

**Università degli Studi di Milano**  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari  
Scuola di Dottorato in Scienze Farmacologiche

ciclo XXVII \_ BIO 14



**Effetto protettivo di ghrelina sul danno da stress ossidativo negli osteoblasti**

Tutor: Dottoressa Valeria Sibilìa  
Coordinatore del Dottorato: Professor Alberto Panerai

Tesi di Dottorato:  
Elisa Dieci  
R09561

Anno accademico 2013-2014

# **INDICE**

<b>Abstract</b>	<b>Pag.4</b>
<b>Riassunto</b>	6
<b>Introduzione</b>	12
1. Gli osteoclasti	13
1.1. Fattori che regolano negativamente l'osteoclastogenesi	15
1.2. Ruolo degli osteoclasti nel rimodellamento osseo	16
2. Gli osteoblasti	18
2.1. Fattori di stimolo del differenziamento degli osteoblasti	20
2.1.1. Proteine Wnt	20
2.1.2. BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)	22
2.1.3. IGF-1 (Insulin-like growth factor-1)	23
2.1.4. FGFs (Fibroblast Growth Factors)	24
2.2. Gli osteoblasti maturi	24
2.2.1. Le funzioni degli osteoblasti	25
2.2.1.1. Sintesi della matrice ossea	25
2.2.1.2. Regolazione dell'osteoclastogenesi	25
3. Gli osteociti	26
3.1. Differenziazione degli osteociti	26
3.2. Le funzioni degli osteociti	27
3.2.1. L'osteocita come mecano sensore	27
3.2.2. L'osteocita regola la formazione ossea	28
3.2.3. L'osteocita regola il riassorbimento osseo	29
4. Rimodellamento osseo	30
4.1. Le fasi del rimodellamento osseo	30
4.1.1. Fase di attivazione	31
4.1.2. Fase di transizione	31
4.1.3. Fase di terminazione	34
4.2. Fattori sistemici nel controllo del rimodellamento osseo	34
4.2.1. Estrogeni	34
4.2.2. Paratormone (PTH)	35
4.2.3. Vitamina D	35
4.2.4. Stress ossidativo	36
<b>Scopo della Ricerca</b>	38
<b>Materiali e Metodi</b>	41
1. Colture cellulari e loro mantenimento	42
2. Isolamento di osteoblasti derivati da calvaria di ratto	42
3. Valutazione del contenuto di collagene	42
4. Attività della fosfatasi alcalina (ALP)	43
5. Misurazione della vitalità cellulare	43
6. Microscopia a fluorescenza	44

6.1. Condensazione della cromatina (Hoechst staining)	44
6.2. Riarrangiamenti citoscheletrici	45
7. Determinazione del contenuto proteico dei lisati cellulari	45
8. SDS PAGE e Western-Blotting	45
9. Analisi statistica	47
10. Farmaci	48
11. Procedimenti Sperimentali	48
<b>Risultati</b>	50
<b>Figure</b>	55
<b>Discussione</b>	68
<b>Bibliografia</b>	75

# **ABSTRACT**

Increasing evidence suggests a role for oxidative stress in age-related decrease in osteoblast number and function, leading to the development of osteoporosis.

In this study, we investigated the effects of ghrelin on tert-butyl-hydroperoxide (*t*-BHP)-induced oxidative damage in MC3T3-E1 osteoblastic cells, as well as the role of the ghrelin receptor (GHS-R) involved in such activity. MTT assay showed that *t*-BHP treatment resulted in decreased cell viability in a concentration and time dependent manner. Under 250  $\mu$ M *t*-BHP treatment, MC3T3-E1 cells displayed significant loss of viability and dramatic morphological changes characterized by cell shrinkage and typical apoptotic alterations such as chromatin condensation. MC3T3-E1 cells pretreated with ghrelin ( $10^{-9}$  M) and cultured with *t*-BHP (250  $\mu$ M) for 3h showed increased viability and reduced apoptosis as shown by MTT assay and Hoechst-33258 staining. Furthermore, ghrelin prevented *t*-BHP-induced osteoblastic dysfunction and changes in the cytoskeleton organization evidenced by the staining of the actin fibers with Phalloidin-FITC by reducing reactive oxygen species generation.

Cell treatment with the GHS-R1a agonist, EP1572 ( $10^{-7}$ - $10^{-11}$  M), had no effect against *t*-BHP-induced cytotoxicity and pretreatment with the selective GHS-R1a antagonist, D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 ( $10^{-7}$  M), failed to remove ghrelin ( $10^{-9}$  M)-protective effects against oxidative injury, indicating that GHS-R1a is not involved in such ghrelin activity. Accordingly, unacylated ghrelin (DAG), not binding GHS-R1a, displays the same protective actions of ghrelin against *t*-BHP-induced cytotoxicity. Consistently with these observations, Ghrelin has been previously shown to activate different intracellular pathways including PI3K/Akt via a specific ghrelin/DAG binding site, that is not GHS-R1a.

Furthermore, cell treatment with a specific inhibitor of PI3K/Akt pathway, (Ly294002, 10 $\mu$ M) reduced the protective effect of ghrelin against *t*-BHP-induced oxidative damage.

This observation indicates that ghrelin confers protection against *t*-BHP-induced oxidative damage via a PI3K/Akt dependent pathway. Akt activation controls the cell survival through phosphorylation of downstream targets such as protein kinase GSK-3 $\beta$ . Inactivation of GSK-3 $\beta$  results in translocation of  $\beta$ -catenin to the nucleus and nuclear  $\beta$ -catenin is known to inhibit apoptosis. In this study we have shown that ghrelin increased GSK-3 $\beta$  phosphorylation and  $\beta$ -catenin accumulation measured by Western Blot primary in osteoblasts obtained from rat calvary cells (rOB). These findings suggest that ghrelin can function as an antioxidant compound on osteoblasts and may have therapeutic potential to promote bone formation and reduce bone loss associated with aging.

# **RIASSUNTO**

Lo scheletro è un tessuto metabolicamente attivo che subisce rimodellamento continuo per sostituire osso invecchiato con osso neoformato meccanicamente più competente. In condizioni normali, riassorbimento e neoformazione sono bilanciati, attraverso l'attività coordinata di osteoclasti e osteoblasti, mentre durante l'invecchiamento si crea uno squilibrio tra l'attività degli osteoclasti e degli osteoblasti. Il riassorbimento prevale sulla neoformazione causando una riduzione della massa ossea, compromissione della microarchitettura del tessuto e un maggior rischio di fratture.

I meccanismi patofisiologici responsabili degli effetti avversi dell'invecchiamento sulla massa ossea non sono stati ancora completamente chiariti. Recentemente è emerso come lo stress ossidativo dovuto ad un aumento eccessivo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) possa contribuire allo sviluppo dell'osteoporosi.

Nei roditori, è stato riportato che lo stress ossidativo induce osteopenia a basso turnover e che la riduzione della massa ossea ben si correla con la diminuzione dei livelli di enzimi antiossidanti. Questi dati sperimentali sono in linea con gli studi clinici, che hanno evidenziato come l'aumento dello stress ossidativo sia associato alla perdita di massa ossea in soggetti anziani di entrambe i sessi. Nelle donne anziane osteoporotiche, sono stati misurati alti livelli di perossidazione lipidica e una marcata diminuzione nei livelli di antiossidanti nel plasma se confrontati con il gruppo controllo di età corrispondente. La formazione delle specie reattive dell'ossigeno si verifica principalmente nei mitocondri durante la fosforilazione ossidativa, ma possono essere generati anche durante l'ossidazione degli acidi grassi o in risposta a stimoli esterni come l'infiammazione.

Con l'invecchiamento si assiste ad un'eccessiva produzione di ROS causata da un aumento del danno mitocondriale ed a una riduzione dei meccanismi antiossidanti. I ROS sono molecole chimicamente attive poiché possiedono un elettrone spaiato sull'orbitale più esterno, la loro configurazione elettronica li rende altamente instabili e particolarmente reattivi, andando a reagire facilmente con una qualsiasi molecola che si trovi nella loro

prossimità (carboidrati, lipidi, proteine, acidi nucleici) danneggiandola e spesso compromettendone la funzione. L'eccessiva produzione di ROS che si verifica nell'osso, durante l'invecchiamento, incrementa la fosforilazione di p53 e p66 portando all'apoptosi di osteoblasti e osteociti e può privilegiare la differenziazione delle cellule stromali del midollo osseo verso gli adipociti, con conseguente aumento dell'adipogenesi e la diminuzione dell'osteoblastogenesi. L'identificazione di composti in grado di modulare contemporaneamente l'attività degli osteoblasti e di ridurre gli effetti negativi dello stress ossidativo sulla massa ossea potrebbe rappresentare un approccio terapeutico mirato per il trattamento dell'osteoporosi.

Nel nostro studio abbiamo esaminato gli effetti di ghrelina sulla vitalità cellulare di una linea stabilizzata di pre-osteoblasti murini, MC3T3-E1, esposti a tert-butil idroperossido (t-BHP), un idroperossido organico ampiamente usato come pro-ossidante per indurre stress ossidativo in diversi tipi cellulari. Ghrelina, infatti riduce il danno ossidativo in vari tessuti periferici e nel cervello e svolge un ruolo anabolico nella regolazione del metabolismo osseo. L' mRNA sia per ghrelina che per i suoi recettori sono espressi sugli osteoblasti e su diverse linee stabilizzate di pre-osteoblasti. Il trattamento a lungo termine con ghrelina, inoltre, riduce la perdita di massa ossea indotta da gonadectomia nel ratto e bassi livelli di ghrelina ben si correlano con un intensa perdita di massa ossea.

