni sessuali, mentre la porzione di scheletro appendicolare è relativamente più dipendente da GH (Preece *et al.*, 1992; Sotiropoulos *et al.*, 2006). L'importanza degli ormoni sessuali nell'acquisizione minerale ossea durante l'adolescenza, desta particolare preoccupazione nel caso di ragazze adolescenti. Una delle conseguenze documentate sulla carenza di energia a lungo termine (se causata da un ridotto introito calorico come nel caso di anoressia, o da una spesa energetica eccessivamente elevata data da esercizio fisico intenso cronico, o da una combinazione dei due) è un'alterazione del normale ciclo mestruale che porta, in alcuni casi all'amenorrea e riduce marcatamente i livelli di ormoni estrogeni (Loucks & Horvath, 1985; Tartagni *et al.*, 2007). È stato documentato anche il pericolo che la disfunzione mestruale cronica può apportare all'apparato scheletrico in donne di giovane età (Bachrach *et al.*, 1990; Lai *et al.*, 2008). Le stime su quanto sia compromessa la funzione riproduttiva, e sul ciclo mestruale irregolare, oscillano tra il 2-51% in base all'attività sportiva praticata, nelle donne atlete, rispetto a 2-5% nelle donne non atlete (Snow-Harter, 1994; Loucks, 2003). La riduzione dell'andamento della maturazione ossea o perdita

minerale ossea potrebbe avere conseguenze irreversibili. Per esempio, Bachrach *et al.* (1991) ha scoperto che, in soggetti anoressici ricoverati, i valori di BMD a livello di quattro siti scheletrici erano del 56-82% sotto la norma due anni dopo la ripresa del ciclo mestruale regolare e il recupero del normale peso corporeo. Non è stato ancora approfondito l'effetto della restrizione calorica o dell'esercizio intenso a lungo termine sullo stato ormonale dei ragazzi, ma è stato notato un ritardo della pubertà che si è manifestato con valori ridotti di BMD in giovani adulti, indicando che il periodo della pubertà associato ad aumentati livelli di testosterone è determinante per la mineralizzazione ossea nel genere maschile (Finkelstein *et al.*, 1992; Nagasaki *et al.*, 2004).

1.1.4 Sviluppo dell'osso: carico meccanico e attività fisica durante la fase di crescita

Gli effetti esercitati sull'apparato scheletrico da un carico meccanico variabile, come per esempio il "disuso", sono stati riconosciuti per più di un secolo, ma solo negli ultimi 20 anni gli scienziati hanno dimostrato che la variabile intermedia tra il carico meccanico e l'adattamento osseo, è la sollecitazione meccanica indotta (Lanyon, 1973; Ehrlich & Lanyon, 2002). Il carico aumentato si traduce nel cambiamento repentino della curvatura della superficie dell'osso, che a sua volta provoca un segnale di sforzo che attiva la risposta da parte della cellula ossea. Recentemente, è stato indicato che il segnale di sforzo meccanico indotto è amplificato dal flusso fluido interstiziale spinto da regioni più compresse a regioni meno compresse dell'osso durante la fase di curvatura dello stesso (Burr, 1992). La maggior parte degli scienziati suggerisce che l'adattamento dell'osso è un "errore guidato" (Burr, 1992; MacKelvie *et al.*, 2002), il che significa che l'osso non risponderà agli stimoli tranne nel caso in cui percepisca di non essersi adattato al nuovo carico meccanico. Tale condizione implica che l'osso risponderà solo nel caso in cui si presentino determinati tipi di carico. Gli sforzi indotti devono essere sopra o sotto determinati livelli di soglia in modo tale da permettere all'osso di produrre una risposta adattativa. Tale concetto è stato soprannominato "teoria meccanostatica" di Frost, questa sostiene che l'adattamento dell'osso è dipendente dall'ambiente descritto dall'uso di quattro finestre meccaniche specifiche (Frost, 1987; MacKelvie *et al.*, 2002). Ciascuna finestra è definita da soglie di sforzo minimo ed efficace (MES- minimum effective strain). La finestra all'interno della quale è fornito uno stimolo meccanico più basso rispetto a quello adeguato, è chiamata la zona di carico futile o banale, nella quale finestra il processo di rimodellamento sarà il processo predominante associato alla perdita ossea. La zona fisiologica di carico è definita da una soglia più bassa chiamata rimodellamento MES (remodeling minimum effective strain) e da una soglia più alta chiamata modellamento MES (modeling minimum effective strain). All'interno della finestra, lo stimolo del carico meccanico è sufficiente a controllare il processo di rimodellamento, tale che il rimodellamento osseo rimane ad uno stato stazionario, e si

verifica poco o nessun effetto sul ricambio osseo. La zona di sovraccarico si attiva quando i carichi eccedono il punto più alto della zona di carico fisiologico provocando una risposta di modellamento. In tale situazione, l'osso è strutturalmente comandato a rispondere al nuovo livello di richiesta meccanica. Carichi estremamente elevati che inducono tensioni molto forti spingono l'osso all'interno della zona di riparazione, per cui il tessuto osseo non ancora formato produce una risposta simile di adattamento (Frost, 1995; MacKelvie *et al.*, 2002).

Quindi, l'ambiente ormonale alterato nelle ragazze che presentano una disfunzione mestruale potrebbe risultare in una fase di rimodellamento iniziale dello scheletro, anche quando il suo normale uso meccanico non è cambiato. Dovrebbe quindi anche essere enfatizzato che il controllo della massa ossea è localizzato, in quanto le tensioni meccaniche differiscono molto nelle diverse parti dello scheletro, così che ci potrebbe essere una netta perdita di osso o un netto aumento di osso che si verifica contemporaneamente, anche in differenti regioni dello stesso osso. Il potenziale di PA ad elevato impatto influenza positivamente l'acquisizione della massa ossea nei bambini e negli adolescenti rappresentando un argomento di elevato interesse. Come descritto nel modello meccanostatico, le tensioni esercitate sull'osso al di sopra della soglia di modellamento indurranno una risposta di modellamento tale da aumentare la massa ossea e soddisfare le crescenti esigenze del carico. Considerato che questa risposta di modellamento si verifica principalmente durante la fase di crescita, diventa evidente l'importanza di analizzare gli effetti dell'esercizio fisico ad elevato impatto sulla mineralizzazione dell'osso durante gli anni di crescita e sviluppo.

Uno studio riportava un effetto significativo di PA praticata per oltre tre anni sulla maturazione di BMD a livello di LS, femore prossimale, e radio distale, in bambini nella fase precedente la pubertà, ma non in bambini vicini alla fase di pubertà (Slemenda *et al.*, 1994; Rocher *et al.*, 2008). Studi condotti su adolescenti più grandi, mostrano risultati misti. Nei maschi, compresi tra 18-21 anni di età, la pratica di 14 settimane di allenamento militare intenso giornaliero mostrava significativi aumenti di BMC a livello degli arti inferiori in quei soggetti i quali avevano completato l'intero corso di allenamento (Margulies *et al.*, 1989; Duncan *et al.*, 2002). Le attività d'infanzia che in modo preferenziale sollecitano maggiormente una parte del corpo rispetto all'altra, forniscono un modello unico per lo studio dell'effetto del carico meccanico sullo scheletro in via di sviluppo. Considerato che i fattori genetici, nutrizionali, ed endocrini sono condivisi da entrambi gli arti, le differenze della mineralizzazione ossea possono essere attribuite al modello di carico alterato di una specifica disciplina sportiva. Non ci sono studi che mettono a confronto il parametro di BMD tra gruppi di atleti di bambini piccoli, ma piuttosto tra gruppi di adolescenti e giovani adulti; le attività fisiche che coinvolgono relativamente carichi ad elevato impatto sono associate a valori più elevati di BMD.

Uno studio condotto da Grimston *et al.* (1993; Korpelainen *et al.*, 2006) riportava che giocatori adolescenti di calcio, pallacanestro, o pallavolo, presentavano maggiori valori di BMD rispetto al gruppo di controllo e a livello dei siti scheletrici maggiormente sollecitati dall'impatto dell'esercizio, come ad esempio il femore prossimale o il calcagno (Grimston *et al.*, 1993). Sono stati condotti pochi studi prospettici su bambini piccoli per confermare oppure rigettare un eventuale effetto biologicamente importante di PA sulla maturazione minerale dell'osso durante la crescita (Hallal *et al.*, 2006), sebbene il più rigoroso di questi studi, condotto da Slemenda *et al.* (1994), sia certamente di supporto. L'oggetto principale dello studio condotto da Slemenda *et al.* (1994), è quello di identificare gli andamenti di mineralizzazione dello scheletro nei bambini e negli adolescenti, e di individuare i fattori che influenzano tali andamenti. I risultati hanno mostrato che la pubertà attua diversi effetti sulla mineralizzazione dello scheletro dipendentemente dai siti scheletrici, l'osso trabecolare è risultato apparentemente più sensibile ai cambiamenti delle concentrazioni ormonali, la pratica di PA e la normale crescita sono anche correlate positivamente con la mineralizzazione dello scheletro dipendentemente dai siti scheletrici e dalla maturazione sessuale.

Gli studi unilaterali di controllo, che mirano alle attività d'infanzia che in modo preferenziale sollecitano una parte del corpo rispetto all'altra, forniscono la più considerevole dimostrazione che i fattori meccanici locali modulano la mineralizzazione dell'osso durante gli anni di crescita, al di sopra delle considerazioni genetiche. In conclusione, la pratica di PA gravosa e prolungata è sempre stato un fattore determinante della struttura e funzione umana (Bortz, 1985; Gunter *et al.*, 2012). Il corredo genetico degli esseri umani rimane adattato a circostanze che esistevano 10000 anni fa, prima dell'addomesticamento delle piante e degli animali e l'aumento dell'agricoltura (Eaton & Nelson, 1991). Gli esseri umani si sono evoluti come animali attivi progettati per un ambiente che esige elevati livelli di attività. Così, le nostre attuali vite relativamente sedentarie potrebbero essere al passo con il nostro corredo genetico, il quale rimane adattato alle condizioni di un altro tempo (Eaton *et al.*, 1988). Le esigenze di dispendio energetico dell'essere umano sono diminuite nel corso degli ultimi 10000 anni, e il declino è stato maggiormente marcato durante il ventesimo secolo (Blair *et al.*, 1992; Ainslie *et al.*, 2003). Prendendo in considerazione questa differenza dello stile di vita, ci si aspetterebbe che i primi esseri umani avevano una maggiore massa scheletrica e ossature più dense rispetto agli individui di oggi, e studi antropologici hanno confermato tale ipotesi (Larsen, 1987). Nonostante la genetica non provi che la pratica di PA sia necessaria per il benessere dello scheletro, la stessa suggerisce invece che noi stiamo giocando a un gioco pericoloso con il nostro patrimonio genetico, e che non dovremmo dimenticare il ruolo importante che attua il carico

meccanico attraverso la pratica di PA, visto che questo riguarda l'acquisizione minerale dell'osso durante la crescita.

1.1.5 Impatto della ginnastica ritmica sulla crescita dell'osso

L'osso è un tessuto metabolicamente attivo che gode di un costante processo dinamico di formazione e riassorbimento in cui si verifica una stretta cooperazione tra osteoblasti, osteoclasti, e osteociti (Garnero, 2014). Tali processi sono importanti per l'aumento della mineralizzazione ossea durante la crescita e maturazione sessuale (Jurimae, 2010), e anche per il raggiungimento di PBM al fine di fornire una più forte struttura ossea in età adulta (Garnero, 2014). In letteratura è ben conosciuto che il carico meccanico gioca un ruolo importante nello sviluppo dell'osso (Carter *et al.*, 1992). È stato riportato che il carico meccanico generato durante la pratica di PA conduce a miglioramenti dello sviluppo scheletrico (Carter *et al.*, 1996). In studi condotti su soggetti umani, BMD rappresenta un indicatore comune che riflette lo sviluppo osseo e le sue proprietà meccaniche. Secondo uno studio condotto da Jaffre *et al.* (2001), la pratica di RG stimola sia l'attività di riassorbimento che il processo di ricambio dell'osso. Andamenti più elevati di ricambio osseo (turnover osseo) che si verificano maggiormente nelle ginnaste rispetto a gruppi di controllo non allenati, stimolano valori più alti di BMC (Courteix *et al.*, 2007). Gli sport ad elevato impatto fisico aumentano valori di BMD in specifici siti sollecitati dell'apparato scheletrico (Courteix *et al.*, 1999), ed è anche presente una relazione "dose-dipendente" tra i valori di BMD e le ore a settimana in cui viene praticata l'attività sportiva ad elevato impatto fisico (Scerpella *et al.*, 2003). Il carico meccanico esercita il suo impatto su specifici siti dell'apparato scheletrico attraverso FFM e la forza, in quanto il muscolo e l'osso sono biomeccanicamente collegati tra loro (Heinonen *et al.*, 2001). Da uno studio condotto su 89 ginnaste dell'età di 7-8 anni reclutate presso scuole e palestre della città di Tartu (Estonia), emergono interessanti evidenze. I valori di BMD e BMC a livello di FN e LS (L2-L4), sono risultati più elevati nelle ginnaste rispetto al gruppo di controllo. È emerso anche che nelle ginnaste con valori più elevati di BMD e BMC a livello di FN e colonna vertebrale, non si è notata nessuna correlazione tra questi valori e specifici parametri antropometrici (Parm *et al.*, 2011). In tale scenario è quindi possibile osservare che, in seguito a tempi relativamente brevi di pratica (da 1 a 3 anni) di allenamenti intensi, le ginnaste presentavano valori ridotti di FM e valori aumentati di BMC e BMD (Parm *et al.*, 2011). Probabilmente l'allenamento ad alta intensità rappresenta un forte predittore del parametro dell'osso più che i parametri della composizione corporea. Anche lo studio pilotato da Courteix *et al.* (2007) riporta nelle ginnaste rispetto ai gruppi di controllo valori più elevati di BMD e BMC, in tutto il corpo e a livello della colonna vertebrale.

Helge e Kanstrup (2002) hanno condotto uno studio su un gruppo di 17 soggetti sani e di sesso femminile di età compresa tra 15–20 anni. Le ginnaste professioniste (sei artistiche e cinque ritmiche) venivano reclutate dal team della Nazionale Danese, mentre i soggetti di controllo (6 soggetti appaiati per età) venivano reclutati dalla scuola secondaria superiore. Durante lo svolgimento dello studio, Helge ha investigato i valori di BMD nei due gruppi e la correlazione tra BMD e altri parametri come la massima forza muscolare, le concentrazioni degli ormoni sessuali, e lo stato mestruale. La prima scoperta emersa da questa indagine è stata che tre ginnaste artistiche su sei soffrivano di amenorrea, e due ginnaste artistiche e una ritmica soffrivano di oligomenorrea. In questo studio la principale scoperta è stata che i valori di BMD delle ginnaste ritmiche e artistiche Danesi risultavano fortemente correlati alla massima forza muscolare. Inoltre, il parametro di BMD è risultato significativamente più elevato in entrambe le categorie di ginnaste rispetto al gruppo di controllo. Nelle atlete di ginnastica artistica, valori di BMD risultavano superiori rispetto al gruppo di controllo a livello di tutti i siti scheletrici eccetto che per i valori di BMD riferiti all'intero corpo. Nelle atlete di ginnastica ritmica i valori di BMD erano superiori rispetto al gruppo di controllo in ciascun sito scheletrico eccetto che per il radio distale. Mettendo a confronto invece le due categorie di ginnaste (ritmica vs artistica), è emerso che valori di BMD erano superiori solo a livello del radio distale nelle ginnaste artistiche rispetto alle ritmiche, un dato questo che potrebbe fare riflettere sull'elevato effetto osteogenico che le atlete di ginnastica artistica potrebbero sviluppare a livello di mani e braccia, per esempio durante la pratica del volteggio. Valori di BMD risultavano non correlati allo stato mestruale delle atlete. Invece, la correlazione positiva tra massima forza muscolare e BMD potrebbe indicare che il carico dell'esercizio e/o l'attività muscolare coinvolta, sono i fattori principali ad influenzare il parametro di BMD nelle ginnaste di élite appartenenti a questa fascia di età. Quando entrambe le categorie di ginnaste sono analizzate separatamente, si nota la tendenza ad una relazione più stretta tra BMD e massima forza muscolare nel gruppo delle ginnaste artistiche. La correlazione positiva tra BMD e massima forza muscolare non è stata rilevata nei soggetti di controllo quando analizzati separatamente, suggerendo che lo sforzo deve essere molto elevato al fine di stimolare un effetto osteogenico come invece si verifica nelle atlete. È stata osservata in entrambe le categorie di ginnaste anche una significativa correlazione tra, densità minerale ossea dell'intero corpo (WBBMD), densità minerale ossea del collo femorale destro (LFBMD), BMD a livello di LS (L2-L4), e la concentrazione di progesterone in fase follicolare. E ancora, nelle atlete ritmiche la correlazione tra BMD a livello lombare di L2-L4, e gli ormoni estrogeni in fase luteinica. Queste correlazioni potrebbero indicare che le concentrazioni degli ormoni sessuali influenzano valori di BMD nelle ginnaste con disturbi mestruali. E anche che all'interno di un gruppo di atlete che praticano stesso tipo di allenamento e di uguale intensità, la

concentrazione di progesterone potrebbe giocare un ruolo nella formazione dell'osso (Helge *et al.*, 2002).

Tournis *et al.* (2010) indaga su un'ipotesi che desta particolare interesse. Durante il suo studio è stato sperimentato come la pratica a lungo termine e a livello agonistico di RG, potesse esercitare effetti positivi su BMD a livello volumetrico e geometrico dell'osso. E ancora, se l'adattamento dell'osso indotto da esercizio potesse essere associato all'aumentata formazione dell'osso periostale o contrazione midollare, usando la tomografia computerizzata tibiale e marcatori per esaminare il ricambio osseo. Lo studio ha evidenziato che la pratica di RG da parte delle atlete nel periodo pre-menarcale stimolava adattamenti positivi sull'apparato scheletrico, specialmente a livello della corteccia ossea, grazie ad un aumento dei gradi e area di mineralizzazione; mentre la densità minerale ossea volumetrica (vBMD) restava invariata. L'aumentata durata dell'esercizio è quindi stata associata al responso positivo della geometria ossea. Parametri geometrici come la circonferenza periostale e resistenza ossea erano aumentati, fornendo la teoria che la pratica di RG a lungo termine e ad elevata intensità durante gli anni di crescita, potesse indurre benefici alla salute dell'osso. Anche FFM è stata testata e associata positivamente ad entrambi i parametri ossei quantitativi e qualitativi, mentre l'età di allenamento ha mostrato un'associazione simile, ma indipendente dall'età cronologica. Maïmoun *et al.* (2013) è tra gli autori più contemporanei ad avere trattato la correlazione tra pratica di PA e acquisizione della massa ossea.

Maïmoun *et al.* (2013) ha condotto un protocollo di studio su un gruppo di 72 ragazze con età compresa tra i 10 e i 18 anni, suddiviso nel seguente modo: 24 ginnaste ritmiche (attività d'impatto), 24 nuotatrici (attività non d'impatto), 24 soggetti non allenati (gruppo di controllo). In questo studio sono state messe a confronto atlete praticanti due differenti tipologie di sport, entrambi gli sport sollecitavano la struttura scheletrica con uno specifico carico meccanico differente l'uno dall'altro (per esempio, la disciplina di RG è un'attività ad elevato impatto fisico, mentre il nuoto è un'attività che non prevede impatto fisico con il suolo). L'analisi centrale dello studio è basata sul confronto tra le due categorie di atlete vs un gruppo di soggetti non allenati (gruppo di controllo). Nello specifico, l'oggetto principale dello studio è stato quello di confrontare la cinetica di acquisizione della massa ossea tra le atlete femmine adolescenti e il gruppo di controllo durante tutto il periodo della pubertà. Lo studio, basato su modelli misti lineari e dati longitudinali, ha dimostrato che nel caso delle ginnaste, l'effetto osteogenico era caratterizzato dall'acquisizione di una maggiore massa ossea localizzata a livello dell'osso meccanicamente sollecitato (a livello del femore prossimale), durante il periodo del menarca. Inoltre, l'acquisizione di massa ossea durava più a lungo nelle ginnaste, e questo potrebbe essere spiegato con il ritardo della maturazione sessuale. Lo studio condotto da Maïmoun *et al.* (2013) conferma pertanto che

soltanto le attività sportive ad elevato impatto fisico inducono risposte adattative e positive per lo sviluppo scheletrico. Le valutazioni longitudinali condotte in tale studio rinforzano le osservazioni trasversali, dimostrando specifici adattamenti da parte del sito osseo anche quando sottoposto a intervalli di tempo differenti.

1.1.6 La sclerostina come modulatore del metabolismo osseo

La Sclerostina è una glicoproteina monomerica prodotta dal gene *SOST* prevalentemente espressa da osteociti ed è un regolatore della formazione dell'osso da parte degli osteoblasti. La Sclerostina è espressa prevalentemente negli osteociti e, in quantità minori, nei cementociti del dente e nei condrociti (Sharifi *et al.*, 2015). La Sclerostina è altamente conservata tra i diversi vertebrati ed è costituita da 190 aminoacidi con una massa di circa 27kDa. Il prodotto del gene *SOST* è stato trovato anche nella cartilagine, rene, midollo osseo, pancreas, fegato e cuore, così come nella placenta e nella pelle del feto (Kim *et al.*, 2013).

La Sclerostina è stata identificata nello studio di patologie rare con alterazioni alla massa ossea. Poiché la sclerostina è un modulatore negativo della crescita ossea, questo ha portato al concetto che sottoregolazione di sclerostina potrebbe essere efficace nel trattamento dell'osteoporosi (Sharifi *et al.*, 2015). Diversi anticorpi monoclonali sono ora in fase di sviluppo clinico. I dati preliminari mostrano che questi agenti si traducono in un aumento transitorio dei marker di formazione ossea, una diminuzione sostenuta markers di riassorbimento osseo, e un robusto aumento della densità minerale ossea (Appelman-Dijkstra *et al.*, 2016).

Quando la sclerostina si lega al suo recettore sulla membrana cellulare degli osteoblasti, inibisce la via di segnalazione canonica Wnt / β -catenina e riduce la formazione ossea. La via di segnalazione mediata da Wnt comprende due differenti percorsi: canonica, che si traduce in stabilizzazione intracellulare della β -catenina, e non canonica, che è indipendente dalla β -catenina e poco conosciuta (Kim *et al.*, 2013). La via canonica di Wnt è un importante regolatore dell'attività osteoblastica, e porta ad attivazione / stabilizzazione della β -catenina, che trasloca nel nucleo della cellula, attivando fattori di trascrizione che inducono geni bersaglio. L'attivazione del pathway Wnt canonica da ligandi Wnt stimola differenziazione degli osteoblasti, proliferazione e la sopravvivenza, con un conseguente aumento della formazione dell'osso. La sclerostina, inibisce questa via e, inoltre, può anche attivare l'apoptosi caspasi-dipendente negli osteoblasti (Sutherland *et al.*, 2004); pertanto funge da regolatore negativo della crescita ossea.

Normalmente, alti livelli di sclerostina sono associati a situazioni correlate a debolezza ossea e viceversa. Però questo non è sempre vero in quanto la sclerostina è prodotta dagli osteociti e pertanto una buona mineralizzazione ossea, associata ad un alto numero di osteociti attivi può

portare ad alti livelli di sclerostina (Honasoge *et al.*, 2014). Frequentemente l'attività fisica causa una diminuzione dei livelli circolanti di sclerostina (Schwab *et al.*, 2011; Drake e Khosla 2017; Delgado-Calle *et al.*, 2017), ma nel complesso la letteratura riporta dati contrastanti sull'effetto dell'esercizio, che non è necessariamente associato ad una diminuzione dei livelli di sclerostina (Fazeli *et al.*, 2013; Drake & Khosla 2017) come invece lo è l'inattività (Honasoge *et al.*, 2014). Inoltre, anche l'età gioca un ruolo importante, in quanto nei bambini e adolescenti è stato osservato che i livelli di sclerostina non sono necessariamente associati negativamente alla mineralizzazione dell'osso (Fazeli *et al.*, 2013; Tsentidis *et al.*, 2015). Queste osservazioni indicano che il ruolo della sclerostina sul metabolismo dell'osso può essere più complesso di come a volte viene presentato.

1.2. AUTOFAGIA

L'autofagia è un processo catabolico che aiuta a mantenere l'omeostasi cellulare durante lo stress metabolico o durante la privazione di nutrienti riciclando organuli cellulari e proteine danneggiate. È un processo critico per tutte le cellule in cui proteine e organuli danneggiati o vecchi vengono rimossi. L'autofagia coinvolge la fagocitosi di porzioni di citoplasma e proteine da parte di autofagosomi, che si formano tramite la fusione e la degradazione dei lisosomi. I prodotti di degradazione servono come mattoni per la sintesi proteica e la produzione di energia. L'autofagia quindi è basilamente un meccanismo di sopravvivenza cellulare. In alcune situazioni però, un suo eccesso può risultare dannoso e portare anche alla morte della cellula. È evidente perciò che la regolazione dell'autofagia è un processo estremamente importante per la cellula (Mizushima *et al.*, 2011).

Christian de Duve, nel 1963, fu il primo ricercatore che osservò il fenomeno per il quale le cellule sono in grado di digerire i propri organuli e parti del proprio citoplasma; a questo fenomeno, più tardi, venne dato il nome di **“autofagia”**, letteralmente “mangiare se stessi”. De Duve inoltre, intuì, che le membrane di sequestro delle componenti cellulari da degradare fossero membrane preformate, non sintetizzate ex novo, originate dal reticolo endoplasmatico liscio. Oggi è noto che questa non è l'unica origine.

L'autofagia è un processo fisiologico, che consiste nella degradazione di componenti cellulari da rimpiazzare come proteine, aggregati citoplasmatici di varia natura ed organuli, che saranno sequestrati in vescicole con doppia membrana indirizzate ai lisosomi nel caso di cellule animali o ai vacuoli nel caso di cellule vegetali e lieviti, per essere idrolizzate con opportune reazioni enzimatiche. L'autofagia è un processo che si è evolutivamente conservato in tutti gli organismi eucarioti; è regolato dalla presenza di geni ATG (**Autophagy-related-genes**), descritti per la prima volta in lievito e di cui successivamente sono stati identificati degli ortologhi in cellule di

mammifero (Yang *et al.*, 2010).

Ci sono tre forme di autofagia morfologicamente distinte: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediata da chaperonine (Duffy *et al.*, 2015). La Macroautofagia è la forma predominante e si distingue per la presenza di vescicole con membrane a doppio strato, note come autofagosomi, che incapsulano gli organuli citoplasmatici e le proteine marcate per il riciclaggio e la successiva fusione con lisosomi per degradarne i contenuti. Le altre due forme di autofagia, microautofagia e chaperone-mediata, sono caratterizzate rispettivamente da: invaginazioni della membrana attorno alle proteine danneggiate e un processo specifico che coinvolge la traslocazione delle proteine target attraverso la membrana lisosomiale. La macroautofagia sarà qui di seguito indicata semplicemente come autofagia. Esistono poi due tipi di macroautofagia: **selettiva** e **non selettiva**. Quella selettiva è responsabile della degradazione di specifiche proteine, organelli cellulari e microrganismi invasori; avviene costitutivamente e può anche essere indotta in risposta a stress cellulari di varia natura. L'autofagia non selettiva o *basale*, invece, è responsabile, almeno in parte, alla sintesi di macromolecole e produzione di energia, inoltre agisce come macchinario per il controllo di qualità delle componenti citoplasmatiche, ed è importante per garantire l'omeostasi di varie cellule.

Il processo di autofagia prevede diversi passaggi distinti. Questi includono (1) induzione della via, (2) selezione degli organuli e delle proteine bersaglio, (3) nucleazione della vescicola, (4) espansione e completamento dell'autofagosoma, (5) recupero e riutilizzo dei componenti cellulari, (6), targeting del lisosoma e fusione con la membrana e (7) degradazione e riciclaggio dei contenuti cellulari.

1.2.1 Autofagia ed esercizio fisico

Tutte le cellule dell'organismo hanno un loro livello basale di autofagia importante per il mantenimento dell'omeostasi e il turnover di organuli e proteine. Durante l'esercizio fisico una serie di fattori come stress metabolico, stress ossidativo e sbilanciamento dell'omeostasi di ioni come il Calcio, possono portare a un aumento dei livelli cellulari di autofagia, che rappresenta una risposta adattativa essenziale per il mantenimento della vitalità cellulare in situazione di stress. A questo proposito è interessante osservare che diverse malattie degenerative sono proprio caratterizzate da un insufficiente livello di autofagia (Grumati *et al.*, 2010).

L'attivazione dell'autofagia associata all'esercizio è nota da diversi decenni (Salas *et al.*, 1980; Salminen *et al.*, 1984), ma solo di recente è risultato evidente il ruolo dell'autofagia in numerosi

benefici conseguenti all'attività fisica (Vainshtein *et al.*, 2016). Oggi è evidente che l'attivazione del processo autofagico è necessaria per un corretto adattamento dell'organismo all'esercizio ed è stata mostrata un'aumentata espressione di proteine coinvolte nell'autofagia non solo nel muscolo, ma anche in numerosi altri organi. Infatti, l'attivazione di autofagia in risposta all'esercizio è stata osservata nel muscolo, cuore, fegato, tessuto adiposo, pancreas, osso e anche nel cervello (He *et al.*, 2012; Lira *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016), dove si ritiene possa avere un ruolo nell'azione neuroprotettiva dell'esercizio fisico (Zhang *et al.*, 2013). Questa risposta globale all'esercizio è una conferma di come l'attività fisica sia un processo che coinvolge interamente l'organismo e l'importanza dell'autofagia nei benefici indotti dall'esercizio cronico è ora ampiamente dimostrata (figura 1.5).

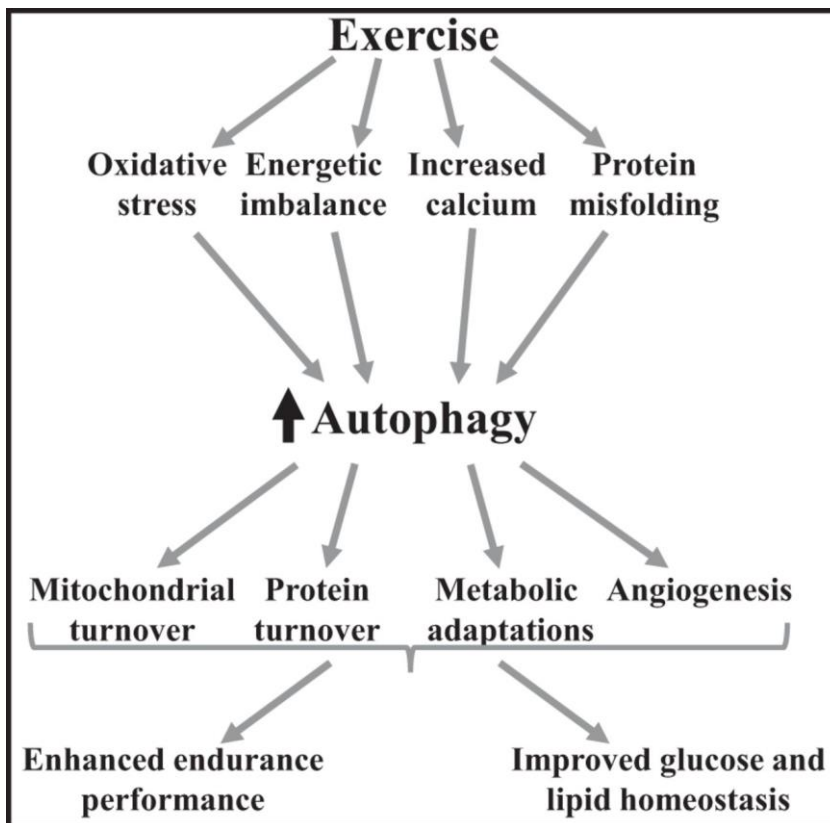


Figura 1.5. Adattamenti all'esercizio che sono potenziati dall'autofagia (da Vainshtein, and Hood *J Appl Physiol* 2016;120:664-673)

Per quanto riguarda i meccanismi responsabili dell'attivazione del processo, occorre considerare che la contrazione muscolare rappresenta una forma di stress energetico che può essere paragonato alla privazione di nutrienti. Questo stress porta ad un disequilibrio dei livelli di numerose molecole

implicate nei processi di segnalazione cellulare, come AMP, NAD⁺, ione Calcio e ROS. Questi segnali sono in grado di influire su diverse vie di segnalazione cellulare, portando alla risposta autofagica che ha il compito di preservare l'omeostasi cellulare (Vainshtein *et al.*, 2016). In questo processo hanno un ruolo importante sensori metabolici, come mTOR che segnala l'abbondanza di nutrienti e mantiene basso il livello di autofagia o la proteina chinasi attivata da AMP, AMPK, che invece segnala l'aumento della richiesta energetica (Hardie, 2011) e attiva il processo. Nell'esercizio sono attivati anche diversi altri sensori di stress, come le sirtuine, specialmente SIRT1, e p38 MAPK, che a loro volta portano all'attivazione dell'autofagia (Vainshtein *et al.*, 2016).

Nella prima fase di attivazione del processo, un ruolo importante è quello del complesso ULK (unc-51-like chinasi), composto da Atg13 (autophagy-related gene 13), ULK1 / 2, e family-interacting protein (FIP200). Queste componenti sono tutti necessari per l'avvio della formazione dell'autofagosoma. In normali condizioni metaboliche, mTOR fosforila Atg13, disgregando il legame di ULK1, ULK2, e FIP200. Secondo un modello, probabilmente semplicistico (Yang, 2010; Mizushima, 2011), mTOR regola segnali di stress metabolico per guidare la crescita e sviluppo cellulare quando c'è l'abbondanza di nutrienti e inibisce l'autofagia in condizioni normali. A monte di mTOR abbiamo la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K). La PI3K di classe I riceve a monte segnali di fattori di crescita e facilita la fosforilazione della chinasi Akt, attraverso PDK1. Una volta che Akt è fosforilata, mTOR è attivato e inibisce l'autofagia. Quando l'energia cellulare scarseggia, l'enzima AMPK viene attivato, causando l'inibizione di mTOR e l'attivazione conseguente del complesso ULK e l'inizio della formazione dell'autofagosoma. Segnali dal complesso chinasi ULK1 sono critici per la progressione della dell'autofagia negli step successivi. Questi segnali danno inizio al legame della vacuolar sorting protein 34 (Vps34) con beclin-1, un promotore dell'autofagia, per formare il complesso beclin-1. Il complesso Beclina-1 recluta altre proteine Atg per guidare i primi passi della formazione dell'autofagosoma. La funzione della beclin-1 può essere soppressa o attivata tramite diversi legami con altre molecole partner, tra cui da Bcl-2 e la proteina p53, che legano il processo autofagico ai meccanismi di morte e sopravvivenza cellulare (Yang, 2010; Mizushima, 2011). La figura 1.6 schematizza le principali vie di segnalazione coinvolte nell'attivazione dell'autofagia durante l'esercizio fisico.

Lo stress cellulare conseguente all'esercizio è presente anche in altri organi oltre al muscolo, per quanto riguarda l'attivazione globale del processo autofagico però, probabilmente ha importanza anche il cambiamento dell'assetto ormonale che si instaura nel corso dell'attività fisica e che segnala all'intero organismo la richiesta di energia e la necessità di risposte adattative (He *et al.*, 2012).

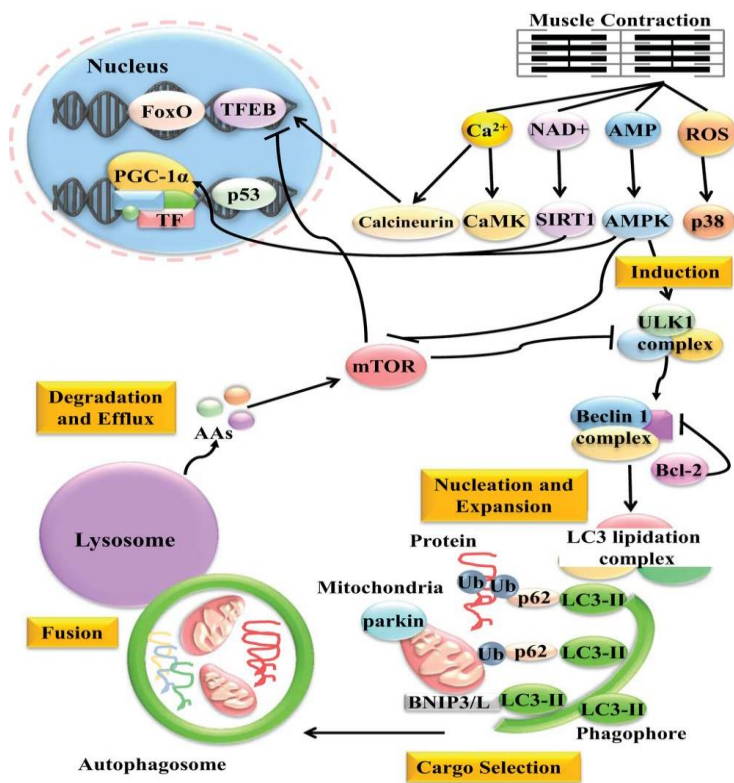


Figura 1.6. Principali vie di segnalazione cellulare coinvolte nell'attivazione dell'autofagia nell'esercizio fisico. (da Vainshtein, and Hood *J Appl Physiol* 2016;120:664-673)

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1. PREMESSE

E' ampiamente dimostrato che l'esercizio fisico porta svariati benefici all'intero organismo. Tra questi un ruolo particolarmente importante è quello legato al mantenimento della funzionalità ossea e del corretto metabolismo osseo. Fattori fondamentali per garantire la salute dell'osso. In questo lavoro abbiamo studiato alcuni aspetti cellulari e biochimici che stanno alla base degli effetti dell'esercizio sull'osso. In particolare ci siamo occupati dell'azione della citochina sclerostina. Questa ricerca è nata in seguito ad alcune osservazioni fatte "sul campo" in quanto sono stati osservati alti livelli ematici di sclerostina in giovani ginnaste in età prepuberale praticanti ginnastica ritmica, fatto che può sembrare in contrasto con il ruolo biologico della sclerostina, che è un attivatore del riassorbimento osseo e un inibitore della mineralizzazione, suggerendo che l'esercizio sia in grado di "neutralizzare" il segnale negativo sul metabolismo dell'osso dovuto ad alcuni effettori ormonali catabolici. Pertanto abbiamo voluto approfondire alcuni aspetti dell'azione della sclerostina, utilizzando un modello cellulare *in vitro*, per cercare di dare un contributo alla conoscenza di alcuni meccanismi biochimici che sono alla base di processi come l'osteogenesi e il rimodellamento osseo, strettamente associati alla salute dell'osso.

2.2. METODI

2.2.1 Colture cellulari

Negli esperimenti *in vitro* sono state utilizzate cellule SaOS2 routinariamente utilizzate nel nostro laboratorio. Questa linea cellulare, deriva originariamente da un osteosarcoma di una bambina caucasica di 11 anni. Le SaOS2 sono cellule osteogeniche con diverse caratteristiche di osteoblasti indirizzati verso il differenziamento in osteociti e rappresentano un buon modello per studiare svariati aspetti associati agli osteoblasti e al loro differenziamento in osteociti (Prideaux et al 2014). Le cellule erano mantenute a 37 °C in una atmosfera umidificata contenente 5% CO₂.

Il terreno che viene utilizzato per questo tipo di colture è l'EMEM arricchito con 10% di siero fetale bovino (Sigma), 1% di glutammina (Sigma), 1% di antibiotici (Sigma) come streptomina e

penicillina, 1mM Sodio Piruvato (Merk), 1mM Bicarbonato di Sodio (Sigma). Con l'utilizzo di una pipetta da 2ml, in ognuna delle piastre petri, si semina 1 ml di sospensione cellulare descrivendo con il puntale una traiettoria spiraliforme: in tal modo le cellule saranno seminate omogeneamente su tutta la superficie della petri. Per facilitare maggiormente la distribuzione omogenea delle cellule, bisogna agitare ogni petri con movimenti ampi e rotatori sul piano. Dopo 4 gg dalla semina viene cambiato il terreno e dopo altri 3 gg sono "splittate". L'osservazione delle cellule viene fatta con l'ausilio di un microscopio ottico ponendo la petri di semina sul carrello porta oggetto e partendo dall'obiettivo a più grande ingrandimento in modo tale da permettere una visione panoramica del preparato. Tale analisi risulta fondamentale per accertare la qualità del materiale seminato (su cui svolgere gli esperimenti), in cui potrebbero essere presenti visibili eventuali inquinanti come batteri o ife di muffe.

2.2.2 Differenziamento

Per stimolare il differenziamento osteogenico, le cellule SaOS2 erano seminate in piastre Petri in uno specifico terreno di differenziamento che consiste in EMEM implementato con acido ascorbico-2-fosfato 0,2 mM, beta-glicerolfosfato 10 mM, desametasone 10 nM (Müller et al 2013). Il terreno veniva cambiato ogni tre giorni.

Per determinare l'attività della fosfatasi alcalina, abbiamo utilizzato il metodo normalmente usato nel nostro laboratorio (Cappadone et al 2015). Pertanto, le cellule erano raccolte e lavate in 0.9% NaCl e raccolte centrifugando 3 min a 3.000 rpm. Il pellet cellulare era risospeso in Hepes 40 mM pH 8,0, NaCl 110 mM, 0.25% deossicolato, 1% aprotinina. Dopo tre cicli di gelo/sgelo, l'omogenato era centrifugato a 12.000 rpm per 10 min. 10 µl di sovrantante erano saggiati in un volume di 200 µl contenente 270 mM mannitolo, MgCl₂ 4 mM, Tris 0,1 M, sodio azide 0,05% e 8 mM p-nitrofenilfosfato. I campioni venivano incubati 10 min a 37°C e veniva letta l'assorbanza a 405 nM.

Per valutare la deposizione di Sali di Calcio, è stato usato il colorante alizarin red (Gregory et al 20014; Johnson et al 2001). Le cellule erano lavate 3 volte in PBS e fissate con EtOH 70% freddo per 1 h a 4°C. Dopo 3 lavaggi con acqua bidistillata, era aggiunta una soluzione di alizarin red 40 mM a pH 4,2 per 15 min in agitazione. Seguivano 5 lavaggi in acqua bidistillata e uno finale in PBS per 15 min in agitazione. A questo punto le piastre potevano essere fotografate direttamente, oppure era possibile esaminare al microscopio le cellule, per visualizzare i depositi salini colorati in rosso.

2.2.3 Livelli di sclerostina

La presenza della sclerostina negli estratti cellulari è stata valutata mediante Western blotting, utilizzando un anticorpo primario R&D Systems (Human SOST/Sclerostin MAb - Clone 220902). I livelli di sclerostina nel sovrnatante delle cellule sono stati misurati quantitativamente mediante enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Cloud-Clone Corporation, Houston, TX, USA). I dati forniti dal produttore indicano che limite di rilevabilità è 0.1 pmol/l, e i coefficienti di variabilità <10 % (intra-assay) e <12 % (interassay).