Nella prima serie di esperimenti abbiamo messo a punto il modello di stress ossidativo sulla linea cellulare di osteoblasti murini MC3T3-E1 esaminando gli effetti di concentrazioni crescenti di t-BHP (125, 250, 500  $\mu$ M) a diversi tempi di incubazione (1, 3, 6 ore) sulla vitalità cellulare, misurata tramite il test MTT. Sulla base dei risultati ottenuti è stata scelta la concentrazione di 250  $\mu$ M di t-BHP per 3 ore che riduce la vitalità cellulare del 30% rispetto al gruppo controllo. Abbiamo successivamente esaminato gli effetti di una pre-incubazione (2 ore prima) con concentrazioni crescenti di ghrelina ( $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  M) sul danno indotto da t-BHP (250  $\mu$ M, 3 ore). È emerso che ghrelina riduce il danno da t-BHP

a concentrazioni comprese tra ghrelina  $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  M con un effetto massimale alla concentrazione di  $10^{-9}$  M. Ghrelina ( $10^{-9}$  M) è stata in grado di inibire in maniera statisticamente significativa l'apoptosi delle cellule MC3T3-E1 indotta da *t*-BHP valutata tramite microscopio a fluorescenza previa colorazione della cromatina con Hoechst 33252 staining. Poiché le cellule apoptotiche presentano alterazioni morfologiche che determinano perdita di contatto con le cellule adiacenti e cambiamenti a carico del citoscheletro, abbiamo valutato gli effetti del *t*-BHP e del pre-trattamento con ghrelina sulla morfologia cellulare e sui cambiamenti strutturali dei microfilamenti di actina delle cellule MC3T3-E1 mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza previa colorazione dei filamenti di actina tramite FICT-labeled falloidina. In presenza di *t*-BHP (250  $\mu$ M, 3 ore) si assiste ad un restringimento cellulare dovuto ad un cambiamento dell'organizzazione del citoscheletro; i filamenti di actina risultano addensati intorno al nucleo e non più distesi e ben distribuiti nel citoplasma come nel gruppo controllo. Il pre-trattamento con ghrelina contrasta gli effetti del *t*-BHP sia sulla morfologia che sull'organizzazione del citoscheletro riportando le cellule ad una situazione simile al gruppo controllo. Abbiamo successivamente studiato quale fosse il recettore coinvolto nell'azione protettiva esercitata da ghrelina sulle cellule MC3T3-E1. La ghrelina acilata, chiamata normalmente (AG), è in grado di legarsi al recettore GHS-R1a e esplicare numerose attività tra le quali l'aumento della secrezione del GH, del food intake e l'inibizione della secrezione acido gastrica. L'agonista selettivo del GHS-R1a (EP1572,  $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  M) non previene gli effetti negativi del *t*-BHP sulla vitalità cellulare. L'antagonista selettivo del GHS-R1a, D-Lys<sup>3</sup>GHRP-6 ( $10^{-7}$  M) applicato 30 minuti prima di ghrelina ( $10^{-9}$  M) non rimuove l'effetto protettivo del peptide sul danno ossidativo indotto dal *t*-BHP. La possibilità che l'effetto protettivo di ghrelina non sia legato all'interazione con un recettore GHS-R1a è stato confermato dai risultati ottenuti incubando le cellule MC3T3-E1 con ghrelina non acilata (DAG), che non lega il GHS-

R1a. Il pre-trattamento (2 ore prima del *t*-BHP) con concentrazioni crescenti di DAG ( $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  M), infatti, aumenta in maniera statisticamente significativa la vitalità cellulare se comparata con le cellule trattate solo con il *t*-BHP (250  $\mu$ M, 3 ore), raggiungendo un effetto protettivo massimale alla concentrazione di  $10^{-9}$  M. DAG ( $10^{-9}$  M) riduce in maniera statisticamente significativa il numero di cellule apoptotiche prevenendo sia i cambiamenti morfologici che l'alterazione dei filamenti di actina indotti dallo stress ossidativo. Rimangono da chiarire i meccanismi responsabili degli effetti protettivi di ghrelina nei confronti del danno ossidativo nelle MC3T3-E1. È stato riportato in letteratura che gli effetti esercitati da ghrelina su diversi tipi cellulari dipendono dall'attivazione di diversi pathway di segnale tra i quali PI3K/Akt, ERK 1 e 2, MAPKs, JNK e p38. La nostra attenzione si è focalizzata sul pathway PI3K/Akt che è coinvolto nella crescita, nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare indotti da ghrelina in vari tipi di cellule. La possibilità che ghrelina esplichi il suo effetto anti-apoptotico nelle cellule MC3T3-E1 mediante l'attivazione del pathway PI3K/Akt è stata valutata mediante Hoechst 33252 staining, utilizzando un inibitore selettivo dell'attività di PI3K, Ly294002 (10  $\mu$ M). È emerso che l'inibitore incubato in associazione con ghrelina ( $10^{-9}$  M, 2 ore) e *t*-BHP (250  $\mu$ M, 3 ore) è in grado di ridurre l'effetto anti-apoptotico di ghrelina suggerendo che ghrelina inibisca l'apoptosi delle MC3T3-E1 indotta da *t*-BHP attraverso l'attivazione del pathway PI3K/Akt. L'attivazione di Akt controlla la sopravvivenza cellulare attraverso la fosforilazione di bersagli a valle del pathway PI3K/Akt, come ad esempio la glicogeno sintasi chinasi 3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ . GSK-3 $\beta$  regola numerose funzioni cellulari tra cui l'apoptosi e il differenziamento degli osteoblasti mediante il pathway di Wnt. Quando il segnale canonico di Wnt viene attivato, l'enzima GSK-3 $\beta$  viene inibito impedendo la fosforilazione e la degradazione di  $\beta$ -catenina, effettore di Wnt. La  $\beta$ -catenina si accumula nel citoplasma, migra nel nucleo ove, interagendo con fattori trascrizionali della famiglia dei T-Cell Factors (TCF) o dei Lymphoid Enhancer Factors (LEFT), modula l'espressione di

numerosi geni bersaglio. Per chiarire se l'inattivazione per fosforilazione di GSK-3 $\beta$  mediata da PI3K/Akt sia almeno in parte responsabile degli effetti anti-apoptotici di ghrelina abbiamo misurato mediante Western Blot i livelli di GSK-3 $\beta$  fosforilato in lisati cellulari di osteoblasti primari, ottenuti da calvarie di ratto (rOB). I risultati ottenuti indicano come ghrelina determini un aumento statisticamente significativo dei livelli di GSK-3 $\beta$  fosforilato rispetto al gruppo controllo. Il pre-trattamento con Ly294002 riduce la fosforilazione di GSK-3 $\beta$  indotta da ghrelina. Poiché l'inattivazione mediante fosforilazione di GSK-3 $\beta$  provoca l'accumulo e la successiva traslocazione di  $\beta$ -catenina nel nucleo abbiamo misurato mediante Western Blot i livelli di  $\beta$ -catenina totale in seguito al trattamento con ghrelina ( $10^{-9}$  M). Il trattamento con ghrelina determina un aumento statisticamente significativo di  $\beta$ -catenina.

E' possibile che tali effetti dipendano dall'interazione di ghrelina con un recettore diverso dal GHS-R1a, che determina l'attivazione del pathway PI3K/Akt. L'attivazione del pathway PI3K/Akt da parte di ghrelina inibisce per fosforilazione GSK-3 $\beta$  determinando la stabilizzazione di  $\beta$ -catenina e la sua successiva traslocazione nel nucleo.

# **INTRODUZIONE**

## **1. Gli osteoclasti**

Gli osteoclasti sono cellule multinucleate giganti, che si formano dalla fusione dei precursori mononucleati della famiglia dei monociti/macrofagi (Teitelbaum, 2000; Mellis et al., 2011; Boyce et al., 2012). Il differenziamento e la fusione degli osteoclasti richiede diverse tappe che sono regolate da diversi fattori prodotti dalle cellule stromali del midollo, dagli osteoblasti e dai linfociti T. Il fattore stimolatorio delle colonie macrofagiche (M-CSF) e il ligando del recettore attivatore NFκB (RANKL) sono due fattori necessari e sufficienti per promuovere l'osteoclastogenesi. M-CSF, si lega al suo recettore CSF1R, presente sui precursori degli osteoclasti promuovendone la proliferazione e la sopravvivenza mediante l'attivazione di fattori di trascrizione quali c-FOS, il fattore trascrizionale ematopoietico (PU.1) e il fattore trascrizionale indotto dalla microftalina (MIF1) (Kular et al., 2012; Kwon et al., 2005; Mellis et al., 2011; Ishii et al. 2008). La cooperazione tra questi fattori trascrizionali induce l'espressione del recettore attivante NFκB (RANK) che appartiene alla super famiglia dei TNFR (Tumor necrosis factor receptor) presente sulla superficie di numerose cellule quali i precursori degli osteoclasti, osteoclasti maturi, cellule dendritiche e cellule tumorali. Nell'uomo RANK è composto da 616 aminoacidi, possiede un dominio citoplasmatico al C-terminale di 383 aminoacidi, un dominio extracellulare all'N-terminale di 184 aminoacidi, un peptide segnale di 28 aminoacidi ed un dominio transmembrana di 21 aminoacidi (Wright et al., 2009). MIF1 e PU.1 regolano altri fattori trascrizionali che controllano la formazione e l'attivazione degli osteoclasti aumentando i geni critici per gli osteoclasti tra cui la catepsina K, E-caderina, l'ATPase vacuolare e il NFATc1 (Sharma et al., 2007). Il ligando di RANK (RANKL), è essenziale per la formazione degli osteoclasti. Viene espresso dagli osteoblasti, dai linfociti T e dalle cellule endoteliali (Xu et al., 2000). L'interazione di RANKL con il suo recettore amplifica il segnale attivato dal M-CSF nei precursori stimolandone la differenziazione verso il fenotipo osteoclastico (Kular et al., 2012), attivando l'espressione di geni responsabili della fusione dei precursori come la proteina transmembrana specifica delle cellule dendritiche (DC-STAMP) nonché i geni richiesti per l'attivazione degli osteoclasti maturi, tra i quali quelli che codificano per ATPasi vacuolare, CLC-7, catepsina K, fosfatasi acida tartrato resistente e il recettore della calcitonina (Kular et al., 2012). Il legame di RANKL con il suo recettore avvia la trasduzione di diverse vie di segnale quali NFκB, JNK (c-jun N-terminal kinase), ERK 1 / 2 e p38 (Mellis et al., 2011) (Fig. 1).

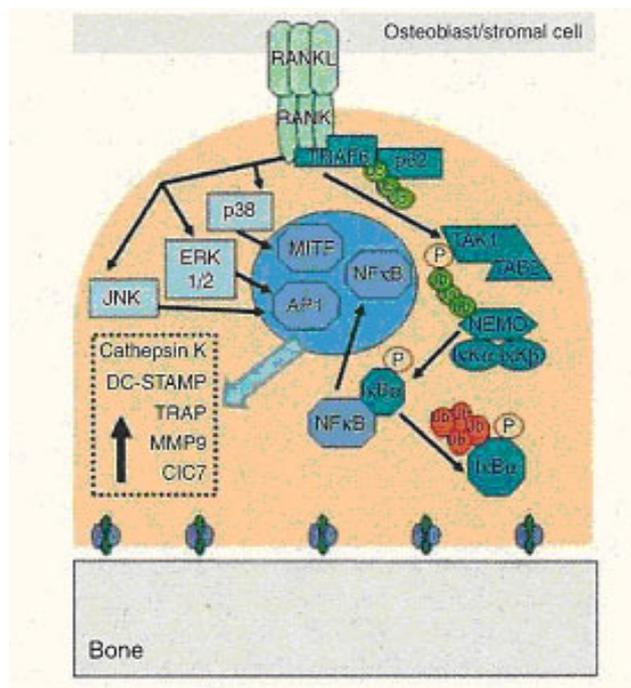


Fig. 1: L'interazione RANK-RANKL attiva diverse vie di segnale intracellulari che portano alla trascrizione dei geni responsabile della maturazione degli osteoclasti (Mellis et al., 2011).

L'interazione di RANKL al suo recettore avvia una cascata di segnale che inizia con il legame del dominio C-terminale di RANK con TRAF6 (TNF receptor associated factor 6). TRAF6 attiva il complesso della chinasi inibitoria kappa B (IKK) a seguito della fosforilazione della I $\kappa$ B $\alpha$ , determinando il rilascio di Nf $\kappa$ B, che trasloca nel nucleo e attiva la trascrizione di geni pro-osteoclastogenici (Takayanagi et al., 2002). RANK attiva anche le vie di segnale delle MAP chinasi attraverso ERK 1 / 2 e JNK, che attivano il fattore trascrizionale AP-1 (attivatore della proteina 1) e p38 che regola MITF (Mellis et al., 2011). Per il differenziamento degli osteoclasti è necessario che avvenga l'attivazione del fattore trascrizionale NFATc1 (Kular et al., 2012). Il pathway di RANKL collabora con il pathway stimolatorio del ITAM (immunoreceptor tyrosine based activation motif) mediato dai recettori delle immunoglobuline come OSCAR (recettore associato agli osteoclasti) e TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells) (Koga et al., 2004). Questo segnale attiva la fosfolipasi C (PLC $\gamma$ ) e il rilascio intracellulare di calcio, che induce la traslocazione nucleare di NFATc1 (Kular et al., 2012) (Fig. 2). Il fattore trascrizionale NFATc1 si lega con PU.1 e MITF alle regioni promotrici dei geni essenziali per la codifica delle proteine specifiche degli osteoclasti, come catepsina K, OSCAR, DC-STAMP, TRAP. L'attivazione di NFATc1 è necessaria ma non sufficiente a garantire un corretto differenziamento degli osteoclasti. E' necessario che il segnale NFATc1 venga amplificato

mediante il legame di NFATc1 con il suo promotore (Asagiri et al., 2005; Kular et al., 2012).

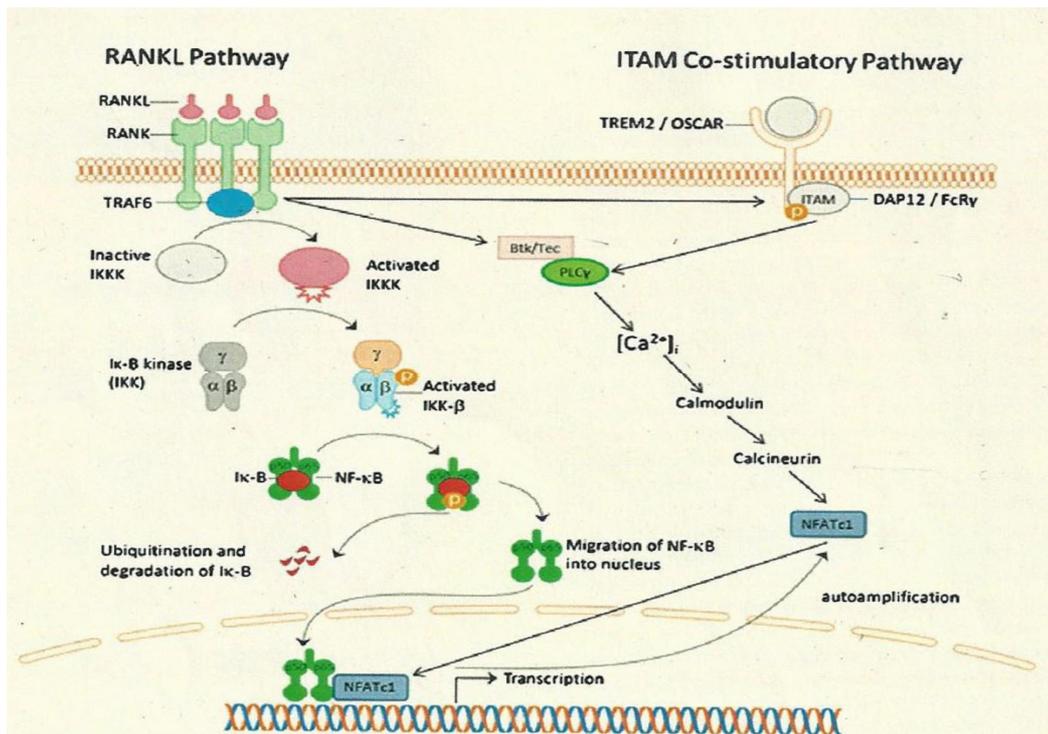


Fig. 2: Percorso di segnalazione di RANKL negli osteoclasti. Il pathway mediato da RANKL rappresenta la via di segnale necessaria per la formazione e la funzione degli osteoclasti (Kular et al., 2012).

### **1.1. Fattori che regolano negativamente l'osteoclastogenesi**

Esistono fattori in grado di inibire il processo di osteoclastogenesi. Il più importante è quello regolato dall'osteoprotegerina (OPG). L'osteoprotegerina è una glicoproteina secreta dagli osteoblasti e dalle cellule stromali che agisce come recettore solubile, legando con alta affinità RANKL prevenendo l'interazione con RANK (Kong and Penninger, 2000) (Fig. 3). Topi knockout per OPG manifestano osteoporosi (Mountziou et al., 2007) mentre un'aumentata espressione di OPG determinano un aumento generalizzato della densità ossea (osteopetrosi). Anche l'interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ) e l'interferone-beta (IFN- $\beta$ ) modulano negativamente il differenziamento degli osteoclasti. L' IFN- $\gamma$  inibisce il segnale di RANKL accelerando la degradazione del TRAF6 mentre il IFN- $\beta$  inibisce l'espressione di c-FOS (Takayanagi et al., 2005) (Fig. 3).

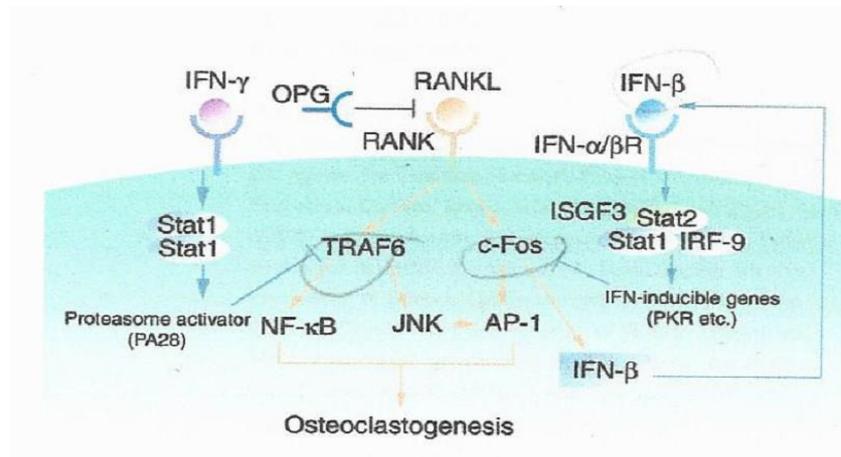


Fig. 3: Rappresentazione schematica dei fattori che regolano in senso negativo l'attivazione degli osteoclasti. (OPG) osteoprotegerina, (IFN) interferone. (Takayanagi et al., 2005).