Il medesimo kit ELISA è stato utilizzato per il dosaggio della sclerostina in campioni ematici fornitici nell'ambito di una collaborazione con ricercatori dell'Università di Tartu (Estonia). Il dosaggio ha riguardato campioni di plasma ottenuti da 32 giovani ginnaste di alto livello e altrettante coetanee di controllo, tutte di età compresa tra 9 e 10 anni. È poi stato effettuato anche un follow-up a un anno di distanza. L'analisi statistica sui risultati dei dosaggi di sclerostina è stata eseguita utilizzando il programma SPSS 20.0 e il livello di significatività era posto a $p < 0,05$. Per i dettagli sui soggetti partecipanti all'esperimento si rimanda a Jürimäe et al 2016, dove sono riportate le caratteristiche dei soggetti e i dati antropometrici, tutti determinati a Tartu.

2.2.4 Trattamenti

Tutti i composti idrosolubili, come le poliamine spermina e spermidina, erano sciolti in PBS. I composti organici con scarsa solubilità in ambiente acquoso venivano sciolti in dimetilsolfossido (DMSO). Come regola generale, venivano preparate soluzioni concentrate 1000 volte rispetto alla concentrazione desiderata. I trattamenti venivano quindi diluiti in modo da aggiungere alle colture un volume pari allo 0,1% del totale. I controlli ricevevano un eguale volume di veicolo.

I trattamenti duravano un tempo variabile e al termine dell'incubazione le cellule venivano prelevate per le opportune determinazioni. Gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte. I risultati degli esperimenti *in vitro* normalmente sono espressi come medie \pm S.E.M (Standard Error of the Mean) ottenute nel numero indicato di esperimenti. L'analisi dei dati era effettuata mediante il programma GraphPad Prism 6. Le differenze erano considerate significative adottando un livello di probabilità minore del 5% ($p < 0,05$).

La sclerostina umana ricombinante era della R&D Systems; La BMP2 umana ricombinante era della Sigm-Aldrich, così come resveratrolo, sirtinolo e metformina.

2.2.5 Analisi di proteine tramite Western blotting

Al termine degli esperimenti, le cellule erano raccolte nel tampone di lisi (Lysis Buffer composto da 50 mM di NaCl, 0,25% di Sodio Desossicolato, 1% Np40, 1 mM NaF, 1 mM EGTA, 1 mM di Fenilmetilsolfonilfluoruro, 1 mg/ml di Aprotinina, Leupeptina e Pepstatina) e sottoposti a tre cicli di congelamento/scongelo. Successivamente vengono centrifugati a 12000 RPM per 15 minuti a 4°C. Il sovrantante veniva conservato a -20°C fino al momento dell'analisi.

La quantità di proteine totali contenute nel campione era determinata secondo il metodo di Bradford. Il reattivo di Bradford è composto dal colorante Comassie Brilliant Blue G250 sciolto in etanolo 0.5% e in acido ortofosforico 85% , il tutto diluito in acqua distillata.

Per preparare i campioni da caricare sul gel per SDS-PAGE, tutti i campioni erano portati alla stessa concentrazione proteica e veniva aggiunto il tampone di carica (Loading Buffer 4X concentrazione finale: 3% SDS, 10% di glicerolo, 4% di 2-mercaptoetanololo, 0,02% di Blu di Bromofenolo, tris HCl 125 mM, pH 6.8). Successivamente i campioni erano bolliti per 4 minuti per denaturare le proteine. Si preparano lo Stacking gel di impaccamento a concentrazione fissa di acrilammide, che viene polimerizzato con un pettine per creare i pozzetti, e il Running gel di corsa con una percentuale variabile (da 6 al 15 %) di acrilammide in base al peso molecolare delle proteine che vogliamo isolare. Ogni campione viene caricato in un pozzetto dello Stacking gel, e viene effettuata una corsa elettroforetica a 130 V per 60-70 minuti. I pesi molecolari delle proteine sono stati determinati mediante marcatori con peso molecolare standard (Sigma) caricando un volume costante di 4µl nel primo pozzetto. Al termine della corsa, si trasferiscono le proteine dal gel a una membrana di nitrocellulosa per il trasferimento. Per ottenere una resa ottimale, la temperatura deve essere mantenuta bassa, di conseguenza l'intera procedura di blotting è effettuata in ghiaccio. Terminato il "blotting", per verificare l'effettiva riuscita della procedura, si utilizza il Rosso-Ponceau che colora in modo reversibile tutte le proteine migrate sulla membrana. Si rimuove il Rosso-Ponceau lavando con TBS 1X per qualche minuto in agitazione. A questo punto la membrana viene saturata in latte allo 0,5% (sciolto in TBS1X con TWEEN20) per 60 minuti. Quindi vengono eseguiti 3 lavaggi della membrana con TBS1X contenente TWEEN20 e successivamente la nitrocellulosa viene incubata over-night con l'anticorpo primario, in camera fredda a +4°C, agitando molto lentamente. Al termine di questa incubazione si effettuano tre lavaggi con TBS1X/TWEEN20. Si prepara, poi, l'anticorpo secondario anti-IgG coniugato con l'enzima perossidasi (Sigma) generalmente con una diluizione di 1:2500 in latte al 3% e si procede con l'incubazione per un'ora sempre agitando lentamente. Finita questa seconda incubazione, si eseguono 2 lavaggi con TBS1X con TWEEN20 e 1 con TBS 1X. A questo punto si ricopre la nitrocellulosa per 1 minuto con il

reagente per lo sviluppo di chemiluminescenza (Luminata-Crescendo Western HRP Substrate, Millipore), che viene poi visualizzata con lo strumento ChemiDoc MP (BIO-RAD).

Gli anticorpi diretti contro AMPK α 1/ α 2, phospho-AMPK α 1/ α 2 (Thr172) e LC3 erano della Cell Signaling.

2.2.6 Analisi delle poliamine

Per quanto riguarda l'analisi delle cellule, alla fine dell'esperimento venivano raccolte e poi lavate 2 volte con aliquote di 20ml di PBS raffreddato in ghiaccio. Il pellet che si ottiene viene risospeso in 0.4ml di acido perclorico 0.3M freddo e sottoposto a 2 cicli di congelamento e scongelamento. Dopo la centrifugazione a 12.000g per 5 minuti, 0.3 ml di sovrantante limpido erano usati per l'analisi delle poliammine, mentre il pellet veniva sospeso in 0.4 ml di Na OH 0.3N per la determinazione delle proteine. Le poliammine erano determinate mediante HPLC dopo derivatizzazione con cloruro di dansile, secondo il metodo standard utilizzato nel laboratorio (Stefanelli et al 1998), seguita da separazione cromatografica e determinazione UV a 360 nm..

2.2.7 RNA Interference

Per ottenere il silenziamento dell'enzima AMPK, abbiamo impiegato il protocollo in uso nel nostro laboratorio (Passariello et al 2012). Le cellule da trasfettare vengono fatte crescere e portate ad una confluenza del 50% . Viene tolto il terreno EMEM in cui sono cresciute, viene eseguito un lavaggio con PBS poi vengono eseguiti due lavaggi con un medium di trasfezione Transfection Medium (Santa Cruz). Per la preparazione della miscela di trasfezione (liposomi + siRNA), si preparano separatamente due soluzioni distinte successivamente mescolate tra loro: una serve per costruire i liposomi, l'altra contenente il siRNA. Le cellule vengono trasfettate con una concentrazione finale di siRNA di 100 nM per 24 ore grazie all'impiego di Transfection Reagent (Santa Cruz) come da protocollo fornito dal produttore. Dopo ulteriori 24 ore segue il cambio di medium e le cellule sono trattate. Le sequenze utilizzate per inibire l'espressione delle isoforme α 1 e α 2 della subunità catalitica di AMPK sono descritte da Passariello et al (2012) ed erano state sintetizzate da Sigma Genosys: per AMPK α 1, 5'-CUUAUUGGAUUUCCGAAGUTT-3'; per AMPK α 2, 5'-GACAUUAUGGCGGAGGUGUTT-3'. Il "Control siRNA-A", cioè una sequenza di controllo senza bersaglio, è stata acquistata dalla Santa Cruz Biotechnology.

2.2.8 Apoptosi e morte cellulare

La vitalità cellulare è determinata con il metodo di esclusione del Trypan Blue dalle cellule. I campioni sono allestiti in triplicato e vengono contate le cellule per ogni campione in almeno 4

campi. La sopravvivenza è calcolata come la percentuale di cellule vitali in campioni sottoposti a trattamenti rispetto al numero di cellule vitali dei controlli.

L'attività delle caspasi è stata misurata valutando la digestione di un peptide fluorogenico come substrato. Il peptide utilizzato è l'Ac-DEVD-AMC, cioè Acetil-aspartato-glutamato-Valina-aspartato-Amidometilcumarina, secondo il metodo standardizzato nel nostro laboratorio (Stefanelli et al 2001). La rottura proteolitica a livello del residuo di acido aspartico terminale provoca la liberazione dell'Amidometilcumarina, che può essere determinata con l'impiego di uno spettrofluorimetro, impostando le lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione rispettivamente di 370 nm e 455 nm. La sequenza DEVD è il substrato ottimale della caspasi-3, la principale caspasi effettrice, ma anche di altre caspasi, come la -2 e la -6. Poiché questo peptide viene attaccato anche da altri membri della famiglia delle caspasi, l'attività viene genericamente indicata come attività caspasicca. Per misurare l'attività caspasicca, si centrifugano le cellule a 1100 RPM per 5 minuti a 24-26°C. Si elimina il sovrnatante e al pellet ottenuto si aggiungono 100 µl di tampone di lisi composto da HEPES 20 mM a pH 7, ditiotreitolo (DTT) 5 mM, EDTA 2 mM, CHAPS 0,1%, TRITON 0,1% e contenente anche i seguenti inibitori di proteasi: fenilmetilsolfonilfluoruro (PMSF) 1 mM ed 1 µg/ml di aprotinina, pepstatina e leupeptina. Si trasferiscono i campioni in ghiaccio per 15 minuti, le cellule sono sottoposte a due cicli di congelamento/scongelo per rompere le membrane cellulari. I lisati sono poi stati centrifugati 10 minuti a 12000 rpm a 4°C ed il sovrnatante veniva conservato a -20°C fino al momento dell'analisi. Per misurare l'attività enzimatica, un volume di 10µl di estratto è mescolato con 20 µl di una miscela di saggio contenente HEPES 100 mM a pH 7, CHAPS 0,1%, saccarosio al 10% e Ac-DEVD-AMC 0,15 mM. I campioni, preparati in provette di plastica dal volume totale di 4 ml, sono quindi stati incubati a 37°C per 15 minuti. I bianchi contengono 10µl di tampone di lisi. Alla fine dell'incubazione, la reazione è stata arrestata, mettendo le provette in un bagno di acqua e ghiaccio e aggiungendo a ciascun campione 0,1 ml di una soluzione al 2% di sodio acetato in acido acetico 0,2 M. I campioni sono poi diluiti con 2,5 ml di acqua e la specifica digestione del substrato Ac-DEVD-AMC da parte delle caspasi è stata misurata allo spettrofluorimetro ottenendo un valore che corrisponde all'attività specifica dell'enzima, espressa in moli/minuto per mg di proteina. Una unità (U) corrisponde all'attività enzimatica che idrolizza una nmole di substrato per minuto

Le cellule apoptotiche sono state identificate da caratteristiche nucleari tipiche dell'apoptosi, la contrazione nucleare e / o la frammentazione, condensazione della cromatina (Robertson et al 2000), in seguito a con il colorante DAPI. Per questa determinazione, le cellule crescono sopra vetrini circolari di diametro di circa 1 cm; alla fine degli esperimenti, vengono lavate 3 volte con PBS e poi fissate con paraformaldeide al 4% per 15 min. Le cellule sono quindi permeabilizzate con

triton x100 0,1% per 10 min. Dopo 3 lavaggi in PBS, i nuclei sono colorati con DAPI (1:1000 in PBS) per 15 min. Le immagini dei nuclei apoptotici sono state acquisite tramite microscopio invertito a fluorescenza (IX50 Olympus, Tokio, Japan).

2.2.9 Autofagia

Il grado di espressione e le modificazioni della proteina LC3 (marcatore di autofagia) sono stati valutati attraverso la tecnica del Western Blotting; 50 µg della proteina vengono processati. Sono utilizzati per questa tecnica anticorpi monoclonali contro le forme di LC3-I e LC3-II (Cell Signalling Technology).

Per l'identificazione delle cellule autofagiche abbiamo trasfettato cellule con il vettore virale BacMam (insect **B**aculovirus whit a **M**amalian promoter) prodotto da Invitrogen® e composto da un promotore specifico per cellule di mammifero e un gene codificante LC3B fuso con GFP.

Per fare questo, abbiamo seminato e lasciato crescere in incubatore per 3 giorni le cellule fino a raggiungere una confluenza del 60%. Le cellule sono poi state trasfettate con il vettore virale seguendo le istruzioni del produttore. Dopo circa 8 ore dal momento della trasfezione è stato messo medium fresco e le colture sono state poi incubate overnight (>16h). Al mattino successivo le cellule sono state trattate. Alla fine dell'incubazione, sono state acquisite le immagini di tutte le colture tramite microscopio a fluorescenza Olymus 1x50 utilizzando una fotocamera Camedia Olympus digital camera C3030 Zoom.

2.3. RISULTATI

E' ben noto che l'osso è sottoposto a un processo continuo di formazione e riassorbimento, la cui dinamica è fondamentale per il suo sviluppo e mantenimento, anche in funzione dell'età e delle necessità dell'organismo. Lo sbilanciamento di questo equilibrio può portare a una ridotta funzionalità dell'osso e a patologie come l'osteoporosi. Un'abbondante letteratura ha dimostrato che l'esercizio fisico regolare favorisce la mineralizzazione ossea e, in generale, la salute dell'osso. In particolare, la pratica di sport d'impatto, con frequenti salti e conseguenti ricadute, durante il periodo della crescita, è in grado di massimizzare l'aumento di massa ossea (Rizzoli et al 2010).

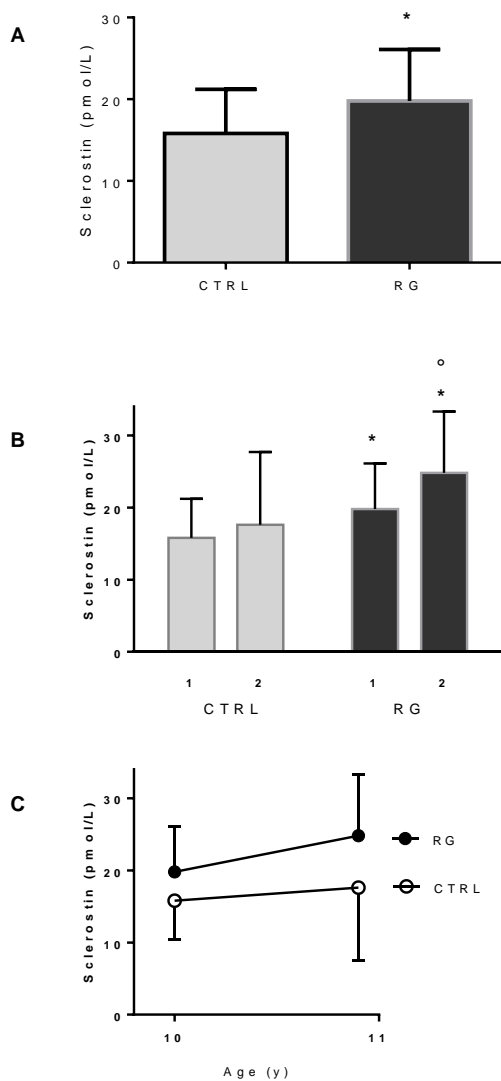


Figura 2.1. A. Concentrazioni di sclerostina nel plasma di giovani atlete praticanti ginnastica ritmica (RG, n=32) e in coetanee di controllo non praticanti attività fisica regolare (Ctrl, n=32). * $p < 0,05$. B. Concentrazioni di sclerostina nel plasma negli stessi soggetti del pannello A a un anno di distanza. RG, n=31; Ctrl, n=21.). * $p < 0,05$ rispetto ai controlli; ^o $p < 0,05$ rispetto al dosaggio precedente. C. Sono riportati gli stessi dati del pannello B, per evidenziare il differente cambiamento nel tempo nei due gruppi.

Tra i diversi sport che favoriscono la mineralizzazione ossea, la ginnastica ritmica ha un effetto importante. Il laboratorio dove ho svolto buona parte del lavoro, da alcuni anni collabora con l'università di Tartu, in un progetto che vuol definire la relazione tra l'assetto ormonale conseguente all'esercizio e la composizione corporea in giovani atlete (Passariello et al 2010; Gruodyte et al 2010; Jürimäe et al 2011; Jürimäe et al 2016). In questi studi, quando sono stati valutati gli indici associati alla mineralizzazione ossea, le giovani praticanti ginnastica ritmica hanno sempre mostrato valori di densità minerale ossea significativamente maggiori rispetto alle coetanee di controllo

(Grudyte et al 2010; Jürimäe et al 2016). Nella fase più recente di questa ricerca, è stato studiato anche il ruolo dell'attività fisica sui livelli di sclerostina, in quanto questo ormone è uno dei più importanti regolatori del metabolismo osseo. Il dosaggio della sclerostina nei campioni di plasma ottenuti dal sangue di 32 giovani ginnaste di alto livello e altrettante coetanee di controllo, tutte di età compresa tra 9 e 10 anni, ha rappresentato il mio primo approccio con il laboratorio di biochimica in cui ero appena approdata e ha fornito risultati interessanti, riportati nella figura 2.1A. I livelli ematici di sclerostina erano significativamente più alti nelle ginnaste rispetto al gruppo di controllo. Questo dato a prima vista può sembrare in contrasto con il ruolo biologico che si ritiene abbia la sclerostina (Drake e Khosla 2017; Delgado-Calle et al 2017). La sclerostina infatti è un attivatore del riassorbimento osseo e un inibitore della mineralizzazione, per cui dovrebbe essere inversamente correlata al grado di mineralizzazione. In effetti, i parametri di mineralizzazione ossea dei soggetti studiati, determinati nell'università di Tartu e riportati da Jürimäe et al (2016), indicano una maggiore mineralizzazione nelle ginnaste rispetto ai controlli: la densità minerale ossea a livello della spina lombare e del collo del femore era significativamente più alta (di circa il 15%) nelle giovani ginnaste rispetto alle coetanee di controllo; così come era maggiore quella complessiva "total body". È da notare che questa differenza può sottostimare l'effetto dell'esercizio, in quanto le 32 ginnaste erano tutte nello stato prepuberale (stadio di Tanner 1), mentre tra le coetanee di controllo solo 12 erano prepuberi mentre le altre 20 mostravano i primi segni della pubertà (Tanner 2 o 3), fase in cui aumenta la densità di massa ossea.

Per quanto riguarda l'apparente contrasto tra livelli di sclerostina circolante e dato di densitometria ossea rilevato, però, bisogna osservare che la sclerostina è prodotta dagli osteociti. Pertanto una buona mineralizzazione ossea, associata ad un alto numero di osteociti attivi può portare ad alti livelli di sclerostina (Honasoge et al 2014). Inoltre, in effetti la letteratura riporta dati contrastanti sull'effetto dell'esercizio, che non è necessariamente associato ad una diminuzione dei livelli di sclerostina (Fazeli et al 2013; Drake e Khosla 2017) come invece lo è l'inattività (Honasoge et al 2014). Inoltre, anche l'età gioca un ruolo importante, in quanto nei bambini e adolescenti è stato osservato che i livelli di sclerostina non sono necessariamente associati negativamente alla mineralizzazione dell'osso (Fazeli et al 2013; Tsentidis et al 2015). Queste osservazioni indicano che il ruolo della sclerostina sul metabolismo dell'osso è più complesso di come a volte viene presentato. Nei campioni che abbiamo analizzato non è stata notata alcuna correlazione significativa tra sclerostina circolante e i dati di densitometria ossea. Inoltre nel nostro laboratorio erano stati dosati anche i livelli di del preadipocite factor 1 (Pref-1), una adipocitochina inversamente correlata allo sviluppo osseo, in quanto indirizza le cellule mesenchimali progenitrici verso il differenziamento in adipociti piuttosto che in osteoblasti. I livelli ematici di Pref-1, analogamente a

quelli della sclerostina, erano maggiori nelle ginnaste rispetto ai controlli (figura 2) e ugualmente non mostravano alcuna correlazione con la mineralizzazione ossea (Jürimäe et al 2016). Questi dati supportano l'ipotesi che l'esercizio sia in grado di "neutralizzare" il segnale negativo sul metabolismo dell'osso dovuto ad alcuni effettori ormonali catabolici.

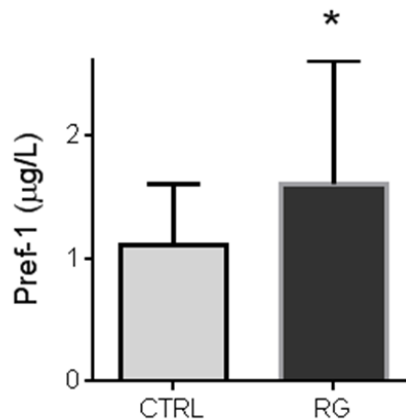


Figura 2.2. Concentrazioni di Pref-1 nel plasma di giovani atlete praticanti ginnastica ritmica (RG, n=32) e in coetanee di controllo non praticanti attività fisica regolare (Ctrl, n=32). * $p < 0,05$.