## **1.2. Il ruolo degli osteoclasti nel rimodellamento osseo**

Gli osteoclasti sono cellule deputate al riassorbimento della matrice ossea durante il processo di rimodellamento. Il processo di riassorbimento si verifica in tre fasi: ancoraggio degli osteoclasti all'osso, polarizzazione cellulare, inizio del riassorbimento e distacco (Mellis et al., 2011).

Quando gli osteoclasti maturi prendono contatto con l'osso, la membrana plasmatica si attacca saldamente alla matrice ossea e delimita il compartimento di riassorbimento mediante lo sviluppo di una complessa struttura di adesione chiamata podosoma (Jurdic et al., 2006; Luxenburg et al., 2007; Georgess et al., 2014). I podosomi presentano una struttura tipica che comprende una struttura superficiale (cap), un nucleo centrale e un anello che costituisce la placca di adesione (Georgess et al., 2014; Linder and Wiesner, 2014) (Fig. 4). Sono uniti tra loro mediante una complessa rete di filamenti di actina e miosina.

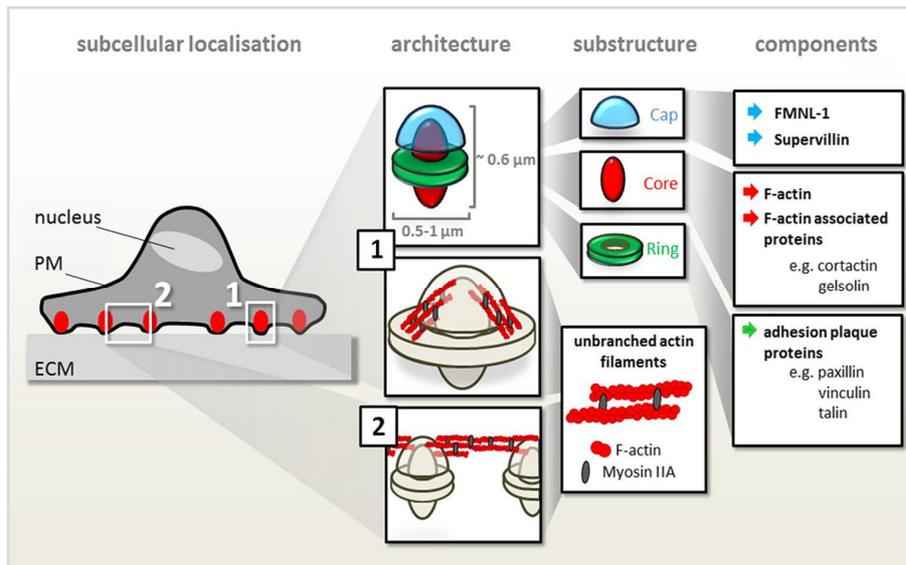


Fig. 4: Architettura e composizione del podosoma. Sono indicati il nucleo la membrana plasmatica (PM) e la matrice extracellulare (ECM). Si notano numerosi podosomi (in rosso) a contatto con ECM. Nei riquadri bianchi sono indicate le caratteristiche strutturali dei podosomi. Architettura e sottostruttura: (1) Modello della sottostruttura del podosoma (nucleo, anello e cap), così come i filamenti di actomiosina ramificati, (2) cavi di actomiosina che collegano i singoli podosomi. Componenti tipici del cap, del nucleo e dell'anello (Linder and Wiesner, 2014).

Successivamente l'osteoclasta si polarizza formando 3 differenti distretti: la zona di tenuta (SZ, sealing zone), l'orletto a spazzola (RB, ruffler border) e il dominio di secrezione funzionale (FSD, functional secretory domain) (Mellis et al., 2011) (Fig. 5).

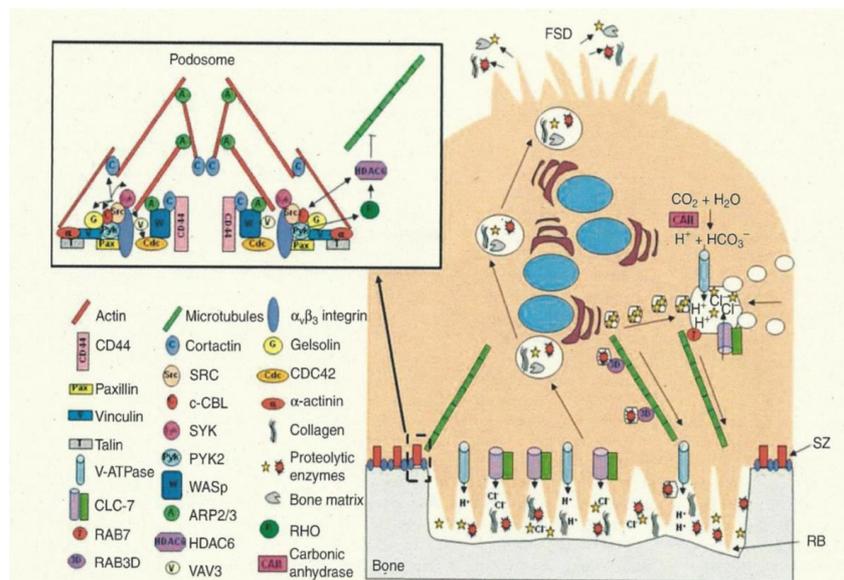


Fig. 5: L'osteoclasta maturo forma il podosoma a seguito del contatto con l'osso. Successivamente la cellula polarizza formando tre diversi distretti (la zona di tenuta (SZ), l'orletto a spazzola (RB), dominio di secrezione funzionale (FSD)) (Mellis et al., 2011).

La membrana degli osteoclasti risulta ricca di integrine eterodimeriche ( $\alpha v\beta 3$ ) che riconoscono il motivo RGD (Arg-Gly-Asp) presente in diverse proteine della matrice ossea quali osteopontina e sialoproteine. L'interazione tra le integrine e la sequenza ligando scatena una cascata intracellulare nell'osteoclasta in grado di determinare una riorganizzazione del citoscheletro e la formazione dell'orletto a spazzola. Questa riorganizzazione risulta essenziale per la capacità riassorbente degli osteoclasti (Teitelbaum, 2011). La degradazione della matrice avviene mediante la secrezione polarizzata di enzimi proteolitici, come la catepsina K e acido cloridrico che idrolizzano e solubilizzano rispettivamente i componenti organici e inorganici dell'osso (Itzstein et al., 2011; Charles and Aliprantis, 2014) determinando così la formazione delle lacune di riassorbimento (lacune di Howship) (Fig. 5). I prodotti di degradazione vengono internalizzati e rilasciati per transitosi nello spazio extracellulare a livello del dominio di secrezione funzionale. Il distacco degli osteoclasti dall'osso è mediato dall'aumento della concentrazione di calcio nel compartimento di riassorbimento che stimola i recettori della rianodina presenti sulla membrana degli osteoclasti. Tale attivazione provoca un rilascio di calcio dai depositi intracellulari e un aumento del calcio citoplasmatico. Tale aumento determina il distacco degli osteoclasti dalla matrice ossea per disaggregazione dei microtubuli del citoscheletro (Mellis et al., 2011).

## 2. Gli osteoblasti

Gli osteoblasti derivano dalle cellule staminali mesenchimali (MCS); che hanno la capacità di differenziarsi anche in condrociti, mioblasti, adipociti (Chamberlain et al., 2007; Bianco et al., 2008) (Fig. 6).

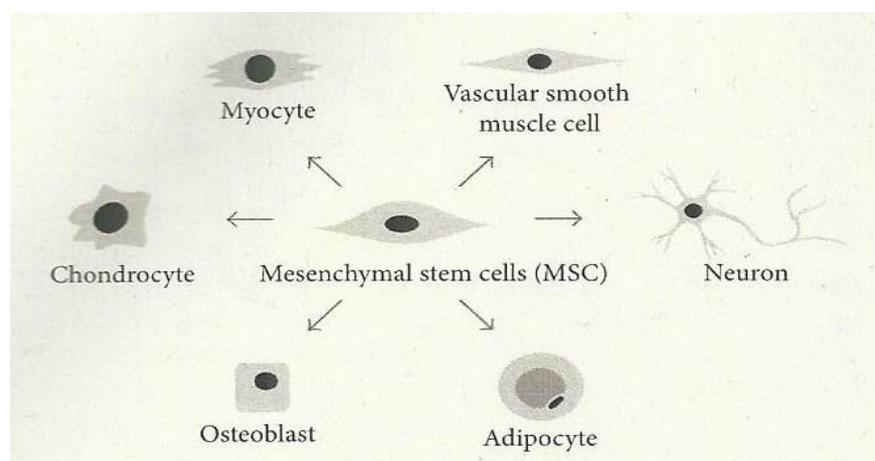


Fig. 6: Differenziazione multilineare delle cellule mesenchimali staminali (MSC) (James, 2013).

L'arruolamento e il differenziamento delle MCS verso gli adipociti o cellule osteogeniche dipende dall'attivazione di varie vie di segnale e fattori trascrizionali. E' emerso in particolare l'esistenza di una correlazione inversa tra adipogenesi e osteogenesi con l'induzione di una linea cellulare che avviene a spese dell'altra. I principali fattori di trascrizione in grado di orientare le MCS verso gli adipociti o i precursori degli osteoblasti sono PPAR $\gamma$  e RUNT-related-transcription factor2 (RUNX2). Accanto a questi fattori principali ne sono stati identificati altri come Osterix e CCAAT-enhancer binding protein che agiscono in maniera indipendente o in associazione con RUNX-2. La famiglia delle RUNX è costituita da 3 distinte proteine ciascuna delle quali presenta varie sub unità  $\alpha$  e una stessa subunità  $\beta$ . Per il legame delle RUNX al DNA, le proteine devono dimerizzare con un cofattore trascrizionale Cbfb. Topi che presentano una mutazione (Runx2<sup>-/-</sup>) sono privi di osteoblasti differenziati, e non formano tessuto osseo (Otto et al., 1997; Komori et al., 1997). L'importanza di RUNX-2 nel differenziamento degli osteoblasti è giustificata dal fatto che tale gene è il bersaglio di numerose vie di segnale come quelle attivate dal TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta), BMPs (bone morphogenetic proteins), le proteine WNT, IGF (insuline-like growth factor) (Eriksen 2010; Neve et al., 2011; Capulli et al., 2014). RUNX2 può indurre l'espressione di Osterix (Osx o Sp7), un altro fattore trascrizionale, contenente una zinc-finger, importante per la differenziazione degli osteoblasti (Cao et al., 2005; Nishio et al., 2006). Esistono anche vie di attivazione di Osx indipendenti da RUNX-2 stimulate dalle BMPs e IGF-1 (Nishio et al., 2006; Lee et al., 2003). A sua volta Osx promuove l'espressione trascrizionale di Special AT-rich sequence-binding protein 2 (Satbs2), proteina che regola la trascrizione e il rimodellamento della cromatina nucleare (Sheehan-Rooney et al., 2010). Satb2 sembra interagire con Runx2 e ATF4 (Activating Trascrizione Factor) regolando positivamente i markers degli osteoblasti (Xiao et al., 2005; Capulli et al., 2014). Topi knockout per Satb2 e per ATF4 presentano un difetto nella differenziazione degli osteoblasti e una riduzione dell'espressione di Bone SialoProtein (BSP) e osteocalcina (OCN) (Dobrev et al., 2006; Capulli et al., 2014; Yang et al., 2004) e riduzione della massa ossea. Dlx5 (Distal-less homeobox 5) rappresenta un altro fattore trascrizionali coinvolto nell'osteoblastogenesi sotto il controllo delle BMPs (Han et al., 2011).

## **2.1. Fattori di stimolo del differenziamento degli osteoblasti**

### **2.1.1. Proteine Wnt**

Le proteine Wnt, sono una famiglia di 19 glicoproteine secrete altamente conservate, che legano i recettori transmembrana Frizzled (FZD) attivando due distinte vie di trasduzione del segnale: il pathway canonico ed il pathway non canonico di Wnt (James, 2012). Il recettore FZD è espresso sulla superficie cellulare ed è costituito da sette domini transmembrana (Xavier et al., 2014). L'attivazione del pathway canonico di Wnt determina la formazione di un complesso recettoriale composto dal corecettore LDL-Receptor-related Protein 5-6 (LRP5 e 6) che attiva una cascata di trasduzione del segnale, che coinvolge la proteina disheveled (DSH) (Pandur et al., 2002), che inibisce un complesso proteico composto da axina, glicogeno sintasi chinasi-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) e APC (adenomatosis polyposis coli protein) (Fig. 7). GSK-3 $\beta$  normalmente fosforila  $\beta$ -catenina, promuovendo la sua degradazione. La stimolazione delle proteine Wnt inibisce il complesso Axin, GSK-3 $\beta$  e APC permettendo la stabilizzazione e la successiva traslocazione di  $\beta$ -catenina nel nucleo. Una volta all'interno del nucleo,  $\beta$ -catenina interagisce con fattori trascrizionali della famiglia dei T-Cell Factors (TCF) o dei Lymphoid Enhancer Factors (LEF), modulando l'espressione di numerosi geni bersaglio (Baron and Rawadi, 2007). Nel pathway non canonico, Wnt5a lega il recettore FZD ed attiva le proteine G eterotrimeriche, determinando un incremento del calcio intracellulare tramite meccanismi proteina C-dipendenti o inducendo cambiamenti Rho- o c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dipendenti nell'actina citoscheletrica (Fig. 7). Le proteine Wnt sono coinvolte nel differenziamento, nella funzionalità della linea osteoblastica e giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo e nell'omeostasi del tessuto osseo (Pinzone et al., 2009).

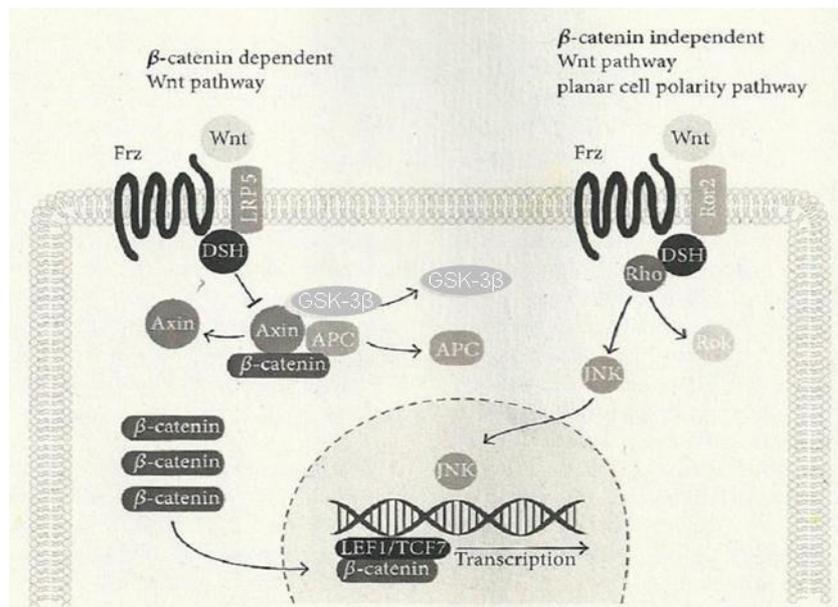


Fig. 7: Rappresentazione schematica della via canonica e non canonica di Wnt. La trasduzione del segnale di Wnt avviene mediante la via di segnalazione  $\beta$ -catenina dipendente o dalla via  $\beta$ -catenina indipendente. Nella via di segnale  $\beta$ -catenina dipendente, le proteine Wnt interagendo con il complesso recettoriale LRP5/6- Frz attivano disheveled (DSH). DSH blocca il complesso costituito da axina, glicogeno sintasi chinasi-3  $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), adenomatosis polyposis coli (APC) determinando l'accumulo e la stabilizzazione di  $\beta$ -catenina.  $\beta$ -catenina trasloca nel nucleo. La via non canonica di Wnt forma un complesso extracellulare simile alla via canonica, formato da Wnt, Frz e Ror2 che determinano l'attivazione di secondi messaggeri (James, 2013).

Evidenze sperimentali suggeriscono l'importanza del pathway canonico di Wnt nella formazione del tessuto osseo e nell'espressione di marcatori specifici degli osteoblasti in vitro (Day et al., 2005). Modelli in vivo di topi KO per Wnt10a, mostrano una riduzione dell'osso trabecolare, mentre l'overespressione di questa proteina nelle cellule mesenchimali staminali stimola il processo di osteoblastogenesi (Bennett et al., 2005). Kang et al., (2007) ha mostrato che Wnt10a non solo promuove la differenziazione delle MSCs verso la linea osteoblastica ma allo stesso tempo inibisce la differenziazione dei preadipociti dalle MSCs inibendo l'espressione del C/EBP (adipogenic transcription factors CCAAT/Enhancer-Binding-Protein alfa) e il PPAR-gamma (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma). E' stato riportato inoltre che la perdita di funzionalità del gene LRP5/6 causa una sindrome caratterizzata da una severa riduzione di massa ossea, mentre un aumento della funzionalità del gene LRP5/6 si accompagna ad osteopetrosi (Gong et al., 2001; Little et al., 2002; Boyden et al., 2002; Case and Rubin, 2010).  $\beta$ -catenina sembra svolgere un ruolo diretto nell'attivazione di fattori trascrizionali specifici, come RUNX-2, l'assenza di  $\beta$ -catenina determina il differenziamento in senso

condrogenico (Chen and Long, 2013). La carenza di  $\beta$ -catenina nei precursori mesenchimali porta ad un arresto nello sviluppo degli osteoblasti in una fase iniziale con conseguenti difetti scheletrici nell'embrione (Chen and Long, 2013). La via di segnalazione Wnt è strettamente regolata da numerosi fattori appartenenti a diverse famiglie con funzione antagonista. La via di segnalazione Wnt può essere inibito da antagonisti extracellulari quali sFRPs (Secreted frizzled related proteins), Dkk1 (Dickkopf-related protein 1) e sclerostina (SOST) (Kawano and Kypta, 2003; Mao et al., 2002; Winkler et al., 2003). Le sFRPs agiscono come recettori solubili del FZD impedendo il legame delle proteine Wnt al recettore FZD (Kawano and Kypta, 2003). Mentre Dkk1 e SOST compromettono l'attività del corecettore LRP5/6. L'assenza di Dkk1 e SOST sia nell'uomo che nel topo è associata ad un aumento della formazione ossea (Morvan et al., 2006; Loots et al., 2005); mentre in topi trasgenici sovra-esprimenti sclerostina si è osservato un fenotipo di grave osteopenia (Winkler et al., 2003).