Abbiamo avuto l'opportunità di valutare ulteriormente questo aspetto grazie a un follow up a quasi un anno di distanza. In queste prove, il gruppo delle ginnaste era composto da 31 delle 32 atlete di partenza, quindi abbiamo potuto seguire lo sviluppo dei dosaggi relativi a praticamente tutte le giovani; invece nel gruppo di controllo erano rimasti 21 dei 32 soggetti di partenza. Questo follow up è stato particolarmente importante, in quanto, oltre all'effetto dell'allenamento, era presente anche quello legato alla maturazione delle bambine e l'età media passava da $10,0 \pm 0,5$ a $10,9 \pm 0,5$ anni. In effetti, nessuna delle 31 atlete era più nello stadio Tanner 1, ma 28 erano Tanner 2 e 3 erano Tanner 3. Tra i controlli erano presenti 15 soggetti nello stadio di Tanner 2 e 6 nello stadio di Tanner 3. Rispetto all'anno precedente, le giovani hanno mostrato un aumento medio di 5-6 cm in altezza e di 4-5 kg di peso. Abbiamo quindi potuto valutare i livelli di sclerostina in una situazione di crescita, anche ossea, sicuramente associata a un aumento del grado di mineralizzazione dell'osso. In effetti, le determinazioni effettuate a Tartu hanno mostrato che la densità minerale ossea media nelle giovani del gruppo di controllo era passata da $0,75 \pm 0,09$ a $0,78 \pm 0,10$ g/cm² a livello della spina lombare e da $0,76 \pm 0,09$ a $0,79 \pm 0,11$ g/cm² a livello del collo del femore. Nelle giovani ginnaste l'aumento della mineralizzazione era drammatico e il valore di densità ossea passava da $0,85 \pm 0,08$ a $0,91 \pm 0,10$ g/cm² a livello della spina lombare e da $0,87 \pm 0,08$ a $0,92 \pm 0,10$ g/cm² a livello del collo del femore.

Il dosaggio dei livelli circolanti di sclerostina ha evidenziato che questa passava da una concentrazione di $15,8 \pm 5,4$ a $17,6 \pm 10,1$ pmoli/L nei soggetti di controllo e da $19,8 \pm 6,3$ a $24,8 \pm 8,5$ pmoli/L nelle ginnaste. La figura 2.1B mostra il cambiamento dei livelli ematici di sclerostina nel primo dosaggio e nel secondo dosaggio che rappresenta il follow up a un anno di distanza, sia nelle ginnaste che nelle giovani del gruppo di controllo. L'aumento dei livelli di sclerostina nei controlli è verosimilmente associato alla maturazione. Nelle ginnaste però si nota un aumento nettamente maggiore, evidenziato dalla diversa pendenza della curva mostrata nella figura 2.1C, che quindi sembra essere associato alla pratica dello sport.

Questa osservazione supporta ulteriormente l'ipotesi che l'esercizio fisico possa agire come modulatore del segnale catabolico della sclerostina e che ci sia un aumento di sclerostina anche in presenza di un aumento di mineralizzazione ossea.

Per approfondire a livello cellulare alcuni aspetti biochimici legati all'azione della sclerostina, abbiamo utilizzato un modello cellulare *in vitro* rappresentato da cellule di osteosarcoma SaOS2 (figura 2.3A). Queste cellule sono utilizzate normalmente nel laboratorio in cui ho effettuato il lavoro per questa tesi (Cappadone et al 2015) e presentano alcuni aspetti che le rendono utili per la nostra ricerca. Innanzitutto è stato riportato in letteratura che queste cellule esprimono il prodotto del gene *SOST* e sono quindi adatte per studiare meccanismi che coinvolgono la proteina sclerostina. D'altra parte però, il grado di espressione della sclerostina è molto limitato e pertanto presentano bassi livelli della proteina, la quale quindi normalmente non è determinabile nel medium di coltura (Yu et al 2011; Schoeman et al 2015). Pertanto i livelli endogeni non dovrebbero influire sull'addizione di sclerostina esogena. Per confermare questo aspetto, abbiamo analizzato il contenuto cellulare di sclerostina a due e a sette giorni dalla semina in un estratto cellulare totale mediante Western blotting e in nessun campione abbiamo rilevato la proteina. Inoltre abbiamo dosato la sclerostina anche nel terreno di coltura, mediante il medesimo test Elisa usato per i campioni ematici. Anche in questo caso non abbiamo determinato presenza della proteina, anche quando il medium era concentrato di circa 5 volte, mediante apposite cartucce. Il limite di rilevazione indicato dal produttore è di 0,1 pmoli/L (corrispondenti a circa 2,7 pg/ml della proteina). Per caratterizzare il modello sperimentale abbiamo effettuato diversi esperimenti, di cui esaminiamo brevemente i principali. Innanzitutto, le SaOS2 sono cellule osteogeniche con diverse caratteristiche di osteoblasti indirizzati verso il differenziamento in osteociti (Prideaux et al 2014); in opportune condizioni possono pertanto differenziarsi. Per valutare questo processo, abbiamo quindi seminato le cellule in uno specifico terreno di differenziamento, contenente acido ascorbico e β -glycerophosphate. Abbiamo quindi valutato il processo di deposizione del Calcio, alla base della

mineralizzazione ossea, durante il differenziamento, per cui, dopo 10 giorni di incubazione nel medium di differenziamento, le cellule sono state prelevate, fissate e colorate con alizarin red, un colorante che colora in modo specifico i sali di Calcio. La figura 2.3B mostra come sia evidente la colorazione nelle piastre delle cellule indotte al differenziamento, indice di un aumentato grado di calcificazione. Dopo tre giorni si notano diversi aggregati di sali di Calcio, che aumentano notevolmente dopo 10 giorni di incubazione. A intervalli di tempo nel corso dell'esperimento, alcune piastre erano prelevate per il dosaggio dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP), che rappresenta un classico marker di calcificazione e di differenziamento degli osteociti. Come si può osservare nella figura 2.4A, nelle cellule stimulate a differenziare l'attività della fosfatasi alcalina inizia a crescere già dopo un giorno e aumenta progressivamente nel tempo.

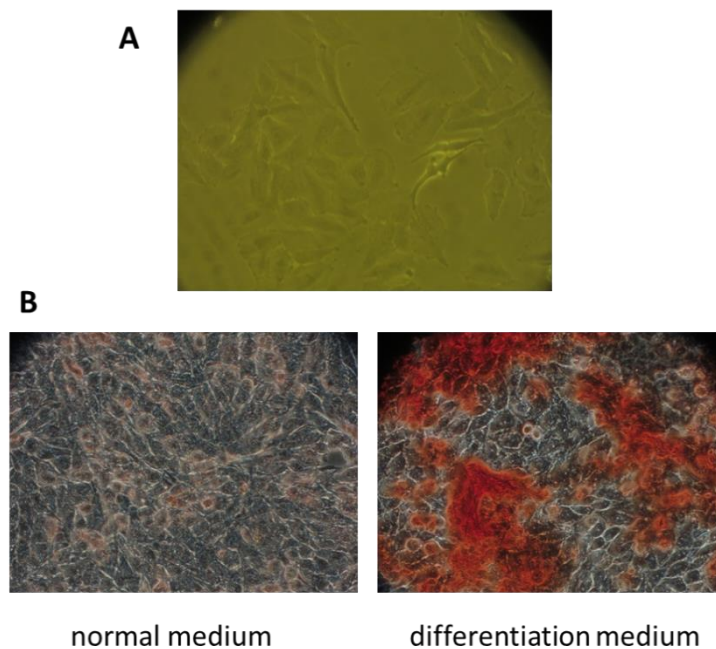


Figura 2.3. A. Morfologia delle cellule SaOS2 viste al microscopio a contrasto di fase. B. Le cellule sono state incubate 10 gg nel terreno di coltura normale o in terreno di differenziamento, quindi le colture sono state colorate con alizarin red, per evidenziare i depositi minerali di Calcio. Le foto sono rappresentative di diversi esperimenti effettuati.

E' interessante notare che il processo di calcificazione è associato a un aumento del processo di autofagia, valutato mediante il marker universale di autofagia rappresentato dalla variazione del livello di espressione della proteina LC3B (Klionsky DJ et al 2016). Questa proteina può essere presente in due forme, una forma citosolica chiamata LC3-I (18-kDA), che durante l'autofagia è processata attraverso lipidazione e taglio proteolitico, trasformandosi nella forma LC3-II (16-kDA) la quale si associa alla membrana degli autofagosomi, divenendo un marker di attivazione del

percorso autofagico. Nella figura 2.4B è evidenziato l'aumento dell'isoforma LC3-II nelle cellule incubate con il terreno di differenziamento.

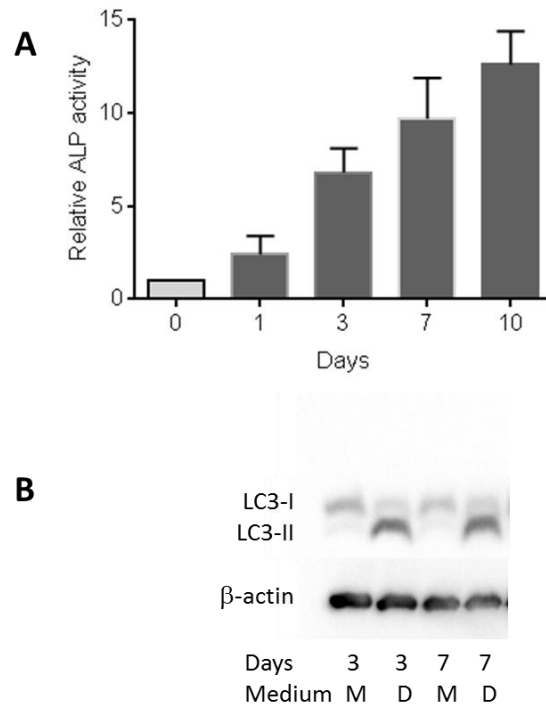


Figura 2.4. A. Le cellule sono state incubate in terreno di differenziamento e prelevate ai tempi indicati per il dosaggio dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP). I valori sono medie \pm SEM (n=3). B. Le cellule sono state incubate in terreno normale (M) o in terreno di differenziamento (D) e prelevate ai tempi indicati per il dosaggio del contenuto di LC3-I e LC3-II mediante Western blotting. L'immagine è rappresentativa di più esperimenti con risultati analoghi.

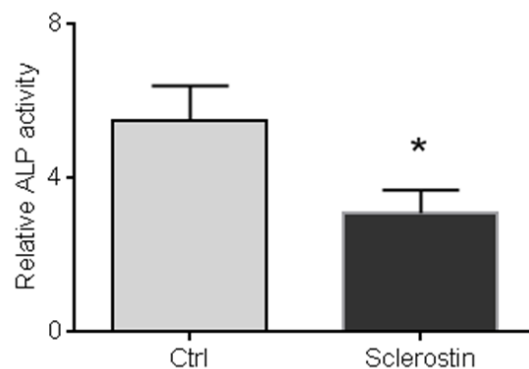


Figura 2.5. Le cellule sono state incubate 7 giorni in terreno di differenziamento in assenza o presenza di sclerostina (500 ng/ml). Alla fine dell'incubazione è stata determinata l'attività della fosfatasi alcalina (ALP). I valori sono medie \pm SEM (n=3), * $p < 0,05$.

Nel corso di una serie di esperimenti successivi, abbiamo iniziato a esaminare alcuni aspetti dell'azione della sclerostina. Come prima cosa abbiamo valutato l'effetto dell'ormone sui marker di differenziamento e mineralizzazione nel nostro modello sperimentale. Le cellule sono quindi state incubate una settimana nel terreno di differenziamento, in presenza o assenza di sclerostina umana ricombinante e poi è stata misurata l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina. Come si può notare nella figura 2.5, a una concentrazione di 500 ng/ml si osserva una significativa diminuzione di attività della fosfatasi alcalina. Questo dato è in accordo con quanto riportato in letteratura sul ruolo biologico della sclerostina (Honasoge et al 2014; Delgado-Calle et al 2017).

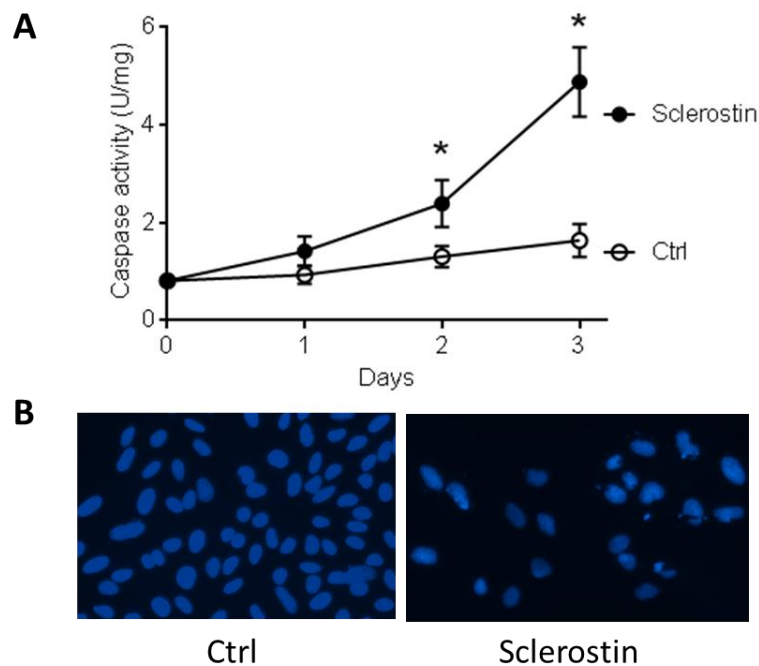


Figura 2.6. A. Attività delle caspasi in cellule incubate per il tempo indicato in assenza (Ctrl) o in presenza di sclerostina 500 nM. I valori sono medie \pm SEM di quattro determinazioni, * $p < 0,05$. B. Morfologia nucleare dopo colorazione con DAPI. Le cellule erano state incubate 72 ore in assenza (Ctrl) o in presenza di sclerostina 500 nM.

Successivamente abbiamo valutato se la sclerostina fosse in grado di attivare l'apoptosi anche nelle cellule SaOS2 del nostro modello sperimentale, in quanto è noto che può attivare l'apoptosi caspasi-dipendente negli osteoblasti (Sutherland et al 2004). In alcuni esperimenti preliminari, le cellule sono state trattate con staurosporina 1 μ M, un classico induttore di apoptosi, che ha causato l'attivazione dell'attività enzimatica delle caspasi effettrici e la comparsa di alcuni tipici segni morfologici a livello nucleare. Queste cellule quindi, che mancano di una proteina p53 funzionante (Chen et al 1996), vanno normalmente incontro al processo di apoptosi. Le cellule quindi sono state incubate in presenza di sclerostina e sono state raccolte dopo diversi tempi di incubazione (figura

2.6A). Abbiamo potuto osservare un aumento progressivo di attività delle caspasi, determinata attraverso la sequenza-substrato DEVD, che è il target preferito dalla caspasi-3, ma anche da altre caspasi effettrici. Per confermare ulteriormente il coinvolgimento dell'apoptosi nell'effetto della sclerostina, abbiamo valutato la morfologia nucleare, che è un indicatore affidabile di morte cellulare per apoptosi (Robertson et al 2000) attraverso la colorazione con DAPI. Nelle cellule trattate con sclerostina (500 ng/ml) per 72 ore è stato possibile individuare diversi nuclei con caratteristiche associate all'apoptosi, cioè la condensazione della cromatina, la frammentazione e/o condensazione nucleare (figura 2.6B).

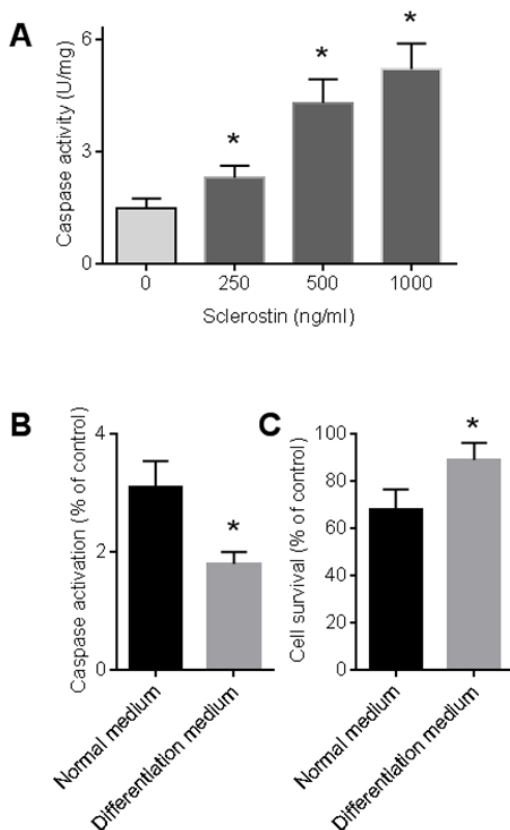


Figura 2.7. A. Le cellule sono state incubate 72 ore in presenza delle concentrazioni indicate di sclerostina. Quindi sono state raccolte per il dosaggio dell'attività caspasi. I valori sono medie \pm SEM (n=3), * $p < 0,05$. B. Le cellule sono state incubate 48 h nel terreno di coltura normale o in terreno di differenziazione, prima di essere trattate con sclerostina 500 nM. Dopo 72 ore è stata misurata l'attività delle caspasi. I dati riportati sono medie \pm SEM di tre determinazioni. * $p < 0,05$. C. Esperimento analogo a quello mostrato nel pannello B, ma al termine è stata misurata la vitalità cellulare.

L'attività caspasi dopo 72 ore di incubazione aumentava in modo correlato alla concentrazione della sclerostina (figura 2.7A). In un esperimento successivo abbiamo valutato se il differenziamento potesse influire sull'attivazione delle caspasi da parte della sclerostina. Pertanto le

cellule sono state divise in due gruppi, di cui uno indotto al differenziamento con lo specifico medium per 48 ore prima del trattamento con la sclerostina. L'effetto pro-apoptotico della sclerostina è stato significativamente minore nelle cellule indotte al differenziamento, in cui abbiamo rilevato un minore grado di attivazione delle caspasi e una maggiore sopravvivenza.

La sclerostina ovviamente può esplicare i propri effetti a livello cellulare attraverso diversi meccanismi, anche non noti; attualmente comunque è ben caratterizzata l'azione che esplica sulla via di segnalazione mediata da Wnt/ β -catenin, che ha un ruolo centrale nella biologia degli osteoblasti, di cui è un potente inibitore (Kubota et al 2009; Honasoge et al 2014; Delgado-Calle et al 2017). Abbiamo quindi voluto valutare nel nostro sistema sperimentale l'effetto della sclerostina sulla segnalazione che passa attraverso Wnt. Nel laboratorio dove abbiamo condotto questi esperimenti si studiano da diversi decenni le poliamine e il loro ruolo biologico. L'ornitina decarbossilasi (ODC) è il primo e limitante enzima della biosintesi delle poliamine in tutte gli organismi eucarioti e procarioti. Vista l'importanza delle poliamine per tutti i processi di crescita, questo enzima è altamente regolato e il gene *ODC* è controllato anche attraverso la via di segnalazione regolata da Wnt (Fultz et al 2002; Rial et al 2009). Questa correlazione ci ha dato l'opportunità di studiare per la prima volta le possibili connessioni tra sclerostina e metabolismo delle poliamine, su cui non è riportato nulla nella letteratura scientifica. Pertanto, le cellule sono state coltivate per 48 h in assenza o presenza di sclerostina e quindi sono state raccolte per il dosaggio dei livelli cellulari delle poliamine naturali putrescina, spermidina e spermina mediante hplc. I risultati dei dosaggi sono riportati nella figura 2.8, dove è mostrato che il trattamento con sclerostina causa un calo generalizzato dei livelli delle poliamine. In modo particolare, sono notevolmente diminuiti i livelli endogeni di putrescina e spermidina e solo marginalmente quelli di spermina.

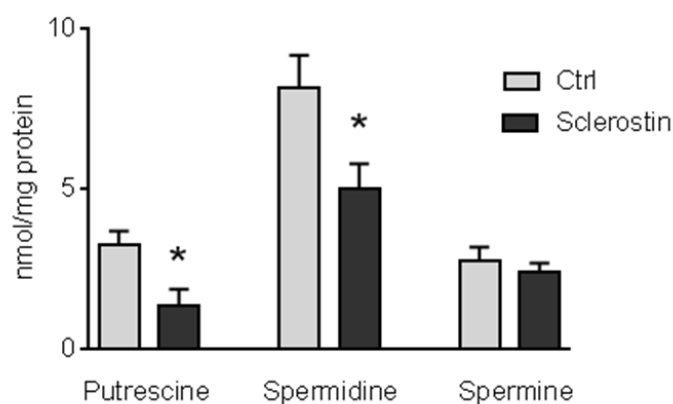


Figura 2.8. Effetto della sclerostina (500 nM per 72 ore di incubazione) sui livelli endogeni di poliamine nelle cellule SaOS2. I dati riportati sono medie \pm SEM di tre determinazioni. * $p < 0,05$.

Per valutare se il calo delle concentrazioni endogene di poliamine potesse avere un ruolo nell'attivazione di apoptosi da parte della sclerostina, le cellule sono state trattate con sclerostina in presenza di poliamine esogene, aggiunte al terreno di coltura per mantenerne i livelli. L'aggiunta di putrescina (5 μ M) al medium di coltura in effetti impediva il calo della concentrazione delle poliamine endogene nelle cellule trattate con sclerostina, ma non mostrava nessun effetto protettivo. L'aggiunta di spermidina (5 μ M) invece sembrava proteggere maggiormente le cellule dall'azione citotossica della sclerostina (figura 2.9). Questa osservazione suggerisce che l'azione proapoptotica della sclerostina non sia correlata al suo effetto sui livelli di poliamine e che l'effetto protettivo della spermidina sia dovuto a qualche altro meccanismo.