### **2.1.2. BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)**

Le BMPs sono fattori di crescita che appartengono alla superfamiglia dei Trasforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) (Li et al., 2006). Le BMPs sono circa venti. Tra le diverse isoforme, BMP-2, 4, 5, 6 e 7 sono chiaramente implicati nell'osteogenesi probabilmente attraverso la loro abilità di stimolare l'espressione di fattori trascrizionali quali Runx2 e Osx attivando la differenziazione delle cellule mesenchimali staminali verso la linea osteoblastica (Yamaguchi et al., 1996; Capulli et al., 2014). Le BMPs determinano i loro effetti attraverso l'interazione con due tipi di recettori (BMPR) di membrana con attività serina-treonina chinasi. I recettori BMPR di tipo II vengono attivati dal legame con le BMPs e determinano il successivo reclutamento ed attivazione del BMPR di tipo I. Sono stati identificati diversi sistemi di segnale intracellulare attivati dai BMPRs. Tra questi il principale è rappresentato dal pathway SMAD 1/5/8. Le SMAD attivate 1/5/8 formano un complesso con SMAD4 e traslocano nel nucleo dove attivano la trascrizione di geni specifici. In particolare le SMADs attivate per fosforilazione regolano l'espressione di fattori di trascrizione importanti per l'osteoblastogenesi come RUNX-2 e Osx (Fig. 8). I principali fattori che regolano in senso inibitorio la via attivata dalle BMPs sono NOGGIN e GREMLIN. I topi che over-esprimono entrambi questi fattori presentano una riduzione della massa ossea e una calcificazione irregolare (Gazzerro et al., 2007; Davis and Camper, 2007).

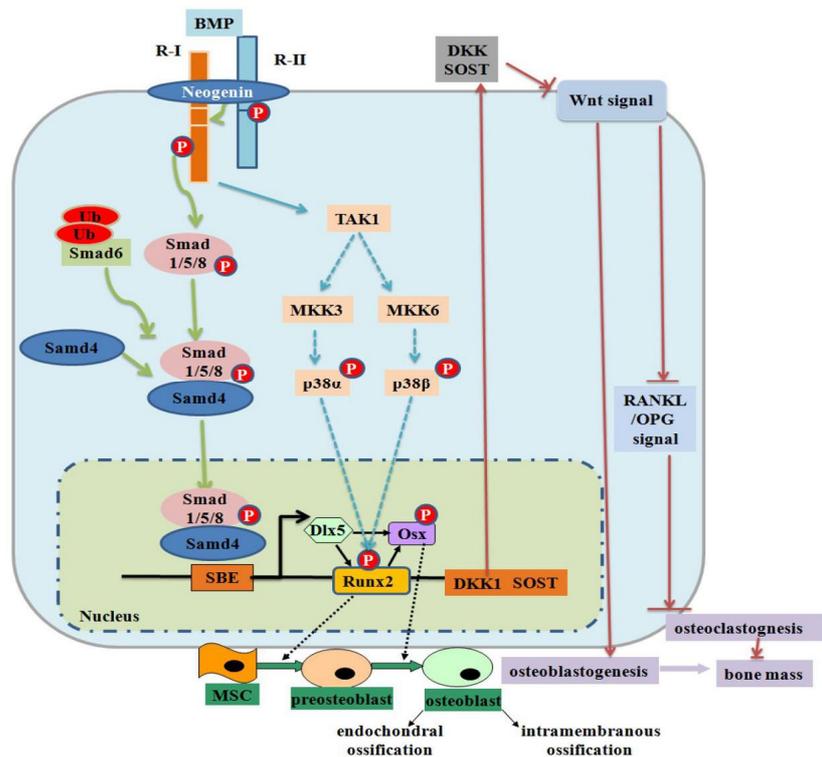


Fig. 8: Rappresentazione schematica delle vie attivate dalle BMP e regolazione negativa nel differenziamento osteoblastico. Il legame delle BMP ai recettori di tipo I (R-I) e II (R-II) attiva la via di segnale Smad dipendente. Le Smad1/5/8 attivate formano un complesso con Smad4 e traslocano nel nucleo dove regolano l'espressione di fattori trascrizionali e coattivatori importanti per gli osteoblasti (Dlx5, Runx-2 e Osx). Neogenina regola l'interazione tra il recettore delle BMP e le Smad 1/5/8. Smad6 lega il R-I prevenendo l'attivazione delle Smad 1/5/8. La seconda via attivata dalle BMP è indipendente dalle proteine Smad e si basa sul pathway TAK1 anch'esso coinvolto nella formazione ossea. L'interazione tra le vie BMP e Wnt agiscono sulla formazione ossea. SOST e DKK1 agiscono fisiologicamente come molecole a valle della via di segnale delle BMP inibendo la via canonica del Wnt regolando negativamente la massa ossea (Chen et al., 2012).

### 2.1.3. IGF-1 (Insulin-like growth factor-1)

Nell'osso, IGF-1 è uno dei fattori di crescita più abbondante e svolge un ruolo importante nella regolazione della formazione ossea (Yakar et al., 2005; Giustina et al., 2008). IGF-1 produce il suo effetto attivando diversi pathway intracellulari. L'interazione tra IGF-1 e il suo recettore IGF1R determina un cambio conformazionale del recettore, che viene attivato. A seguito dell'attivazione recettoriale diverse proteine citoplasmatiche vengono attivate, tra cui IRS-1 (insulin receptor substrate-1) e SHC (Src homology and collagen protein) (Kawai and Rosen, 2009). IRS-1 attiva il fosfatidil inositolo 3 fosfato (IP3) che agisce con PDK-1 (3-pi-Dependent kinase) attivando Akt. (Peng et al., 2003). Tale pathway risulta coinvolto nello sviluppo scheletrico e nella crescita (Peng et al., 2003; Ghosh-Choudhury et al., 2002) come dimostra la compromissione dello scheletro nei topi

KO per Akt1/Akt2 (Peng et al., 2003). SHC è responsabile dell'incremento della proliferazione degli osteoblasti mediante l'attivazione del pathway delle MAP chinasi (Ras/Raf/mitogen-activated protein) (Govoni, 2012; Kawai and Rosen, 2009). IGF-1 è rilasciato dalla matrice ossea, durante il rimodellamento osseo e va a stimolare il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali verso la linea osteoblastica attraverso la via mTOR (mammalian target of rapamycin) (James, 2013). Questo permette il mantenimento sia della struttura che della massa ossea, che sono state inibite in topi KO per il IGF1R in pre-osteoblasti (Xian et al., 2012).

#### **2.1.4. FGFs (Fibroblast Growth Factors)**

La famiglia dei FGFs è costituita da polipeptidi simili strutturalmente, la cui funzione è correlata al loro legame con recettori tirosin-chinasici (Fgfr1-Fgfr4). Essi promuovono la crescita e il differenziamento di vari tipi cellulari (fibroblasti, miociti, osteoblasti e condrociti). Il coinvolgimento dei FGFs nell'osteoblastogenesi è stata sostenuta dai risultati ottenuti in topi KO per FGF-2 che presentano una riduzione della massa e una diminuzione della formazione ossea a favore dell'adipogenesi (Montero et al., 2000). Mutazioni a carico del Fgfr2 (fibroblast growth factor receptor 2) determinano alterazioni nella proliferazione e nel differenziamento degli osteoblasti (Reardon et al., 1994), una down-regulation dell'espressione di molti geni target del pathway di Wnt e un incremento dell'espressione del fattore SOX2, che inibisce la differenziazione degli osteoblasti (Mansukhani et al., 2005).

#### **2.2. Gli osteoblasti maturi**

Gli osteoblasti maturi presentano dimensioni rilevanti (20-30µm), nucleo rotondeggiante eucromatico con grande nucleolo ed un citoplasma abbondante e basofilo. Essendo cellule secernenti, presentano un apparato di Golgi e un reticolo endoplasmatico abbondante (Neve et al., 2011). Gli osteoblasti sono uniti tra loro tramite giunzioni serrate e presentano delle regioni della membrana plasmatica specializzate al traffico vescicolare e alla secrezione. I componenti molecolari che andranno a costituire la matrice ossea vengono esocitati dalle cellule e successivamente assemblati nella loro forma definitiva all'esterno della cellula. L'osteoblasta una volta sintetizzata la matrice può andare incontro a tre possibili destini: andare incontro a morte cellulare per apoptosi, differenziarsi in un osteocita o diventare una bone lining cell.

## **2.2.1. Le funzioni degli osteoblasti**

### **2.2.1.1. Sintesi della matrice ossea**

La costruzione dell'osso da parte degli osteoblasti si costituisce di due passaggi principali che sono rispettivamente la deposizione della matrice organica e la sua successiva mineralizzazione. Il primo passaggio richiede la secrezione di collagene di tipo I, delle proteine non collageniche quali osteocalcina, osteonectina, fibronectina e osteopontina e proteoglicani come decorina (Post et al., 2010; Neve et al., 2011; Capulli et al., 2014). Questa matrice ossea non mineralizzata prende il nome di tessuto osteoide. Sebbene il processo di mineralizzazione non sia stato completamente chiarito, tale processo si basa sulla sintesi dei cristalli di idrossiapatite all'interno della matrice vescicolare. La formazione della matrice vescicolare richiede delle proteine BSP1I (Bone Sialoprotein I) e dei fosfolipidi che legano il calcio, la calbindina  $D_{9k}$  e l'annexina formante i canali del calcio (Anderson, 2003). Mentre, l'assunzione del fosfato richiesto la formazione dei cristalli di idrossiapatite dipende da due proteine quali: il co-trasportatore Na/Pi di tipo III e la fosfatasi (PHOSPHO1). Una volta che le concentrazioni di calcio e fosfato all'interno della matrice della vescicola superano il punto di solubilità il tricalcio fosfato ( $Ca_3(PO_4)_2$ ) forma i cristalli. L'idrossilazione del ( $Ca_3(PO_4)_2$ ) genera la componente inorganica della matrice ossea, l'idrossiapatite. I cristalli di idrossiapatite sono rilasciati nello spazio extracellulare andando a riempire gli spazi vuoti tra le fibrille di collagene.

### **2.2.1.2 Regolazione dell'osteoclastogenesi**

Il mantenimento della massa ossea dipende dal corretto equilibrio tra la funzione osteogenica e il riassorbimento osseo, quest'ultimo compiuto dagli osteoclasti. Il corretto bilanciamento tra formazione ossea e distruzione è raggiunto non solo da fattori sistemici, ma anche dal cross-talk tra osteoblasti e osteoclasti. Crescenti evidenze nel corso degli anni hanno dimostrato la capacità degli osteoblasti di influenzare la formazione degli osteoclasti in maniera paracrina (Capulli et al., 2014). M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) interagisce con il suo recettore espresso sulla membrana dei pre-osteociti, promuovendo così la loro proliferazione e il differenziamento. Un altro pathway importante per la differenziazione degli osteoclasti è regolata da RANKL/RANK che si basa sull'interazione tra osteoblasti e pre-osteoclasti. RANKL, viene prodotta dagli osteoblasti, dagli osteociti, dalle cellule del sistema immunitario. L'interazione tra RANKL e il suo recettore presente sulla membrana dei pre-osteoclasti attiva la fusione e la differenziazione di queste cellule in osteoclasti maturi, attraverso l'attivazione del pathway a valle che coinvolge la

traslocazione nel nucleo di NfκB (transcription factor nuclear factor-kappaB). Gli osteoblasti, producono anche l'osteoprotegerina che inibisce l'osteoclastogenesi legandosi a RANKL, impedendo l'interazione con il suo recettore. Esistono altri fattori paracrini prodotti dagli osteoblasti che influenzano positivamente la formazione degli osteoclasti come l'interleuchina 1beta (IL-1beta), IL-6, TNF-alfa e il PTHrP (parathyroid hormone related protein) (Teitelbaum, 2007).

### **3. Gli Osteociti**

Gli osteociti rappresentano le cellule più abbondanti nel tessuto osseo (rappresentando il 90-95% del totale) sono situati all'interno della matrice ossea e derivano dalle cellule staminali mesenchimali attraverso la differenziazione degli osteoblasti (Bellido, 2014; Capulli et al., 2014). Una volta sintetizzata la matrice gli osteoblasti possono andare incontro a tre destini diversi: diventare osteociti, cellule di rivestimento o andare incontro a morte programmata (Capulli et al., 2014). Circa il 15% degli osteoblasti rimangono intrappolati nella matrice ossea diventano osteociti, che pur rimanendo cellule vitali, entrano in uno stato di quiescenza. Queste cellule sono caratterizzate da un corpo appiattito dal quale possono formarsi fino a cinquanta prolungamenti citoplasmatici ramificati alloggiati nei canalicoli ossei all'interno della matrice mineralizzata (Bonewald, 2011). Questi prolungamenti connettono queste cellule tra loro e con delle cellule della superficie ossea coordinando (Bellido, 2014) la risposta dell'osso ai segnali meccanici e biologici (Civitelli, 2008).

#### **3.1. Differenziazione degli osteociti**

La differenziazione degli osteociti è caratterizzata da cospicui cambiamenti morfologici e ultrastrutturali, durante i quali una sotto popolazione di osteoblasti perde la forma poligonale, riducendo il corpo cellulare e il numero di organelli citoplasmatici, e ha inizio lo sviluppo di processi dendridici. Tale processo si costituisce di quattro fasi di maturazione dove si distinguono il pre-osteocita di tipo I, il pre-osteocita di tipo II, il pre-osteocita di tipo III giovane e l'osteocita maturo (Capulli et al., 2014) (Fig. 9).

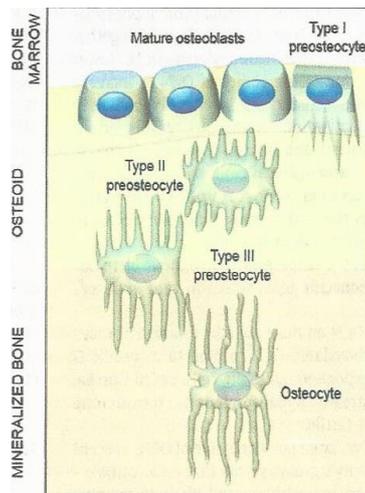


Fig. 9: Rappresentazione schematica degli step di differenziamento degli osteoclasti, dal osteoblasta maturo all'osteoclasta maturo (Capulli et al., 2014).

Il cambiamento morfologico degli osteociti è mediato dall'espressione di geni coinvolti: nella formazione del processo dendritico e nella formazione dei canalicoli come proteine associate alla membrana E11/gp38, CD44 e fimbrina e metalloproteine (MMP14) (Holmbeck et al., 2005; Zhang et al., 2006), geni relativi al metabolismo del fosfato e della mineralizzazione della matrice tra cui Phex (Phosphate-regulating neutral endopeptidase), DMP1 (dentin matrix protein 1), MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein) e FGF23 (fibroblast growth factor 23) (Paic et al., 2009; Bonewald, 2011), geni che regolano la formazione ossea come DKK1, SOST (Bonewald, 2011) e geni che regolano il riassorbimento osseo RANKL, M-CSF, OPG.

### **3.2. Le funzioni degli osteociti**

#### **3.2.1. L' osteocita come mecano sensore**

Gli osteociti sono in grado di costituire una rete tridimensionale sepolta nella matrice ossea capace di trasmettere precisi segnali alla superficie ossea, luogo dove avvengono i fenomeni di riassorbimento e neoformazione. Tali cellule, risultano collegate tra loro mediante gap junctions. L'organizzazione spaziale, la forma e la distribuzione degli osteociti nella matrice ossea contribuiscono alla percezione di stimoli meccanici (Capulli et al., 2014). E' opinione riconosciuta che tali cellule siano in grado di trasdurre segnali meccanici in segnali biochimici (Knothe Tate et al., 2008). Non sono ancora stati chiariti quali siano i componenti ultrastrutturali coinvolti in tale attività. Xiao et al., (2006) hanno dimostrato che un complesso proteico, costituito da cilium e da cilia-associated proteins

PolyCystin 1 (PC1) e PC2 è essenziale per l'attività meccanosensoriale degli osteociti, mentre Santos e collaboratori (2009) hanno suggerito il coinvolgimento di proteine di adesione focale, come paxillina, vinculina e talina espresse nel citoscheletro degli osteociti nella loro attività di mecano trasduttori. Questo complesso infatti viene attivato dal fluido interstiziale presente nei canalicoli e, a sua volta, induce la stabilizzazione di  $\beta$ -catenina negli osteociti con un meccanismo dipendente dal FAK (focal adhesion kinase). Dopo aver ricevuto i segnali meccanici e averli convertiti in un segnale chimico, gli osteociti orchestrano la formazione dell'osso e il riassorbimento agendo sulla differenziazione e la funzionalità di osteoblasti e osteoclasti.

### **3.2.2. L'osteocita regola la formazione ossea**

Gli osteociti maturi presenti nella matrice secernono sclerostina, il prodotto del gene SOST. Sclerostina rappresenta un potente inibitore della formazione ossea. Studi genetici sul topo hanno confermato che questa glicoproteina inibisce la formazione ossea (Winkler et al., 2003; Loots et al., 2005; Poole et al., 2005; Li et al., 2008; Lin et al., 2009) interagendo direttamente con il co-recettore LRP5/6 di Wnt, inibendo il pathway canonico di Wnt (Ellies et al., 2006; Semenov et al., 2005; Leupin et al., 2011). La perdita dell'espressione del gene SOST sia nell'uomo (Lin et al., 2009) che nel topo (Li et al., 2008) porta ad un aumento della massa ossea, mentre l' over-espressione di SOST ne determina una riduzione (Loots et al., 2005; Rhee et al., 2011). L'espressione di sclerostina è inibita da una serie di fattori. In aggiunta alla sua inibizione da carico meccanico, sclerostina è inibita da fattori paracrini che stimolano la formazione ossea (Tonna and Sims, 2014) come il PTHrP (peptide correlato al paratormone), la prostaglandine E2 (Genetos et al., 2011) e l'ipossia (Genetos et al., 2010). L'inibizione dell'espressione di sclerostina da parte di questi fattori è rapido, presumibilmente riflettono un effetto diretto sull'espressione genica degli osteociti. In altri casi, i livelli d'espressione di sclerostina sono bassi a causa di un blocco precedente nella differenziazione degli osteoblasti, come si è visto in modelli di topo con delezione specifica di Osterix negli osteoblasti (Yang et al., 2010). L'espressione di SOST è regolata negativamente anche dal paratormone (PTH) (Capulli et al., 2014; Bellido, 2014). Infatti, la delezione dei recettori del PTH, aumenta l'espressione di SOST (Powell et al., 2011) ostacolando la differenziazione degli osteoblasti, mentre l'espressione specifica di un recettore PTH costitutivamente attivo negli osteociti down-regola SOST (Rhee et al., 2011) (Fig. 10). Sost prodotta dagli osteociti, rappresenta il principale regolatore negativo della differenziazione e della funzionalità osteoblastica.