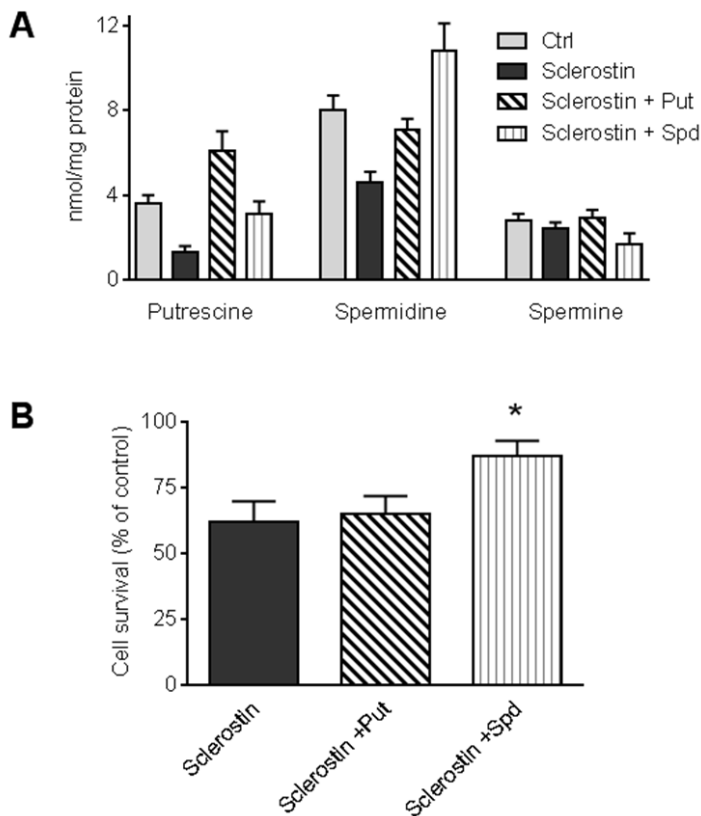


Figura 2.9. A. Le cellule sono state trattate con per 72 ore in assenza (Ctrl) o in presenza di sclerostina (500 nM). Dove indicato erano presenti anche putrescina (Put, 5 μ M) o spermidina (Spd, 5 μ M). I valori mostrati sono la media \pm il range dei livelli di poliamine misurati in due esperimenti distinti. B. Le cellule sono state trattate con per 72 ore con sclerostina 500 nM in presenza o assenza di putrescina (Put, 5 mM) o spermidina (Spd, 5 mM). Al termine dell'esperimento è stata valutata la sopravvivenza cellulare. I valori sono medie \pm SEM (n=3), * $p < 0,05$.

Diverse ricerche negli ultimi anni hanno identificato la spermidina come un induttore di autofagia e hanno attribuito a questo processo numerosi degli effetti esplicati dalla poliamina a livello sia

cellulare, sia dell'intero organismo (Eisenberg et al 2009; Michiels et al 2016; Bhukel et al 2017). Abbiamo quindi esaminato l'attivazione di autofagia nelle cellule SaOS2 trattate con la spermidina per 8 ore. L'analisi mediante Western blot ha mostrato che il trattamento con spermidina causava l'aumento della forma LC3-II, marker del processo autofagico dopo alcune ore di trattamento. L'aumento di LC3-II si aveva anche nelle cellule a cui era ulteriormente aggiunta cloroquina, che è un inibitore del flusso autofagico, in quanto blocca la digestione degli autofagosomi da parte dei lisosomi e perciò causa un accumulo di autofagosomi nella cellula (figura 2.10A). Questa prova mostra che l'aumento di LC3-II è causato dalla sua formazione e non da un accumulo dovuto all'arresto del flusso autofagico. Per un'ulteriore conferma dell'attivazione di autofagia nel nostro modello sperimentale abbiamo effettuato l'identificazione delle vescicole autofagiche. In questi esperimenti abbiamo trasfettato le cellule con il vettore virale BacMam (insect Baculovirus with a Mamalian promoter) composto da un promotore specifico per cellule di mammifero e un gene codificante LC3-2 fuso con GFP. Dopo circa 8 ore dal momento della trasfezione, è stato aggiunto medium fresco le cellule sono state poi incubate overnight. Quindi le cellule sono state trattate 24h con spermidina e poi sono state acquisite le immagini tramite microscopio a fluorescenza Olympus 1x50. Come si evince dalla figura 2.10B, nelle cellule trattate con spermidina sono evidenti gli autofagosomi in cui è localizzata la fluorescenza di LC3 (le cellule di controllo mostrano a livello del citoplasma una blanda luminescenza diffusa).

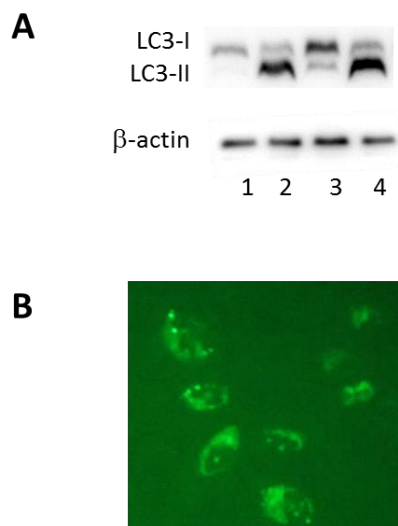


Figura 2.10. A. Le cellule sono state trattate come segue, 1: controllo; 2: cloroquina; 3: spermidina; 4 cloroquina + spermidina. Dopo 8 ore di incubazione sono state prelevate per la determinazione del contenuto di LC3-I e LC3-II mediante Western blotting. Spermidina 5 μ M e cloroquina 5 μ M. B. Determinazione dell'autofagia attraverso l'identificazione di GFP-LC3 negli autofagosomi delle cellule trattate 24 ore con spermidina. Le immagini riportate nella figura sono rappresentative di piú esperimenti in cui si sono avuti risultati comparabili.

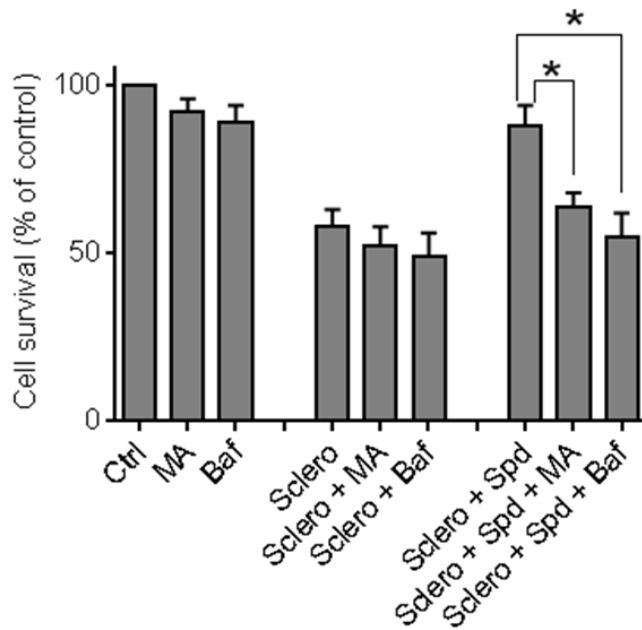


Figura 2.11. Le cellule sono state trattate con sclerostina (Sclero, 500 nM) in assenza o presenza di spermidina (Spd, 5 μ M). Dove indicato erano aggiunti al terreno anche 3-metiladenina (MA, 10 μ M) o Bafilomicina A1 (Baf, 4 μ M). Dopo 72 ore è stata misurata la sopravvivenza cellulare. I dati riportati sono medie \pm SEM di tre determinazioni. * $p < 0,05$.

Per valutare se il processo autofagico avesse un ruolo nell'azione protettiva della spermidina, le cellule incubate con sclerostina sono state trattate con spermidina in assenza o in presenza di due inibitori dell'autofagia: 3-metiladenina (10 μ M) e bafilomicina A1 (4 μ M). Questi trattamenti hanno abrogato l'effetto protettivo della spermidina (figura 2.11), indicando che questo effetto è associato all'attivazione di autofagia. I risultati ottenuti depongono a favore di un effetto protettivo dell'autofagia sull'azione proapoptotica della sclerostina nel nostro sistema sperimentale. Questa visione è supportata anche dall'osservazione relativa alla minore tossicità dell'ormone sulle cellule differenziate, che mostrano un maggior grado di autofagia (figura 2.7).

Per verificare ulteriormente il ruolo protettivo dell'autofagia nei confronti dell'apoptosi indotta dalla sclerostina, abbiamo pensato di attivare il processo attraverso un altro meccanismo, associato all'attivazione della proteina chinasi attivata da AMP (AMPK). Infatti, la chinasi AMPK è necessaria per mantenere una normale densità minerale ossea (Quinn et al 2010) e promuove l'osteogenesi (Wang et al 2016), anche se è stato riportato che in particolari condizioni può favorire l'espressione della sclerostina (Yokomoto-Umakoshi et al 2016). Inoltre, la sua funzione come attivatore di autofagia è importante sia per il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali in cellule osteogeniche (Pantovic et al 2013), sia per il differenziamento degli osteoblasti (Xi et al 2016).

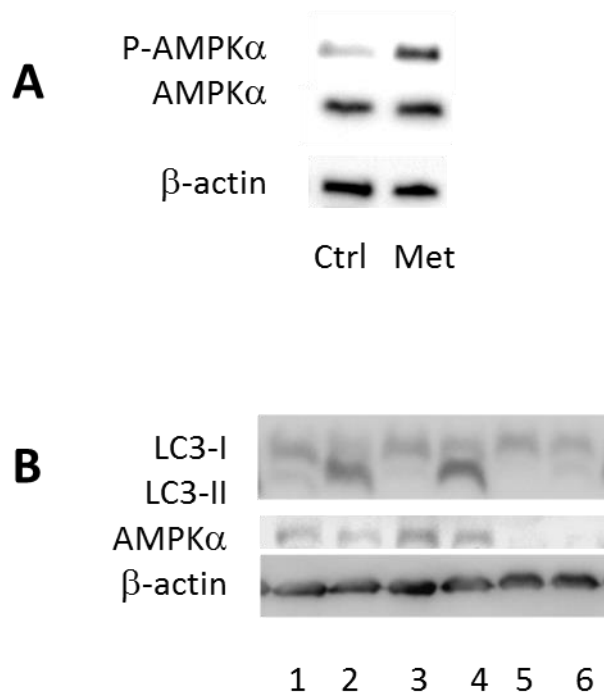


Figura 2.12. A Le cellule sono state trattate per 6 ore con metformina (Met, 50 μ M), poi sono state raccolte e analizzate con Western blotting utilizzando anticorpi contro la subunità α della AMPK, per determinare sia la quantità totale della proteina che il grado di fosforilazione. B. Le cellule sono state incubate con i seguenti trattamenti, 1: nessuno; 2: metformina; 3: nessuno, in presenza di contro siRNA; 4: metformina, in presenza di control siRNA; 5: nessuno, in presenza di AMPK α 1/ α 2 siRNA; 6: metformina, in presenza di AMPK α 1/ α 2 siRNA. Dopo 24 ore le cellule sono state raccolte per le determinazioni delle proteine indicate mediante Western blotting. Le figure sono rappresentative di più esperimenti con risultati analoghi.

L'attivazione dell'autofagia mediata da AMPK poi, può proteggere cellule di osteoblastoma dall'apoptosi indotta da farmaci citotossici (Zhu et al 2013). AMPK poi è attivata dall'esercizio e l'attivazione dell'autofagia può avere un ruolo importante negli adattamenti all'allenamento (Dokladny et al 2015; Fritzen et al 2016). Abbiamo quindi trattato le cellule con il farmaco metformina, che è un potente attivatore di AMPK e in diverse cellule è in grado di attivare il processo autofagico (Chen et al 2016). In alcuni esperimenti preliminari abbiamo valutato la tossicità della metformina e abbiamo visto che a concentrazioni pari o inferiori a 100 μ M non influenzava in modo significativo la vitalità cellulare. Come previsto, la metformina promuoveva l'attivazione di AMPK, evidenziata dalla fosforilazione della treonina 372 (figura 2.12A). Per determinare se fosse anche attivata l'autofagia, rilevata dall'aumento di LC3-II e se l'attivazione del processo autofagico fosse mediata da AMPK, abbiamo inibito l'espressione dell'enzima mediante siRNA, in quanto non sono disponibili inibitori selettivi della chinasi. Abbiamo quindi utilizzato una tecnica già standardizzata nel nostro laboratorio (Passariello et al 2011; Passariello et al 2012) che prevede siRNA diretti contro le isoforme α 1 e α 2 della subunità catalitica α della chinasi; come

controllo era usato un siRNA senza bersaglio (control siRNA, Sigma). Abbiamo ottenuto una inibizione di circa il 70% dei livelli di AMPKa e la figura 2.12B mostra che in effetti l'aumento del marker di autofagia LC3-II in seguito al trattamento per 24 ore con metformina era dipendente da AMPK, in quanto non era più evidenziabile a seguito dell'inibizione dell'espressione di AMPK.

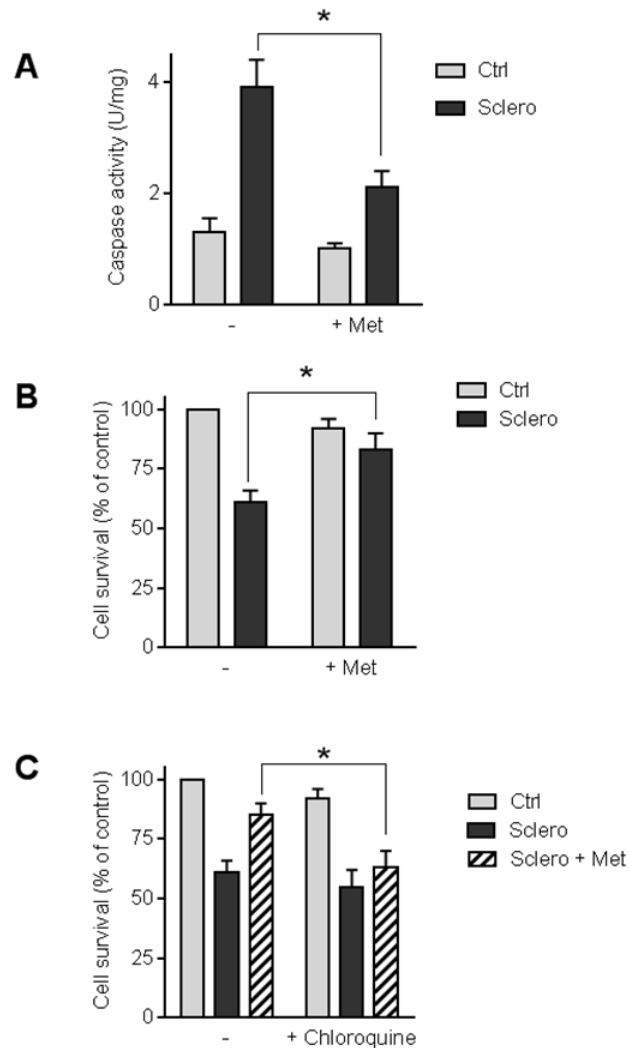


Figura 2.13. Le cellule sono state incubate 72 in presenza o assenza di sclerostina (sclero, 500 nM), + o - metformina (Met, 50 μ M) come indicato. Alla fine dell'incubazione sono state determinate l'attività delle caspasi (pannello A) e la sopravvivenza cellulare (pannello B). C. le cellule sono state trattate con sclerostina e metformina come indicato, in presenza o assenza di cloroquina (3 μ M). La vitalità cellulare è stata misurata dopo 72 ore. In tutti i pannelli i dati riportati sono medie \pm SEM di 3 o 4 determinazioni. * $p < 0,05$.

Quando le cellule SaOS2 erano trattate con sclerostina e poi incubate in assenza o presenza di Metformina per 72 h, la metformina causava una significativa riduzione dell'effetto proapoptotico della sclerostina, riducendo l'attivazione delle caspasi e la morte cellulare (figura 2.13). Questo

effetto protettivo era abrogato quando le cellule erano trattate anche con cloroquina per inibire l'autofagia, evidenziando il ruolo protettivo del processo autofagico.

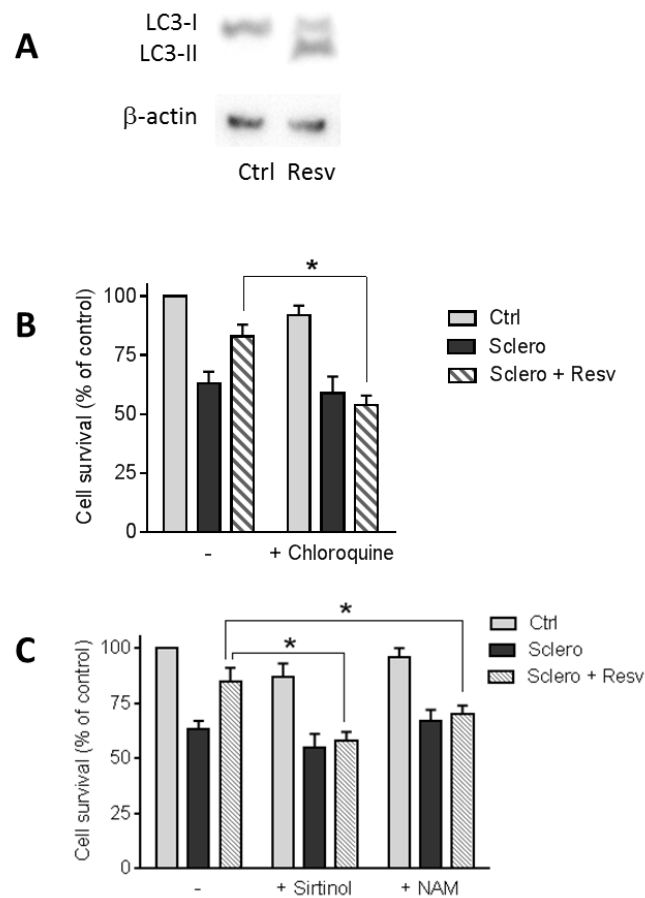


Figura 2.14. A. Le cellule sono state incubate 24 ore in assenza (Ctrl) o presenza di resveratrolo (Resv, 5 μ M) quindi sono state prelevate per la determinazione del contenuto di LC3-I e LC3-II mediante Western blotting. B. Le cellule sono state trattate con sclerostina e resveratrolo come indicato, in presenza o assenza di cloroquina (3 μ M). C. Le cellule sono state trattate con sclerostina e resveratrolo come indicato, in presenza o assenza di sirtinolo (5 μ M) o nicotinamide (NAM, 10 mM). In tutti gli esperimenti, a vitalità cellulare è stata misurata dopo 72 ore. I dati riportati sono medie \pm SEM di 3 determinazioni. * $p < 0,05$.

In seguito abbiamo valutato anche un altro meccanismo, rappresentato dall'attivazione della sirtuina SIRT1, che a sua volta è attivata dall'esercizio fisico (Lappalainen 2011). SIRT1 è una deacetilasi che funziona come un potente modulatore del metabolismo ed è in grado di attivare l'autofagia in molte cellule (Guclu et al 2016). Attraverso l'autofagia, SIRT1 può avere un effetto protettivo: ad esempio può inibire l'apoptosi indotta da numerosi effettori nelle cellule dei dischi intervertebrali (Jiang et al 2014; Miyazaki et al 2015). Per valutare l'effetto della sirtuina, le cellule sono state trattate con il suo attivatore resveratrolo. In alcune prove preliminari abbiamo

determinato che a concentrazione 5 μM non presentava effetti citotossici, per cui abbiamo trattato le cellule con questa concentrazione di resveratrolo contemporaneamente alla sclerostina (figura 2.14). Il resveratrolo stimola l'autofagia, evidenziata dall'aumento di LC3-II e contemporaneamente attenua l'effetto tossico della sclerostina sulla vitalità cellulare. Anche in questo caso, l'effetto protettivo del resveratrolo contro la citotossicità della sclerostina veniva soppresso dall'inibitore dell'autofagia cloroquina (figura 2.14B). L'effetto protettivo era attenuato anche quando insieme al resveratrolo venivano somministrati alle cellule gli inibitori di SIRT1 sirtinolo (10 μM) e nicotinamide (10 mM), evidenziando il ruolo centrale della deacetilasi (figura 2.14C).

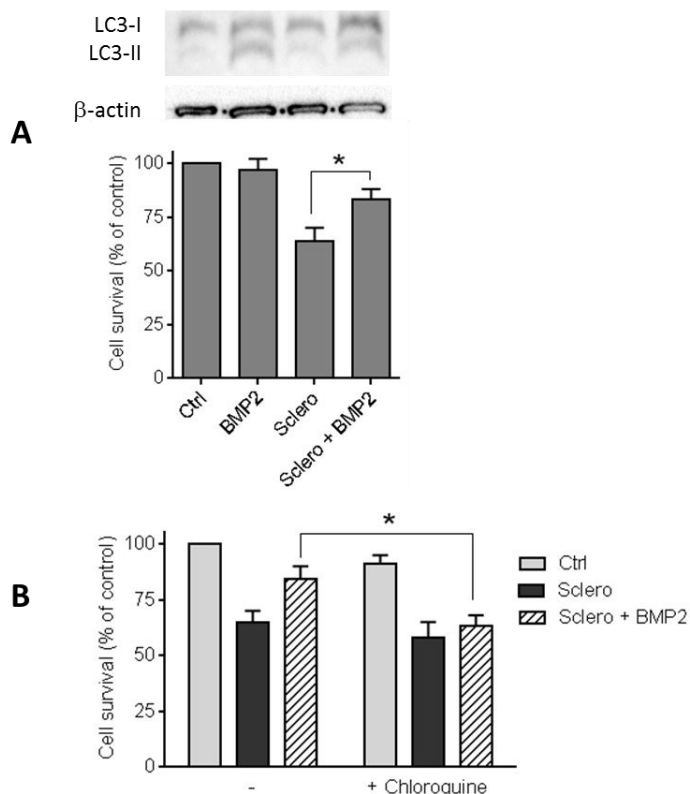


Figura 2.15. A. Le cellule sono state preincubate 24 ore con BMP2 (100 ng/ml) e quindi trattate con sclerostina, come indicato. Dopo 72 ore sono state raccolte per la determinazione del contenuto di LC3-I e LC3-II mediante Western blotting e della sopravvivenza cellulare. B. Le cellule sono state trattate con sclerostina + o - BMP2 come indicato, in presenza o assenza di cloroquina (3 μM). La vitalità cellulare è stata misurata dopo 72 ore. I dati riportati sono medie \pm SEM di 3 determinazioni. * $p < 0,05$.

Infine abbiamo voluto studiare l'effetto di BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2), che è un effettore anabolico per l'osso con un ruolo importante nella proliferazione e nel differenziamento

degli osteoblasti (Reddi 1997; Lien et al 2013) e che recentemente è stata associata al processo autofagico (Ozeki et al 2016; Kim et al 2016). Pertanto le cellule sono state pretrattate con BMP2 (100 ng/ml) per 24 ore e poi incubate per 72 ore in presenza di sclerostina. La figura 2.15A mostra che BMP2 inibisce l'azione proapoptotica della sclerostina, mentre attiva il processo autofagico e anche in questo caso, l'inibitore dell'autofagia cloroquina (3 μ M) blocca l'effetto protettivo (figura 2.15B).

3. DISCUSSIONE

L'esercizio fisico porta svariati benefici all'intero organismo. Tra questi un ruolo particolarmente importante è quello legato al mantenimento della funzionalità ossea e del corretto metabolismo osseo. Fattori fondamentali per garantire la salute dell'osso durante tutto l'arco della vita. L'attività fisica esplica i suoi effetti sull'osso attraverso svariati meccanismi, alla base dei quali c'è sempre un'azione a livello cellulare o molecolare. Nel nostro lavoro ci siamo occupati di valutare proprio alcuni aspetti cellulari e biochimici che stanno alla base degli effetti dell'esercizio sull'osso. In particolare ci siamo occupati dell'azione della citochina sclerostina.

La Sclerostina è una glicoproteina costituita da 190 aminoacidi e con una massa di circa 27kDa espressa prevalentemente negli osteociti e, in quantità minori, nei cementociti e nei condrociti (Sharifi et al., 2015). La sclerostina è una citochina appartenente alla superfamiglia del TGF β altamente conservata tra i diversi vertebrati ed è sostanzialmente un ormone regolatore della formazione dell'osso (Delgado-Calle et al 2017; Drake e Khosla 2017).

La mancata espressione o secrezione della sclerostina è responsabile nell'uomo di difetti genetici ereditari caratterizzati da una grande massa ossea a seguito di un'esagerata osteogenesi, come la malattia di Buchem (Baron e Kneissel 2013). In effetti, la Sclerostina è stata identificata nello studio di patologie rare con alterazioni alla massa ossea. Poiché la sclerostina è un modulatore negativo della crescita ossea, si ritiene che l'inibizione della sua azione potrebbe essere efficace nel trattamento dell'osteoporosi e attualmente diversi anticorpi monoclonali diretti contro la sclerostina sono in fase di sviluppo clinico (Sharifi et al., 2015; Appelman-Dijkstra et al., 2016).

La sclerostina una volta che abbia interagito con il proprio recettore, inibisce la via di segnalazione canonica Wnt / β -catenina e riduce la formazione ossea. La via canonica di Wnt è un importante regolatore dell'attività osteoblastica, e porta ad attivazione / stabilizzazione della β -catenina, che trasloca nel nucleo della cellula, attivando fattori di trascrizione che inducono geni bersaglio. L'attivazione del pathway Wnt canonica da ligandi Wnt stimola differenziazione degli osteoblasti, proliferazione e la sopravvivenza, con un conseguente aumento della formazione dell'osso (Kim et al 2013; Delgado-Calle et al 2017).

La ricerca presentata in questa tesi è nata in seguito ad alcune osservazioni fatte "sul campo" in quanto sono stati osservati alti livelli ematici di sclerostina in giovani ginnaste in età prepuberale praticanti ginnastica ritmica. Questo può sembrare in contrasto con il ruolo biologico della sclerostina (Drake e Khosla 2017; Delgado-Calle et al 2017), che è un attivatore del riassorbimento osseo e un inibitore della mineralizzazione. In numerosi casi è stato riportato che l'attività fisica causa una diminuzione dei livelli circolanti di sclerostina (Schwab et al., 2011; Drake e Khosla

2017; Delgado-Calle et al., 2017), ma nel complesso la letteratura riporta dati contrastanti sull'effetto dell'esercizio, che non è sempre associato ad una diminuzione dei livelli di sclerostina (Fazeli et al., 2013; Drake & Khosla 2017) come invece lo è l'inattività (Honasoge et al., 2014). Infatti, la sclerostina è prodotta dagli osteociti e pertanto una buona mineralizzazione ossea, associata ad un alto numero di osteociti attivi può portare ad alti livelli di sclerostina (Honasoge et al., 2014). Anche l'età influenza questi aspetti, in quanto nei bambini e adolescenti è stato osservato che i livelli di sclerostina non sono necessariamente associati negativamente alla mineralizzazione dell'osso (Fazeli et al., 2013; Tsentidis et al., 2015).

La pratica di sport d'impatto, con frequenti salti e conseguenti ricadute, durante il periodo della crescita, è in grado di massimizzare l'aumento di massa ossea (Rizzoli et al 2010) e tra i diversi sport che favoriscono la mineralizzazione ossea, la ginnastica ritmica ha un effetto importante. Quando sono stati valutati gli indici associati alla mineralizzazione ossea, le giovani praticanti ginnastica ritmica hanno sempre mostrato valori di densità minerale ossea significativamente maggiori rispetto alle coetanee di controllo (Gruodyte et al 2010; Jürimäe et al 2016). Nonostante questo però presentano elevati livelli circolanti di sclerostina, così come di Pref-1, una adipochina a sua volta correlata negativamente al differenziamento osteogenico dei precursori degli osteoblasti (Abdallah e Kassem 2013).

Le osservazioni descritte suggeriscono che la sclerostina non sia necessariamente un fattore negativo per la formazione dell'osso, ma che in particolari situazioni, come nelle atlete, sia piuttosto un marker del turnover osseo e si potrebbe ipotizzare che l'esercizio sia in grado di "neutralizzare" il segnale negativo sul metabolismo dell'osso dovuto ad alcuni effettori ormonali catabolici. Pertanto abbiamo voluto approfondire a livello cellulare alcuni aspetti dell'azione della sclerostina, utilizzando un modello cellulare *in vitro* rappresentato da cellule di osteosarcoma SaOS2, che sono cellule osteogeniche con diverse caratteristiche di osteoblasti indirizzati verso il differenziamento in osteociti (Prideaux et al 2014).

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione della sclerostina, abbiamo potuto fare due osservazioni: 1) la sclerostina è in grado di influenzare i livelli di poliamine, diminuendoli; 2) l'azione pro-apoptotica della citochina è mitigata dal processo di autofagia.

Per quanto riguarda le connessioni con le poliamine, bisogna osservare che l'ornitina decarbossilasi (ODC), il primo e limitante enzima della biosintesi delle poliamine, è altamente regolato e il gene *ODC* è controllato anche attraverso la via di segnalazione regolata da Wnt (Fultz et al 2002; Rial et al 2009). Si ritiene che molti degli effetti biologici della sclerostina, siano dovuti alla sua azione inibitoria sulla via di segnalazione canonica mediata da Wnt/ β -catenin. Questa correlazione ci ha dato l'opportunità di studiare per la prima volta le possibili connessioni tra sclerostina e

metabolismo delle poliamine Le poliamine putrescina, spermidina e spermina sono policationi naturali strettamente associate a svariati processi cellulari legati ai fenomeni di crescita, proliferazione e differenziamento. Le poliamine hanno un ruolo importante nel differenziamento e nella crescita degli osteoblasti e dei loro precursori, infatti sono in grado di indirizzare la maturazione di elementi staminali verso cellule osteogeniche (Tjabringa et al 2008; Guidotti et al 2013; Lee et al 2013; Borzì et al 2014). Inoltre, sono essenziali per un corretto rimodellamento osseo e per la salute globale dell'osso (Yamamoto et al 2012; Pirnes-Karhu 2015). Le alterazioni dei normali livelli poliaminici in seguito ad un eccessivo catabolismo oltre che alterare l'osteogenesi portano a un cambiamento del fenotipo osseo (Pirnes-Karhu 2015). Una mutazione nel gene della spermina sintasi, che porta ad una profonda alterazione dei livelli poliaminici, è responsabile della sindrome di Snyder-Robinson (SRS), un disordine con disabilità intellettuale caratterizzato da gravi problemi all'apparato scheletrico, come osteoporosi, scoliosi e deformazioni del viso, associati a un basso grado di mineralizzazione ossea (Albert 2015).

L'effetto della sclerostina sui livelli delle poliamine, che abbiamo osservato nel nostro modello sperimentale, dovrà essere confermato anche negli osteoblasti e, possibilmente, anche in vivo, ma potrebbe rappresentare un meccanismo importante attraverso cui la sclerostina esercita la sua azione antianabolica sul tessuto osseo. E' probabile che la causa della diminuzione dei livelli poliaminici sia dovuto all'inibizione dell'ornitina decarbossilasi, ma ovviamente questo aspetto dovrà essere esplorato sperimentalmente. Le nostre osservazioni suggeriscono che la diminuzione del contenuto di putrescina e spermidina che abbiamo notato, non sia associata all'attivazione di apoptosi o a citotossicità, ma potrebbe rappresentare una via per modulare negativamente la proliferazione cellulare e la formazione di cellule osteogeniche.

L'azione protettiva della spermidina è legata ad un meccanismo "non canonico" della poliamina, che è in grado di attivare il processo autofagico. Infatti, negli ultimi anni numerosi studi hanno identificato la spermidina come un induttore di autofagia e hanno attribuito a questo processo svariati effetti esplicati dalla poliamina nell'intero organismo (Eisenberg et al 2009; Michiels et al 2016; Bhukel et al 2017). Questo meccanismo ci porta alla seconda osservazione che abbiamo fatto e cioè che l'attivazione dell'autofagia può bloccare l'azione negativa esercitata dalla sclerostina sulle cellule SaOS2 nel nostro modello sperimentale attraverso l'attivazione dell'apoptosi. E' noto da diversi anni che la sclerostina può attivare un'apoptosi caspasi-dipendente negli osteoblasti (Sutherland et al 2004). Questo effetto non richiede necessariamente alte concentrazioni della citochina, infatti, in un articolo recentissimo, Zou et al (2017) hanno mostrato che il silenziamento della sclerostina in colture di cellule di osteosarcoma causa la diminuzione del processo spontaneo di apoptosi e in questo modo potrebbe favorire la crescita deregolata degli osteoblasti. Pertanto la

sclerostina sembra avere un effetto proapoptotico anche nelle condizioni di normale espressione. E' probabile che l'azione sul meccanismo di apoptosi sia legata al turnover e al rimodellamento dell'osso.

In seguito all'osservazione che l'attivazione dell'autofagia da parte della spermina portava a una protezione delle cellule nei confronti dell'effetto pro-apoptotico della sclerostina, abbiamo voluto provare l'effetto di altri stimoli di cui è nota l'azione di attivatori del processo autofagico, che fossero più direttamente riconducibili all'esercizio fisico. Le Bone morphogenetic proteins (BMPs) hanno un ruolo importante nei processi di crescita cellulare, per quanto riguarda l'osso, sono coinvolte nella proliferazione e nel differenziamento delle cellule progenitrici degli osteoblasti, nel differenziamento degli osteociti e nel rimodellamento osseo (Reddi 1997; Lien et al 2013). Queste proteine sono associate al processo autofagico (Ozeki et al 2016; Kim et al 2016) anche nell'osso ed è stato dimostrato che la stimolazione dei loro recettori attiva l'autofagia in diverse cellule (Lien et al 2013). E' interessante osservare che la segnalazione mediata da BMPs è aumentata come conseguenza dell'esercizio fisico (Iijima et al 2013; Winbanks et al 2013; Siamwala et al 2015; Kim et al 2016). Le BMPs possono attivare la via di segnalazione canonica di Wnt, pertanto le possiamo considerare antagonisti della sclerostina. In accordo con questa visione abbiamo notato che sono in grado di attivare l'autofagia nel nostro modello sperimentale e di contrastare l'effetto negativo della sclerostina.

Un altro stimolo che abbiamo valutato è rappresentato dalla sirtuina SIRT1, che a sua volta è attivata dall'esercizio fisico (Lappalainen 2011). SIRT1 è una deacetilasi che funziona come un potente modulatore del metabolismo ed è in grado di attivare l'autofagia in molte cellule (Guclu et al 2016). La sua azione è correlata alla regolazione del metabolismo e al processo di invecchiamento (Covington e Bajpeyi 2016). Attraverso l'autofagia, SIRT1 ha un effetto protettivo in svariati organi (Ng et al 2013) e può avere effetti importanti anche per il sistema scheletrico: ad esempio può inibire l'apoptosi indotta da numerosi effettori nelle cellule dei dischi intervertebrali (Jiang et al 2014; Miyazaki et al 2015). Anche in questo caso abbiamo osservato che il suo attivatore resveratrolo è in grado di contrastare l'azione pro-apoptotica della sclerostina, attraverso l'attivazione del processo autofagico.

La proteina cinasi dipendente da AMP, AMPK, è considerata uno dei principali, se non il principale regolatore del metabolismo energetico nell'organismo e connette tra di loro svariati processi legati alla disponibilità di nutrienti e alla crescita cellulare (Carling 2017). La AMPK poi è strettamente associata all'esercizio fisico (Niederberger 2015) e la sua capacità di indurre l'attivazione dell'autofagia può avere un ruolo importante negli adattamenti all'allenamento (Dokladny et al 2015; Fritzen et al 2016). Per quanto riguarda l'osso, AMPK è necessaria per mantenere una

normale densità minerale ossea (Quinn et al 2010) e promuove l'osteogenesi (Wang et al 2016), anche se è stato riportato che in particolari condizioni può favorire l'espressione della sclerostina (Yokomoto-Umakoshi et al 2016). Inoltre, la sua funzione come attivatore di autofagia è importante sia per il differenziamento dei precursori in cellule osteogeniche (Pantovic et al 2013), sia per il differenziamento degli osteoblasti (Xi et al 2016), che per la protezione dall'apoptosi indotta da farmaci citotossici (Zhu et al 2013). Abbiamo mostrato che l'attivazione di AMPK è associata anche alla protezione contro l'effetto pro-apoptotico della sclerostina e che questa azione è mediata dall'attivazione dell'autofagia.

L'autofagia è un importante processo cellulare, associato ai meccanismi di sopravvivenza cellulare, ma con molteplici funzioni e coinvolto in numerosi aspetti fisiologici e patologici di numerosi tessuti. Per quanto riguarda l'osso, l'autofagia è in grado di contrastare l'apoptosi nelle cellule di osteosarcoma (Zhao et al 2014) e inoltre, diverse ricerche recenti hanno sottolineato che l'attivazione dell'autofagia è in grado di proteggere gli osteoblasti da diversi insulti citotossici (Lv et al 2015; Liu et al 2016; Yang et al 2016). L'autofagia è anche coinvolta nel differenziamento osteogenico e nel processo di calcificazione (Yang et al 2015; Liu et al 2017) e la soppressione dell'autofagia negli osteociti porta a una situazione analoga all'invecchiamento osseo (Onal et al 2013).

Durante l'esercizio fisico una serie di fattori di stress possono portare a un aumento dei livelli cellulari di autofagia, che rappresenta una risposta adattativa essenziale per il mantenimento della vitalità cellulare in situazione di stress. L'attivazione dell'autofagia associata all'esercizio è nota da diversi decenni (Salas et al., 1980; Salminen et al., 1984), ma solo di recente è risultato evidente il ruolo dell'autofagia in numerosi benefici conseguenti all'attività fisica (Vainshtein et al., 2016). L'attivazione del processo autofagico è necessaria per un corretto adattamento dell'organismo all'esercizio ed è stata mostrata un'aumentata espressione di proteine coinvolte nell'autofagia non solo nel muscolo, ma anche in numerosi altri organi. Infatti, l'attivazione di autofagia in risposta all'esercizio è stata osservata nel muscolo, cuore, fegato, tessuto adiposo, pancreas, osso e anche nel cervello (He et al., 2012; Lira et al., 2013; Kim et al., 2016; Zhang et al., 2013).

La risposta globale all'esercizio è una conferma di come l'attività fisica sia un processo che coinvolge interamente l'organismo. Attualmente, le correlazioni tra attività fisica, autofagia e metabolismo osseo sono ancora limitate, ma è verosimile che lo sviluppo della ricerca in questo campo potrà portare contributi importanti alla conoscenza dei meccanismi che sono alla base dell'osteogenesi e del rimodellamento osseo, processi fondamentali per garantire la salute dell'osso durante l'intero arco della vita.

BIBLIOGRAFIA

- Abdallah, B.M. & Kassem, M. (2012). New factors controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis. *Bone*. **50**, 540-545.
- Ainslie, P.N., Reilly, T. & Westerterp, K.R. (2003). Estimating human energy expenditure. *Sports Med*. **33**, 683-698.
- Albert, J.S., Bhattacharyya, N., Wolfe, L.A., Bone, W.P., Maduro, V., Accardi, J. & Gafni, R. I. (2015). Impaired osteoblast and osteoclast function characterize the osteoporosis of Snyder-Robinson syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. **10**, 27-40.
- Alford, A.I., Jacobs, C.R. & Donahue, H.J. (2003). Oscillating fluid flow regulates gap junction communication in osteocytic MLO-Y4 cells by an ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanism. *Bone*. **33**, 64-70.
- Andreoli, A., Celi, M., Volpe, S.L., Sorge, R. & Tarantino, U. (2012). Long-term effect of exercise on bone mineral density and body composition in post-menopausal ex-elite athletes: a retrospective study. *Eur J Clin Nutr*. **66**, 69-74.
- Appelman-Dijkstra, N.M. & Papapoulos, S.E. (2016). Sclerostin inhibition in the management of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*. **98**, 370-380.
- Ara, I., Vicente-Rodriguez, G., Perez-Gomez, J., Jimenez-Ramirez, J., Serrano-Sanchez, J.A., Dorado, C. & Calbet, J.A.L. (2006). Influence of extracurricular sport activities on body composition and physical fitness in boys: a 3-year longitudinal study. *Int J Obes (Lond)*. **30**, 1062-1071.
- Ascenzi, A. & Bell, G.H. (1971). Bone as a mechanical engineering problem. In *The Biochemistry and Physiology of Bone*. (Bourne, G.H. Ed.) p. 311-346. New York: Academic Press.
- Bachrach, L.K., Guido, D., Katzman, D., Litt, I.F. & Marcus, R. (1990). Decreased bone density in adolescent girls with anorexia nervosa. *Pediatrics*. **86**, 440-447.
- Bachrach, L.K., Katzman, D.K., Litt, I.F., Guido, D. & Marcus, R. (1991). Recovery from osteopenia in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. **72**, 602-606.
- Bailey, D.A., Faulkner, R.A. & McKAY, H.A. (1996). Growth, physical activity, and bone mineral acquisition. *Exerc Sport Sci Rev*. **24**, 233-266.
- Baron, R. & Kneissel, M. (2013). WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*. **19**, 179-192.
- Bass, S.L. (2000). The prepubertal years: a uniquely opportune stage of growth when the skeleton is most responsive to exercise? *Sports Med*. **30**, 73-8.

- Baxter-Jones, A.D.G., Helms, P., Baines-Preece, J. & Preece, M. (1994). Menarche in intensively trained gymnasts, swimmers and tennis players. *Ann Hum Biol.* **21**, 407-415.
- Baxter-Jones, A.D., Kontulainen, S.A., Faulkner, R.A., & Bailey, D.A. (2008). A longitudinal study of the relationship of physical activity to bone mineral accrual from adolescence to young adulthood. *Bone.* **43**, 1101-1107.
- Bergmann, P., Body, J.J., Boonen, S., Boutsen, Y., Devogelaer, J.P., Goemaere S., Kaufman J., Reginster J.Y. & Rozenberg S. (2010). Loading and skeletal development and maintenance. *J Osteoporos.* **2011**, 1-15.
- Bhukel, A., Madeo, F. & Sigrist, S. (2017). Spermidine boosts autophagy to protect from synapse aging. *Autophagy.* **13**, 444-445.
- Blair, S.N., Kohl, H.W., Gordon, N.F. & Paffenbarger Jr, R.S. (1992). How much physical activity is good for health? *Annu Rev Public Health.* **13**, 99-126.
- Blimkie, C.J.R., Chilibeck, P. & Davison, S. (1995). Bone mineralization: endocrine, nutrition, and physical activity influences during the lifespan. In *Perspectives in exercise science and sports medicine, exercise and the female—a lifespan perspective*. (Bar-Or, O. Ed.) p. 73-145. Cooper, in Press.
- Bonjour, J.P., Theintz, G., Buchs, B., Slosman, D. & Rizzoli, R. (1991). Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J Clin Endocrinol Metab.* **73**, 555-563.
- Bortz, W.M. (1985). Physical exercise as an evolutionary force. *J Human Evol.* **14**, 145-155.
- Borzì, R.M., Guidotti, S., Minguzzi, M., Facchini, A., Platano, D., Trisolino, G. & Facchini, A. (2014). Polyamine delivery as a tool to modulate stem cell differentiation in skeletal tissue engineering. *Amino acids.* **46**, 717-728.
- Bouxsein, M.L., Karasik, D. (2006). Bone geometry and skeletal fragility. *Curr Osteoporos Rep.* **4**, 49-56.
- Burr, D.B., Schaffler, M.B., Yang, K.H., Lukoschek, M., Sivaneri, N., Blaha, J.D. & Radin, E.L. (1989). Skeletal change in response to altered strain environments: Is woven bone a response to elevated strain? *Bone.* **10**, 223-233.
- Burr, D.B. (1992). Orthopedic principles of skeletal growth, modeling and remodeling. In *Bone dynamics in orthodontic and orthopedic treatment, craniofacial growth series*. (Carlson, D. Ed.) p. 15-49. Ann Arbor, MI: Center For Human Growth And Development.
- Cappadone, C., Stefanelli, C., Malucelli, E., Zini, M., Onofrillo, C., Locatelli, A. & Graziadio, A. (2015). p53-dependent and p53-independent anticancer activity of a new indole derivative in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **467**, 348-353.
- Carling, D. (2017). AMPK signalling in health and disease. *Curr Opin Cell Biol.* **45**, 31-37.
- Carter, D.R. & Orr, T.E. (1992). Skeletal development and bone functional adaptation. *J Bone Miner Res.* **7**, S389-S395.

- Carter, D.R., Van der Meulen, M.C.H. & Beaupre, G.S. (1996). Mechanical factors in bone growth and development. *Bone*. **18**, S5-S10.
- Cassell, C., Benedict, M. & Specker, B. (1996). Bone mineral density in elite 7-to 9-yr-old female gymnasts and swimmers. *Med Sci Sports Exerc.* **28**, 1243-1246.
- Chen, D., Xia, D., Pan, Z., Xu, D., Zhou, Y., Wu, Y. & Zhang, J.J. (2016). Metformin protects against apoptosis and senescence in nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration in vivo. *Cell Death Dis.* **7**, e2441-e2454.
- Cheng, S., Völgyi, E., Tylavsky, F. A., Lyytikäinen, A., Törmäkangas, T., Xu, L. & Kujala, U. M. (2009). Trait-specific tracking and determinants of body composition: a 7-year follow-up study of pubertal growth in girls. *BMC Med.* **7**, 5-17.
- Chen, X., Ko, L.J., Jayaraman, L. & Prives, C. (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* **10**, 2438-2451.
- Choi, Y. & Kim, J.J. (2003). B cells activated in the presence of Th1 cytokines inhibit osteoclastogenesis. *Exp Mol Med.* **35**, 385-392
- Courteix, D., Lespessailles, E., Obert, P. & Benhamou, C.L. (1999). Skull bone mass deficit in prepubertal highly-trained gymnast girls. *Int J Sports Med.* **20**, 328-333.
- Courteix, D., Rieth, N., Thomas, T., Van Praagh, E., Benhamou, C.L., Collomp, K. & Jaffre, C. (2007). Preserved bone health in adolescent elite rhythmic gymnasts despite hypoleptinemia. *Horm Res Paediatr.* **68**, 20-27.
- Covington, J.D. & Bajpeyi, S. (2016). The sirtuins: markers of metabolic health. *Mol Nutr Food Res.* **60**, 79-91.
- Delgado-Calle, J., Sato, A.Y. & Bellido, T. (2016). Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone.* **96**, 29-37.
- Del Rio, L., Carrascosa, A., Pons, F., Gusinye, M., Yeste, D. & Domenech, F.M. (1994). Bone mineral density of the lumbar spine in white Mediterranean Spanish children and adolescents: changes related to age, sex, and puberty. *Pediatr Res.* **35**, 362-366.
- Di Cagno, A., Baldari, C., Battaglia, C., Brasili, P., Merni, F., Piazza, M. & Guidetti, L. (2008). Leaping ability and body composition in rhythmic gymnasts for talent identification. *J Sports Med Phys Fitness.* **48**, 341-346.
- DiGirolamo, D.J., Clemens, T.L. & Kousteni, S. (2012). The skeleton as an endocrine organ. *Nat Rev Rheumat.* **8**, 674-683.
- Dokladny, K., Myers, O.B. & Moseley, P.L. (2015). Heat shock response and autophagy—cooperation and control. *Autophagy.* **11**, 200-213.
- Donoso, M., Muñoz-Calvo, M., Barrios, V., Garrido, G., Hawkins, F. & Argente, J. (2010).

Increased circulating adiponectin levels and decreased leptin/soluble leptin receptor ratio throughout puberty in female ballet dancers: association with body composition and the delay in puberty. *Eur J Endocrinol.* **162**, 905-911.

- Douda, H.T., Toubekis, A.G., Avloniti, A.A. & Tokmakidis, S.P. (2008). Physiological and anthropometric determinants of rhythmic gymnastics performance. *Int J Sports Physiol Perform.* **3**, 41-54.
- Drake, M.T. & Khosla, S. (2016). Hormonal and systemic regulation of sclerostin. *Bone.* **96**, 8-17.
- Drake, W.M., Carroll, P.V., Maher, K.T., Metcalfe, K.A., Camacho-Hubner, C., Shaw, N.J. & Monson, J.P. (2003). The effect of cessation of growth hormone (GH) therapy on bone mineral accretion in GH-deficient adolescents at the completion of linear growth. *J Clin End Met.* **88**, 1658-1663.
- Duffy, A., Le, J., Sausville, E. & Emadi, A. (2015). Autophagy modulation: a target for cancer treatment development. *Cancer Chemother Pharmacol.* **75**, 439-447.
- Duncan, C.S., Blimkie, C.J., Cowell, C.T., Burke, S.T., Briody, J.N. & Howman-Giles, R.O.B.E. R. T. (2002). Bone mineral density in adolescent female athletes: relationship to exercise type and muscle strength. *Med Sc Sports Exerc.* **34**, 286-294.
- Duncan, R.L. & Turner, C.H. (1995). Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int.* **57**, 344-358.
- Eaton, S.B., Konner, M. & Shostak, M. (1988). Stone agers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective. *Am J Med.* **84**, 739-749.
- Eaton, S.B. & Nelson, D.A. (1991). Calcium in evolutionary perspective. *Am J Clin Nutr.* **54**, 281S-287S.
- Ehrlich, P.J. & Lanyon, L.E. (2002). Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteop Int.* **13**, 688-700.
- Ehrnborg, C., Lange, K.H.W., Dall, R., Christiansen, J.S., Lundberg, P.A., Baxter, R.C. & Longobardi, S. (2003). The growth hormone/insulin-like growth factor-I axis hormones and bone markers in elite athletes in response to a maximum exercise test. *J Clin Endoc Met.* **88**, 394-401.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D. & Fussi, H. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol.* **11**, 1305-1314.
- Etherington, J., Harris, P.A., Nandra, D., Hart, D.J., Wolman, R.L., Doyle, D.V. & Spector T.D. (1996). The effect of weight-bearing exercise on bone mineral density: a study of female elite athletes and the general population. *J Bone Miner Res.* **11**, 1333-1338.
- Fazeli, P.K., Ackerman, K.E., Pierce, L., Guereca, G., Bouxsein, M. & Misra, M. (2013). Sclerostin and Pref-1 have differential effects on bone mineral density and strength parameters in adolescent athletes compared with non-athletes. *Osteoporos Int.* **24**, 2433-2440.

- Finkelstein, J.S., Neer, R.M., Biller, B.M., Crawford, J.D. & Klibanski, A. (1992). Osteopenia in men with a history of delayed puberty. *N Engl J Med.* **326**, 600-604.
- Forwood, M.R. & Burr, D.B. (1993). Physical activity and bone mass: exercises in futility? *Bone Miner.* **21**, 89-112.
- Fritzen, A.M., Madsen, A.B., Kleinert, M., Treebak, J.T., Lundsgaard, A.M., Jensen, T.E. & Frøsig, C. (2016). Regulation of autophagy in human skeletal muscle: effects of exercise, exercise training and insulin stimulation. *J Physiol.* **594**, 745-761.
- Frost, H. (1987). Bone “mass” and the “mechanostat”: a proposal. *Anat Rec.* **219**, 1-9.
- Frost, H. (1989). Mechanical usage, bone mass, bone fragility: a brief overview. In *Clinical disorders of bone and mineral metabolism*. (Kleerekoper, M. Ed.) p. 15-40. New York: Liebert.
- Frost, H. (1995). Perspectives: On a “paradigm shift” developing in skeletal science. *Calcif Tissue Int.* **56**, 1-4.
- Fuchs, R.K., Bauer, J.J. & Snow, C.M. (2001). Jumping improves hip and lumbar spine bone mass in prepubescent children: a randomized controlled trial. *J Bone Miner Res.* **16**, 148-156.
- Fultz, K.E. & Gerner, E.W. (2002). APC-dependent regulation of ornithine decarboxylase in human colon tumor cells. *Mol Carcinog.* **34**, 10-18.
- Garnero, P. (2014). New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. *Bone.* **66**, 46-55.
- Genant, H.K., Cooper, C., Poor, G., Reid, I., Ehrlich, G., Kanis, J., *et al.* (1999). Short report: interim report and recommendations of the World Health Organization task-force for osteoporosis. *Osteoporos Int.* **10**, 259-264.
- Georgopoulos, N.A., Markou, K.B., Theodoropoulou, A., Vagenakis, G.A., Benardot, D., Leglise, M. & Vagenakis, A.G. (2001). Height velocity and skeletal maturation in elite female rhythmic gymnasts. *J Clin Endocrinol Metab.* **86**, 5159-5164.
- Georgopoulos, N.A., Roupas, N.D., Theodoropoulou, A., Tsekouras, A., Vagenakis, A.G. & Markou, K.B. (2010). The influence of intensive physical training on growth and pubertal development in athletes. *Ann N Y Acad Sci.* **1205**, 39-44.
- Georgopoulos, N.A., Theodoropoulou, A., Roupas, N.D., Rottstein, L., Tsekouras, A., Mylonas, P. & Leglise, M. (2012). Growth velocity and final height in elite female rhythmic and artistic gymnasts. *Hormones.* **11**, 61-69.
- Geusens, P., Dequeker, J., Verstraeten, A. & Nijs, J. (1986). Age-, sex-, and menopause-related changes of vertebral and peripheral bone: population study using dual and single photon absorptiometry and radiogrammetry. *J Nucl Med.* **27**, 1540-1549.
- Gillespie, M.T. (2007). Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. *Arthritis Res Ther.* **9**, 1-3.

- Gregory, C.A., Gunn, W.G., Peister, A. & Prockop, D.J. (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* **329**, 77-84.
- Grimston, S.K., Morrison, K., Harder, J.A. & Hanley, D.A. (1992). Bone mineral density during puberty in western Canadian children. *Bone Miner.* **19**, 85-96.
- Grimston, S.K., Willows, N.D. & Hanley, D.A. (1993). Mechanical loading regime and its relationship to bone mineral density in children. *Med Sci Sports Exerc.* **25**, 1203-1210.
- Grumati, P., Coletto, L., Sabatelli, P., Cescon, M., Angelin, A., Bertaggia, E. & Maraldi, N.M. (2010). Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat Med.* **16**, 1313-1320.
- Gruodytė, R., Jürimäe, J., Cicchella, A., Stefanelli, C., Passariello, C. & Jürimäe, T. (2010). Adipocytokines and bone mineral density in adolescent female athletes. *Acta Paediatr.* **99**, 1879-1884.
- Guadalupe-Grau, A., Fuentes, T., Guerra, B. & Calbet, J. A. (2009). Exercise and bone mass in adults. *Sports Med.* **39**, 439-468.
- Guclu, A., Erdur, F.M. & Turkmen, K. (2016). The emerging role of sirtuin 1 in cellular metabolism, diabetes mellitus, diabetic kidney disease and hypertension. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* **124**, 131-139.
- Gudi, S., Huvar, I., White, C.R., McKnight, N.L., Dusserre, N., Boss, G.R. & Frangos, J.A. (2003). Rapid activation of Ras by fluid flow is mediated by Gαq and Gβγ subunits of heterotrimeric G proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23**, 994-1000.
- Guidotti, S., Facchini, A., Platano, D., Olivotto, E., Minguzzi, M., Trisolino, G. & Facchini, A. (2013). Enhanced Osteoblastogenesis of Adipose-Derived Stem Cells on Spermine Delivery via β-Catenin Activation. *Stem Cells Dev.* **22**, 1588-1601.
- Gunter, K.B., Almstedt, H.C. & Janz, K.F. (2012). Physical activity in childhood may be the key to optimizing lifespan skeletal health. *Exerc Sport Sc Rev.* **40**, 13-21.
- Hallal, P.C., Victora, C.G., Azevedo, M.R. & Wells, J.C. (2006). Adolescent physical activity and health. *Sports Med.* **36**, 1019-1030.
- Hardie, D.G. (2011). Energy sensing by the AMP-activated protein kinase and its effects on muscle metabolism. *Proc Nutr Soc.* **70**, 92-99.
- He, C., Sumpter, Jr, R. & Levine, B. (2012). Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy.* **8**, 1548-1551.
- Heinonen, A., McKay, H.A., Whittall, K.P., Forster, B.B. & Khan, K.M. (2001). Muscle cross-sectional area is associated with specific site of bone in prepubertal girls: a quantitative magnetic resonance imaging study. *Bone.* **29**, 388-392.
- Helge, E.W. & Kanstrup, I.L. (2002). Bone density in female elite gymnasts: impact of muscle strength and sex hormones. *Med Sci Sports Exerc.* **34**, 174-180.

- Henry, Y.M., Fatayerji, D. & Eastell, R. (2004). Attainment of peak bone mass at the lumbar spine, femoral neck and radius in men and women: relative contributions of bone size and volumetric bone mineral density. *Osteop Int.* **15**, 263-273.
- Hind, K., Burrows, M. (2007). Weight-bearing exercise and bone mineral accrual in children and adolescents: a review of controlled trials. *Bone.* **40**, 14-27.
- Holmbeck, K., Bianco, P., Pidoux, I., Inoue, S., Billinghamurst, R.C., Wu, W. & Poole, A.R. (2005). The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci.* **118**, 147-156.
- Honasoge, M., Rao, A.D. & Rao, S.D. (2014). Sclerostin: recent advances and clinical implications. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* **21**, 437-446.
- Hsu, Y.H., Venners, S.A., Terwedow, H.A., Feng, Y., Niu, T., Li, Z. & Rosen, C.J. (2006). Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. *Am J Clin Nutr.* **83**, 146-154.
- Huang, T.H., Lin, S.C., Chang, F.L., Hsieh, S.S., Liu, S.H. & Yang, R.S. (2003). Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol.* **95**, 300-307.
- Hui, S.L., Johnston Jr, C.C. & Mazess, R.B. (1984). Bone mass in normal children and young adults. *Growth.* **49**, 34-43.
- Iijima, H., Ito, A., Nagai, M., Tajino, J., Yamaguchi, S., Kiyan, W. & Nishitani, K. (2016). Physiological exercise loading suppresses post-traumatic osteoarthritis progression via an increase in bone morphogenetic proteins expression in an experimental rat knee model. *Osteoarthritis Cartilage.* Article in Press, 1-12.
- Jaffre, C., Courteix, D., Dine, G., Lac, G., Delamarche, P. & Benhamou, L. (2001). High-impact loading training induces bone hyperresorption activity in young elite female gymnasts. *J Pediatr Endocrinol Metab.* **14**, 75-84.
- Jiang, W., Zhang, X., Hao, J., Shen, J., Fang, J., Dong, W. & Lin, L. (2014). SIRT1 protects against apoptosis by promoting autophagy in degenerative human disc nucleus pulposus cells. *Sci Rep.* **4**, 7456-7464.
- Johnson, K., Hashimoto, S., Lotz, M., Pritzker, K., Goding, J. & Terkeltaub, R. (2001). Up-regulated expression of the phosphodiesterase nucleotide pyrophosphatase family member PC-1 is a marker and pathogenic factor for knee meniscal cartilage matrix calcification. *Arthritis Rheum.* **44**, 1071-1081.
- Johnston, C.C. & Slemenda, C.W. (1993). Risk assessment: theoretical considerations. *Am J Med.* **95**, S2-S5.
- Jürimäe, J. (2010). Interpretation and application of bone turnover markers in children and adolescents. *Curr Opin Pediatr.* **22**, 494-500.
- Jürimäe, J., Gruodytė, R., Saar, M., Cicchella, A., Stefanelli, C., Passariello, C. & von Duvillard,

- S.P. (2011). Plasma visfatin and adiponectin concentrations in physically active adolescent girls: relationships with insulin sensitivity and body composition variables. *J Pediatr Endocrinol Metab.* **24**, 419-425.
- Jürimäe, J., Tillmann, V., Cicchella, A., Stefanelli, C., Vosoberg, K., Tamm, A. L. & Jürimäe, T. (2016). Increased sclerostin and preadipocyte factor-1 levels in prepubertal rhythmic gymnasts: associations with bone mineral density, body composition, and adipocytokine values. *Osteoporos Int.* **27**, 1239-1243.
- Kalkwarf, H.J., Zemel, B.S., Gilsanz, V., Lappe, J. M., Horlick, M., Oberfield, S. & Shepherd, J.A. (2007). The bone mineral density in childhood study: bone mineral content and density according to age, sex, and race. *J Clin Endoc Metab.* **92**, 2087-2099.
- Kanis, J., Melton, L.J., Christiansen, C., Johnston, C.C. & Khaltaev, N. (1994). The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* **9**, 1137-1141.
- Kim, J.H., Liu, X., Wang, J., Chen, X., Zhang, H., Kim, S.H. & Zhang, J. (2013). Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* **5**, 13-31.
- Kim, J.S., Lee, Y.H. & Yi, H.K. (2016). Gradual downhill running improves age-related skeletal muscle and bone weakness: implication of autophagy and bone morphogenetic proteins. *Exp Physiol.* **101**, 1528-1540.
- Klentrou, P. & Plyley, M. (2003). Onset of puberty, menstrual frequency, and body fat in elite rhythmic gymnasts compared with normal controls. *Br J Sports Med.* **37**, 490-494.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A. & Adhietty, P.J. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* **12**, 1-222.
- Kong, Y.Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S. & Wong, T. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* **402**, 43-47.
- Korpelainen, R., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Heikkinen, J., Väänänen, K. & Korpelainen, J. (2006). Effect of impact exercise on bone mineral density in elderly women with low BMD: a population-based randomized controlled 30-month intervention. *Osteop Int.* **17**, 109-118.
- Krall, E.A. & Dawson-Hughes, B. (1993). Heritable and life-style determinants of bone mineral density. *J Bone Miner Res.* **8**, 1-9.
- Krentz, E.M. & Warschburger, P. (2013). A longitudinal investigation of sports-related risk factors for disordered eating in aesthetic sports. *Scand J Med Sci Sports.* **23**, 303-310.
- Krustrup, P., Dvorak, J., Junge, A. & Bangsbo, J. (2010). Executive summary: the health and fitness benefits of regular participation in small-sided football games. *Scand J Med Sci Sports.* **20**, 132-135.
- Kubota, T., Michigami, T. & Ozono, K. (2009). Wnt signaling in bone metabolism. *J Bone Miner Metab.* **27**, 265-271.

- Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T. & Hsu, H. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. **93**, 165-176.
- Lai, E.H.H., Chang, J.Z.C., Yao, C.C. J., Tsai, S.J., Liu, J.P., Chen, Y.J. & Lin, C.P. (2008). Relationship between age at menarche and skeletal maturation stages in Taiwanese female orthodontic patients. *J Form Med Assoc*. **107**, 527-532.
- Lanyon, L.E. (1973). Analysis of surface bone strain in the calcaneus of sheep during normal locomotion: strain analysis of the calcaneus. *J Biomech*. **6**, 41-49.
- Lappalainen, Z. (2010). Sirtuins: a family of proteins with implications for human performance and exercise physiology. *Res Sports Med*. **19**, 53-65.
- Larsen, C.S. (1987). Bioarchaeological interpretations of subsistence economy and behavior from human skeletal remains. *Adv Archaeol Method Theory*. **10**, 339-445.
- Lee, M.J., Chen, Y., Huang, Y.P., Hsu, Y.C., Chiang, L.H., Chen, T.Y. & Wang, G.J. (2013). Exogenous polyamines promote osteogenic differentiation by reciprocally regulating osteogenic and adipogenic gene expression. *J Cell Biochem*. **114**, 2718-2728.
- Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C. & Zhang, Z. (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. **130**, 456-469.
- Lien, S.C., Chang, S.F., Lee, P.L., Wei, S.Y., Chang, M.D.T., Chang, J.Y. & Chiu, J.J. (2013). Mechanical regulation of cancer cell apoptosis and autophagy: roles of bone morphogenetic protein receptor, Smad1/5, and p38 MAPK. *Biochim Biophys Acta*. **1833**, 3124-3133.
- Lira, V.A., Okutsu, M., Zhang, M., Greene, N.P., Laker, R.C., Breen, D.S. & Yan, Z. (2013). Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J*. **27**, 4184-4193.
- Liu, W., Dai, N., Wang, Y., Xu, C., Zhao, H., Xia, P. & Zhu, J. (2016). Role of autophagy in cadmium-induced apoptosis of primary rat osteoblasts. *Sci Rep*. **6**, 20404-20412.
- Liu, X., Wang, Y., Cao, Z., Dou, C., Bai, Y., Liu, C. & Fei, J. (2017). Staphylococcal lipoteichoic acid promotes osteogenic differentiation of mouse mesenchymal stem cells by increasing autophagic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. **485**, 421-426.
- Loucks, A.B. & Horvath, S.M. (1985). Athletic amenorrhea: a review. *Med Sci Sports Exerc*. **17**, 56-72.
- Loucks, A.B. (2003). Energy availability, not body fatness, regulates reproductive function in women. *Exerc Sport Sc Rev*. **31**, 144-148.
- Lu, P.W., Briody, J.N., Ogle, G.D., Morley, K., Humphries, I.R., Allen, J. & Cowell, C.T. (1994). Bone mineral density of total body, spine, and femoral neck in children and young adults: a cross-sectional and longitudinal study. *J Bone Miner Res*. **9**, 1451-1458.
- Lv, X.H., Zhao, D.H., Cai, S.Z., Luo, S.Y., You, T., Xu, B.L. & Chen, K. (2015). Autophagy plays

- a protective role in cell death of osteoblasts exposure to lead chloride. *Toxicol Lett.* **239**, 131-140.
- MacKelvie, K.J., Khan, K.M. & McKay, H.A. (2002). Is there a critical period for bone response to weight-bearing exercise in children and adolescents? A systematic review. *Br J Sports Med.* **36**, 250-257.
- Maïmoun, L. & Sultan, C. (2011). Effects of physical activity on bone remodeling. *Metabolism.* **60**, 373-388.
- Maïmoun, L., Coste, O., Mura, T., Philibert, P., Galtier, F., Mariano-Goulart, D. & Sultan, C. (2013). Specific bone mass acquisition in elite female athletes. *J Clin Endocrinol Metab.* **98**, 2844-2853.
- Malina, R.M., Bouchard, C. & Bar-Or, O. (2004). Growth, maturation, and physical activity. *Human Kinetics.*
- Margulies, J.Y., Simkin, A., Leichter, I., Bivas, A., Steinberg, R., Giladi, M. & Milgrom, C. (1986). Effect of intense physical activity on the bone-mineral content in the lower limbs of young adults. *J Bone Joint Surg Am.* **68**, 1090-1093.
- Markings, B. (2004). The skeletal system.
- Martinsen, M., Bratland-Sanda, S., Eriksson, A.K. & Sundgot-Borgen, J. (2010). Dieting to win or to be thin? A study of dieting and disordered eating among adolescent elite athletes and non-athlete controls. *Br J Sports Med.* **44**, 70-76.
- Matkovic, V., Fontana, D., Tominac, C., Goel, P. & Chesnut, C.H. (1990). Factors that influence peak bone mass formation: a study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent females. *Am Journal Clin Nutr.* **52**, 878-888.
- Matkovic, V., Jelic, T., Wardlaw, G.M., Ilich, J.Z., Goel, P.K., Wright, J.K. & Heaney, R.P. (1994). Timing of peak bone mass in Caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. Inference from a cross-sectional model. *J Clin Invest.* **93**, 799-808.
- Mauro, L.J., Olmsted, E.A., Skrobacz, B.M., Mourey, R.J., Davis, A.R. & Dixon, J.E. (1994). Identification of a hormonally regulated protein tyrosine phosphatase associated with bone and testicular differentiation. *J Biol Chem.* **269**, 30659-30667.
- Michiels, C.F., Kurdi, A., Timmermans, J.P., De Meyer, G.R. & Martinet, W. (2016). Spermidine reduces lipid accumulation and necrotic core formation in atherosclerotic plaques via induction of autophagy. *Atherosclerosis.* **251**, 319-327.
- Misigoj-Durakovic, M., Vucetic, V., Durakovic, Z., Wolf-Cvitak, J., Matkovic, B., Corovic, N. & Bonevski, A. (2005). Body physique and composition in premenarchal ballerinas and female athletes in aesthetic sports. *Med Probl Perform Art.* **20**, 175-179.
- Miyazaki, S., Kakutani, K., Yurube, T., Maeno, K., Takada, T., Zhang, Z. & Matsushita, T. (2015).

- Recombinant human SIRT1 protects against nutrient deprivation-induced mitochondrial apoptosis through autophagy induction in human intervertebral disc nucleus pulposus cells. *Arthritis Res Ther.* **17**, 253-265.
- Mizushima, N. & Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* **147**, 728-741.
- Morin, S., Tsang, J. F. & Leslie, W. D. (2009). Weight and body mass index predict bone mineral density and fractures in women aged 40 to 59 years. *Osteop Int.* **20**, 363-370.
- Müller, W.E., Schröder, H.C., Schlossmacher, U., Grebenjuk, V.A., Ushijima, H. & Wang, X. (2013). Induction of carbonic anhydrase in SaOS-2 cells, exposed to bicarbonate and consequences for calcium phosphate crystal formation. *Biomaterials.* **34**, 8671-8680.
- Nagasaki, K., Kikuchi, T., Hiura, M. & Uchiyama, M. (2004). Obese Japanese children have low bone mineral density after puberty. *J Bone Miner Metab* **22**, 376-381.
- Ng, F. & Tang, B.L. (2013). Sirtuins' modulation of autophagy. *J Cell Physiol.* **228**, 2262-2270.
- Niederberger, E., King, T.S., Russe, O.Q. & Geisslinger, G. (2015). Activation of AMPK and its impact on exercise capacity. *Sports Med.* **45**, 1497-1509.
- Nieves, J.W., Formica, C., Ruffing, J., Zion, M., Garrett, P., Lindsay, R. & Cosman, F. (2005). Males have larger skeletal size and bone mass than females, despite comparable body size. *J Bone Min Res.* **20**, 529-535.
- Ohlsson, C., Isgaard, J., Törnell, J., Nilsson, A., Isaksson, O.G.P. & Lindahl, A. (1993). Endocrine regulation of longitudinal bone growth. *Acta Paediatr.* **82**, 33-40.
- Onal, M., Piemontese, M., Xiong, J., Wang, Y., Han, L., Ye, S. & Jilka, R.L. (2013). Suppression of autophagy in osteocytes mimics skeletal aging. *J Biol Chem.* **288**, 17432-17440.
- Ozeki, N., Mogi, M., Hase, N., Hiyama, T., Yamaguchi, H., Kawai, R. & Nakata, K. (2016). Bone morphogenetic protein-induced cell differentiation involves Atg7 and Wnt16 sequentially in human stem cell-derived osteoblastic cells. *Exp Cell Res.* **347**, 24-41.
- Pantovic, A., Krstic, A., Janjetovic, K., Kocic, J., Harhaji-Trajkovic, L., Bugarski, D. & Trajkovic, V. (2013). Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone.* **52**, 524-531.
- Parm, A.L., Saar, M., Pärna, K., Jürimäe, J., Maasalu, K., Neissaar, I. & Jürimäe, T. (2011). Relationships between anthropometric, body composition and bone mineral parameters in 7-8-year-old rhythmic gymnasts compared with controls. *Coll Antropol.* **35**, 739-745.
- Passariello, C.L., Gruodytė, R., Hiio, K., Mäestu, J., Jürimäe, J., Saar, M. & Jürimäe, T. (2010). ADIPOQ SNP45 associated with lean body mass in physically active normal weight adolescent girls. *Am J Hum Biol.* **22**, 813-818.
- Passariello, C.L., Gottardi, D., Cetrullo, S., Zini, M., Campana, G., Tantini, B. & Stefanelli, C.

- (2012). Evidence that AMP-activated protein kinase can negatively modulate ornithine decarboxylase activity in cardiac myoblasts. *Biochim Biophys Acta*. **1823**, 800-807.
- Phillips, S., Fox, N., Jacobs, J. & Wright, W.E. (1988). The direct medical costs of osteoporosis for American women aged 45 and older, *Bone*. **9**, 271-279.
- Pirnes-Karhu, S., Määttä, J., Finnilä, M., Alhonen, L. & Uimari, A. (2015). Overexpression of spermidine/spermine N 1-acetyltransferase impairs osteoblastogenesis and alters mouse bone phenotype. *Transgenic Res*. **24**, 253-265.
- Pirro, M., Fabbriani, G., Leli, C., Callarelli, L., Manfredelli, M. R., Fioroni, C. & Mannarino, E. (2010). High weight or body mass index increase the risk of vertebral fractures in postmenopausal osteoporotic women. *J Bone Min Metab*. **28**, 88-93.
- Preece, M.A., Pan, H. & Ratcliffe, S.G. (1992). Auxological aspects of male and female puberty. *Acta Paediatr*. **383**, 11-13.
- Prideaux, M., Wijenayaka, A.R., Kumarasinghe, D.D., Ormsby, R.T., Evdokiou, A., Findlay, D.M. & Atkins, G.J. (2014). SaOS2 osteosarcoma cells as an in vitro model for studying the transition of human osteoblasts to osteocytes. *Calcif Tissue Int*. **95**, 183-193.
- Quinn, J.M., Tam, S., Sims, N.A., Saleh, H., McGregor, N.E., Poulton, I.J. & van Denderen, B.J.W. (2010). Germline deletion of AMP-activated protein kinase β subunits reduces bone mass without altering osteoclast differentiation or function. *FASEB J*. **24**, 275-285.
- Ragab, A.A., Nalepka, J.L., Bi, Y. & Greenfield, E.M. (2002). Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. **283**, C679-C687.
- Recker, R.R., Davies, K.M., Hinders, S.M., Heaney, R.P., Stegman, M.R. & Kimmel, D.B. (1992). Bone gain in young adult women. *Jama*. **268**, 2403-2408.
- Reddi, A.H. (1997). Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev*. **8**, 11-20.
- Rial, N.S., Meyskens, F.L. & Gerner, E.W. (2009). Polyamines as mediators of APC-dependent intestinal carcinogenesis and cancer chemoprevention. *Essays Biochem*. **46**, 111-124.
- Rico, H., Revilla, M., Villa, L.F., Gomez-Castresana, F. & Alvarez del Buergo, M. (1993). Body composition in postpubertal boy cyclists. *J Sports Med Phys Fitness*. **33**, 278-281.
- Rico, H., Revilla, M., Villa, L.F., Hernandez, E.R., de Buergo, M.A. & Villa, M. (1993). Body composition in children and Tanner's stages: a study with dual-energy x-ray absorptiometry. *Metabolism*. **42**, 967-970.
- Ringe, J.D. (1982). Precision and clinical application of peripheral single photon absorptiometry. In *Non-invasive bone measurements: methodological problems*. (Johnston, C.C. Ed.) p. 47-54. Oxford, England: IRL Press.
- Rizzoli, R., Bianchi, M.L., Garabédian, M., McKay, H.A. & Moreno, L.A. (2010). Maximizing

- bone mineral mass gain during growth for the prevention of fractures in the adolescents and the elderly. *Bone*. **46**, 294-305.
- Robertson, J.D., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. (2000). Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct. Biol.* **129**, 346-358.
- Robling, A.G., Castillo, A.B. & Turner, C.H. (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Ann. Rev Biomed Eng.* **8**, 455-498.
- Rocher, E., Chappard, C., Jaffre, C., Benhamou, C. L. & Courteix, D. (2008). Bone mineral density in prepubertal obese and control children: relation to body weight, lean mass, and fat mass. *J Bone Miner Metab.* **26**, 73-78.
- Saito, M. & Marumo, K. (2010). Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteop Intmorin.* **21**, 195-214.
- Salas, M., Tuchweber, B. & Kourounakis, P. (1980). Liver ultrastructure during acute stress. *Pathol Res Pract.* **167**, 217-233.
- Salminen, A. & Vihko, V. (1984). Autophagic response to strenuous exercise in mouse skeletal muscle fibers. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* **45**, 97-106.
- Scerpella, T.A., Davenport, M., Morganti, C.M., Kanaley, J.A. & Johnson, L.M. (2003). Dose related association of impact activity and bone mineral density in pre-pubertal girls. *Calcif Tissue Int.* **72**, 24-31.
- Schoeman, M.A., Moester, M.J., Oostlander, A.E., Kaijzel, E.L., Valstar, E.R., Nelissen, R.G. & Rooij, K.E.D. (2015). Inhibition of GSK3 β stimulates BMP signaling and decreases SOST expression which results in enhanced osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* **116**, 2938-2946.
- Scott, J.P., Sale, C., Greeves, J. P., Casey, A., Dutton, J. & Fraser, W.D. (2011). The role of exercise intensity in the bone metabolic response to an acute bout of weight-bearing exercise. *J Appl Physiol.* **110**, 423-432.
- Schwab, P. & Scalapino, K. (2011). Exercise for bone health: rationale and prescription. *Curr Opin Rheumatol.* **23**, 137-141.
- Seeman, E. (1994). Reduced bone density in women with fractures: contribution of low peak bone density and rapid bone loss. *Osteoporos Int.* **4**, S15-S25.
- Seeman, E. & Delmas, P.D. (2006). Bone quality: the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med.* **354**, 2250-61.
- Semb, H. (1969). Experimental limb disuse and bone blood flow. *Acta Orthop Scand.* **40**, 552-562.
- Sharifi, M., Ereifej, L. & Lewiecki, E.M. (2015). Sclerostin and skeletal health. *Rev Endocr Metab Disord.* **16**, 149-156.
- Siamwala, J.H., Rajendran, S. & Chatterjee, S. (2015). Chapter Eight-Strategies of Manipulating BMP Signaling in Microgravity to Prevent Bone Loss. *Vitam Horm.* **99**, 249-272.

- Sledge, C. & Rubin, C. (1989). Formation and resorption of bone. In *Textbook of rheumatology*. (Kelley, W. Ed.) p. 54-75. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Slemenda, C.W., Reister, T.K., Hui, S.L., Miller, J.Z., Christian, J.C. & Johnston, C.C. (1994). Influences on skeletal mineralization in children and adolescents: evidence for varying effects of sexual maturation and physical activity. *J Pediatr*. **125**, 201-207.
- Snow-Harter, C.M. (1994). Bone health and prevention of osteoporosis in active and athletic women. *Clin Sports Med*. **13**, 389-404.
- Sotiropoulos, A., Ohanna, M., Kedzia, C., Menon, R.K., Kopchick, J.J., Kelly, P.A. & Pende, M. (2006). Growth hormone promotes skeletal muscle cell fusion independent of insulin-like growth factor 1 up-regulation. *Proc Nat Acad Sc*. **103**, 7315-7320.
- Stashenko, P.H.I.L.I.P., Dewhirst, F.E., Peros, W.J., Kent, R.L. & Ago, J.M. (1987). Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol*. **138**, 1464-1468.
- Stefanelli, C., Bonavita, F., Stanic, I., Mignani, M., Facchini, A., Pignatti, C. & Caldarera, C.M. (1998). Spermine causes caspase activation in leukaemia cells. *FEBS Lett*. **437**, 233-236.
- Stefanelli, C., Pignatti, C., Tantini, B., Fattori, M., Stanic, I., Mackintosh, C.A. & Caldarera, C.M. (2001). Effect of polyamine depletion on caspase activation: a study with spermine synthase-deficient cells. *Biochem J*. **355**, 199-206.
- Sutherland, M.K., Geoghegan, J.C., Yu, C., Turcott, E., Skonier, J.E., Winkler, D.G. & Latham, J.A. (2004). Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone*. **35**, 828-835.
- Szczyński, G., Brodzikowska, A., Galus, R., Włodarski, P. & Włodarski, K.H. (2015). Regulation of Bone Homeostasis by Osteocytes. *Ortop Traumatol Rehabil*. **6**, 567-675.
- Tjabringa, G.S., Zandieh-Doulabi, B., Helder, M.N., Knippenberg, M., Wuisman, P.I.J.M. & Klein-Nulend, J. (2008). The polyamine spermine regulates osteogenic differentiation in adipose stem cells. *J Cell Mol Med*. **12**, 1710-1717.
- Tamama, K., Fan, V.H., Griffith, L.G., Blair, H.C. & Wells, A. (2006). Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells*. **24**, 686-695.
- Tartagni, M., Cicinelli, E., De Pergola, G., De Salvia, M.A., Lavopa, C. & Loverro, G. (2007). Effects of pretreatment with estrogens on ovarian stimulation with gonadotropins in women with premature ovarian failure: a randomized, placebo-controlled trial. *Fert Steril*. **87**, 858-861.
- Tate, M.L.K., Adamson, J.R., Tami, A.E. & Bauer, T.W. (2004). The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol*. **36**, 1-8.
- Theodoropoulou, A., Markou, K.B., Vagenakis, G.A., Benardot, D., Leglise, M., Kourounis, G. &

- Georgopoulos, N.A. (2005). Delayed but normally progressed puberty is more pronounced in artistic compared with rhythmic elite gymnasts due to the intensity of training. *J Clin Endocrinol Metab.* **90**, 6022-6027.
- Thompson, R.A. & Sherman, R.T. (2011). Book: *Eating disorders in sport*. (Thompson, R.A. Ed.) p. 1-155. Taylor & Francis, Routledge.
- Tournis, S., Michopoulou, E., Fatouros, I.G., Paspati, I., Michalopoulou, M., Raptou, P. & Galanos, A. (2010). Effect of rhythmic gymnastics on volumetric bone mineral density and bone geometry in premenarcheal female athletes and controls. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**, 2755-2762.
- Toyosawa, S., Shintani, S., Fujiwara, T., Ooshima, T., Sato, A., Ijuhin, N. & Komori, T. (2001). Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res.* **16**, 2017-2026.
- Tsentidis, C., Gourgiotis, D., Kossiva, L., Marmarinos, A., Doulgeraki, A. & Karavanaki, K. (2015). Sclerostin distribution in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and correlation with bone metabolism and bone mineral density. *Pediatr Diabetes.* **17**, 289-299.
- Vainshtein, A. & Hood, D.A. (2016). The regulation of autophagy during exercise in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* **120**, 664-673.
- Viguier-Carrin, S., Garnero, P. & Delmas, P.D. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int.* **17**, 319-36.
- Wang, Y.G., Qu, X.H., Yang, Y., Han, X.G., Wang, L., Qiao, H. & Dai, K.R. (2016). AMPK promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis through AMPK-Gfi1-OPN axis. *Cell Signal.* **28**, 1270-1282.
- Ward, K.A., Roberts, S.A., Adams, J.E. & Mughal, M.Z. (2005). Bone geometry and density in the skeleton of pre-pubertal gymnasts and school children. *Bone.* **36**, 1012-1018.
- Wasnich, R. (1993). Bone mass measurement: prediction of risk. *Am J Med.* **95**, S6-S10.
- Winbanks, C.E., Chen, J.L., Qian, H., Liu, Y., Bernardo, B.C., Beyer, C. & McMullen, J.R. (2013). The bone morphogenetic protein axis is a positive regulator of skeletal muscle mass. *J Cell Biol.* **203**, 345-357.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W. & Wang, E.A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* **242**, 1528-1535.
- Xi, G., Rosen, C.J. & Clemmons, D.R. (2015). IGF-I and IGFBP-2 stimulate AMPK activation and autophagy, which are required for osteoblast differentiation. *Endocrinology.* **157**, 268-281.
- Yang, G., Duan, X., Lin, D., Li, T., Luo, D., Wang, L. & Lian, K. (2015). Rapamycin-induced autophagy activity promotes bone fracture healing in rats. *Exp Ther Med.* **10**, 1327-1333.
- Yang, L., Meng, H. & Yang, M. (2016). Autophagy protects osteoblasts from advanced glycation end products-induced apoptosis through intracellular reactive oxygen species. *J Mol Endocrinol.* **56**, 291-300.

- Yang, X.B., Roach, H.I., Clarke, N.M.P., Howdle, S.M., Quirk, R., Shakesheff, K.M. & Oreffo, R.O.C. (2001). Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. *Bone*. **29**, 523-531.
- Yang, Z. & Klionsky, D.J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*. **12**, 814-822.
- Yamamoto, T., Hinoi, E., Fujita, H., Iezaki, T., Takahata, Y., Takamori, M. & Yoneda, Y. (2012). The natural polyamines spermidine and spermine prevent bone loss through preferential disruption of osteoclastic activation in ovariectomized mice. *Br J Pharmacol*. **166**, 1084-1096.
- Yokomoto-Umakoshi, M., Kanazawa, I., Takeno, A., Tanaka, K.I., Notsu, M. & Sugimoto, T. (2016). Activation of AMP-activated protein kinase decreases receptor activator of NF- κ B ligand expression and increases sclerostin expression by inhibiting the mevalonate pathway in osteocytic MLO-Y4 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **469**, 791-796.
- Yu, L., van der Valk, M., Cao, J., Han, C.Y.E., Juan, T., Bass, M.B. & Babij, P. (2011). Sclerostin expression is induced by BMPs in human Saos-2 osteosarcoma cells but not via direct effects on the sclerostin gene promoter or ECR5 element. *Bone*. **49**, 1131-1140.
- Yun, T.J., Chaudhary, P.M., Shu, G.L., Frazer, J.K., Ewings, M.K., Schwartz, S.M. & Clark, E.A. (1998). OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J Immunol*. **161**, 6113-6121.
- Zemel, B.S., Kalkwarf, H.J., Gilsanz, V., Lappe, J.M., Oberfield, S., Shepherd, J.A. & Hangartner, T. (2011). Revised reference curves for bone mineral content and areal bone mineral density according to age and sex for black and non-black children: results of the bone mineral density in childhood study. *J Clin Endocrin Metab*. **96**, 3160-3169.
- Zhang, K., Barragan-Adjemian, C., Ye, L., Kotha, S., Dallas, M., Lu, Y. & Bonewald, L.F. (2006). E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Mol Cell Biol*. **26**, 4539-4552.
- Zhang, L., Hu, X., Luo, J., Li, L., Chen, X., Huang, R. & Pei, Z. (2013). Physical exercise improves functional recovery through mitigation of autophagy, attenuation of apoptosis and enhancement of neurogenesis after MCAO in rats. *BMC Neurosci*. **14**, 46-54.
- Zhao, D., Yuan, H., Yi, F., Meng, C. & Zhu, Q. (2014). Autophagy prevents doxorubicin-induced apoptosis in osteosarcoma. *Mol Med Rep*. **9**, 1975-1981.
- Zhao, S., Kato, Y., Zhang, Y., Harris, S., Ahuja, S.S. & Bonewald, L.F. (2002). MLO-Y4 Osteocyte-Like Cells Support Osteoclast Formation and Activation. *J Bone Miner Res*. **17**, 2068-2079.
- Zhu, L.Q., Zhen, Y.F., Zhang, Y., Guo, Z.X., Dai, J. & Wang, X.D. (2013). Salinomycin activates AMP-activated protein kinase-dependent autophagy in cultured osteoblastoma cells: a negative regulator against cell apoptosis. *PLoS One*. **8**, e84175-e84186.
- Ziopoulos, P. (2001). Ageing human bone: factors affecting its biomechanical properties and the role

of collagen. *J Biomat Appl.* **15**, 187-229.

Zou, J., Zhang, W. & Li, X.L. (2017). Effects of SOST Gene Silencing on Proliferation, Apoptosis, Invasion, and Migration of Human Osteosarcoma Cells Through the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Calcif Tissue Int.* 1-14.