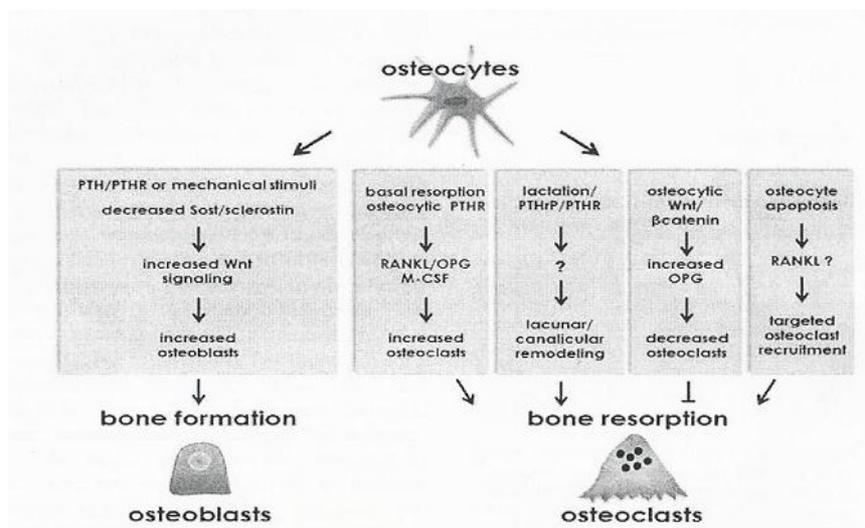


Fig. 10: Rappresentazione schematica della regolazione esercitata dagli osteociti sugli osteoblasti e sugli osteoclasti. Gli osteociti regolano la formazione ossea attraverso SOST/sclerostina. Gli osteociti regolano il riassorbimento osseo attraverso citochine pro e anti osteoclasto geniche (Bellido, 2014).

### 3.2.3. L'osteocita regola il riassorbimento osseo

Gli osteociti regolano il riassorbimento osseo attraverso citochine che agiscono positivamente o negativamente sull'osteoclastogenesi (Fig. 10). È stato ampiamente riportato in letteratura che uno degli eventi più importanti nella regolazione del rimodellamento osseo sia l'apoptosi degli osteociti, che si verifica in condizioni diverse, quali l'immobilizzazione prolungata, la carenza di estrogeni, è strettamente associato all'attivazione del riassorbimento osseo. L'apoptosi degli osteociti regola il reclutamento dei precursori degli osteoclasti e stimola l'osteoclastogenesi mediante meccanismi diretti o indiretti. La morte programmata degli osteociti determina un aumento della secrezione di RANKL sia da parte degli osteociti stessi che da parte delle cellule stromali e degli osteoblasti (Bellido, 2014). L'aumento dei livelli di RANKL può essere dovuto anche all'attivazione del recettore del PTH presente sugli osteociti. È noto che durante l'allattamento si può verificare una perdita di massa ossea che sembra essere dovuta ad un incremento del peptide di correlazione al PTH e dall'aumentata espressione dei recettori osteocitari del PTH (Bellido et al., 2013; Qing et al., 2012). Gli osteociti possono anche secernere osteoprotegerine (OPG), che legandosi a RANKL inibisce l'osteoclastogenesi. Negli osteociti, come negli osteoblasti, la secrezione di OPG è regolata da Wnt/β-catenina; i topi che presentano una carenza di β-catenina negli osteociti presentano un quadro osteoporotico dovuto ad un aumento del numero degli osteoclasti e del riassorbimento

(Kramer et al., 2010). E' stata inoltre evidenziata come gli osteociti possano rappresentare una fonte supplementare del M-CSF aumentando l'osteoclastogenesi (Harris et al., 2012).

#### **4. Rimodellamento osseo**

L'osso è un tessuto dinamico sottoposto costantemente a turnover grazie al processo di rimodellamento osseo. Tale processo assicura la sostituzione continua di osso invecchiato con osso neoformato meccanicamente più competente. Si tratta di un evento multicellulare che coinvolge osteoclasti, osteoblasti, osteociti e cellule di rivestimento (Kular et al., 2012). Il coordinamento di tali cellule permette di mantenere la forma e la struttura ossea sostanzialmente invariati per tutta la vita, nonostante gli eventi ripetuti di riassorbimento e neo formazione a cui l'osso è sottoposto (Andersen et al., 2013; Sims and Vrahnas, 2014). E' stato riconosciuto da tempo che questo coordinamento è reso possibile dall'organizzazione di squadre di rimodellamento osseo locali, chiamate unità multicellulari di base (BMUs) (Frost, 1969) che si attivano in maniera desincronizzata in corrispondenza della superficie ossea.

##### **4.1. Le fasi del rimodellamento osseo**

Ogni ciclo di rimodellamento si compone di tre passaggi sequenziali obbligati: la fase di attivazione, la fase di inversione e la fase di terminazione (Hadjidakis and Androulakis, 2006; Seibel, 2006; Delaisse, 2014) (Fig. 11).

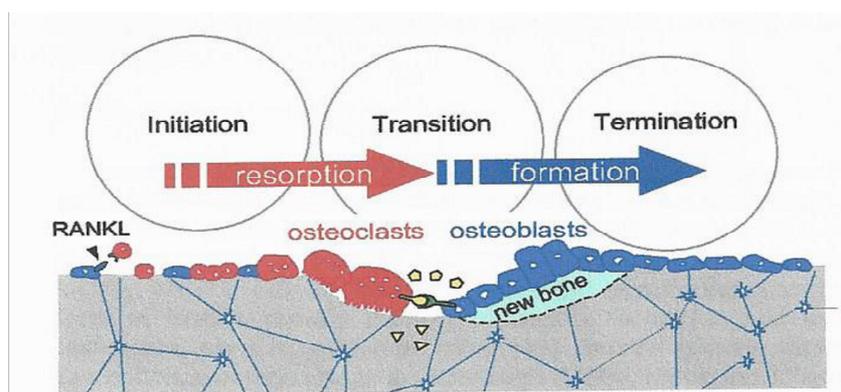


Fig. 11: Modello raffigurante le tre fasi del rimodellamento osseo. Gli osteoclasti sono rappresentati in rosso, gli osteoblasti in blu, gli osteociti a forma di stella con i loro relativi canalicoli (linee blu) ed in giallo, a forma di pentagono e triangolo, mediatori e fattori di crescita (Matsuo and Irie, 2008).

#### **4.1.1. Fase di attivazione**

Il ciclo di rimodellamento inizia con il reclutamento dei pre-osteoclasti, la loro differenziazione in osteoclasti maturi e l'avvio del riassorbimento osseo. Il reclutamento dei monociti nel sito di riassorbimento è mediato da fattori chemotattici come la MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). MCP-1 viene prodotta dagli osteoblasti e dagli osteociti, (Graves et al., 1999; Kular et al., 2012) che producendo RANKL stimolano l'espressione dei recettori per la MCP-1 sugli osteoclasti. Altri fattori possono indirettamente regolare il processo di osteoclastogenesi, agendo come fattori solubili sugli osteoblasti, quali il paratormone (PTH), l'interleuchina-1 (IL-1), il TNF- $\alpha$  (tumour necrosis factor alpha), e la vitamina D<sub>3</sub>. L'osteoclastogenesi si basa quindi sull'interazione dei precursori ematopoietici e le cellule della linea osteoblastica che producono molecole responsabili del differenziamento terminale e funzionale degli osteoclasti come RANKL e M-CSF. Gli osteoclasti maturi grazie ad un processo di acidificazione e digestione proteolitica degradano l'osso provocando il rilascio dalla matrice di fattori di crescita, quali TGF- $\beta$  (trasformino growth factor  $\beta$ ), BMPs (bone morphogenetic protein) e IGF-II (insulin-like growth factor II) e calcio. Terminata la fase di riassorbimento inizia la fase di transizione.

#### **4.1.2. Fase di transizione**

In questa fase si assiste a livello cellulare al passaggio dal riassorbimento alla formazione ossea. Tale meccanismo prende il nome di coupling ed è regolato dai "fattori di accoppiamento". Il concetto di coupling fu introdotto nel 1960 per definire il perfetto equilibrio tra riassorbimento e neo formazione ossea. I fattori di accoppiamento comprendono i fattori rilasciati dalla matrice ossea durante il riassorbimento TGF- $\beta$ , BMPs e IGF-II (Fig. 12 A), molecole secrete dagli osteoclasti (Fig. 12 B) e infine il contatto diretto tra osteoclasti e osteoblasti mediante le efrine (Fig. 12 C). L'insieme di questi fattori permette il reclutamento dei pre-osteoblasti nella lacuna di riassorbimento, la loro proliferazione, il loro differenziamento in osteoblasti maturi.

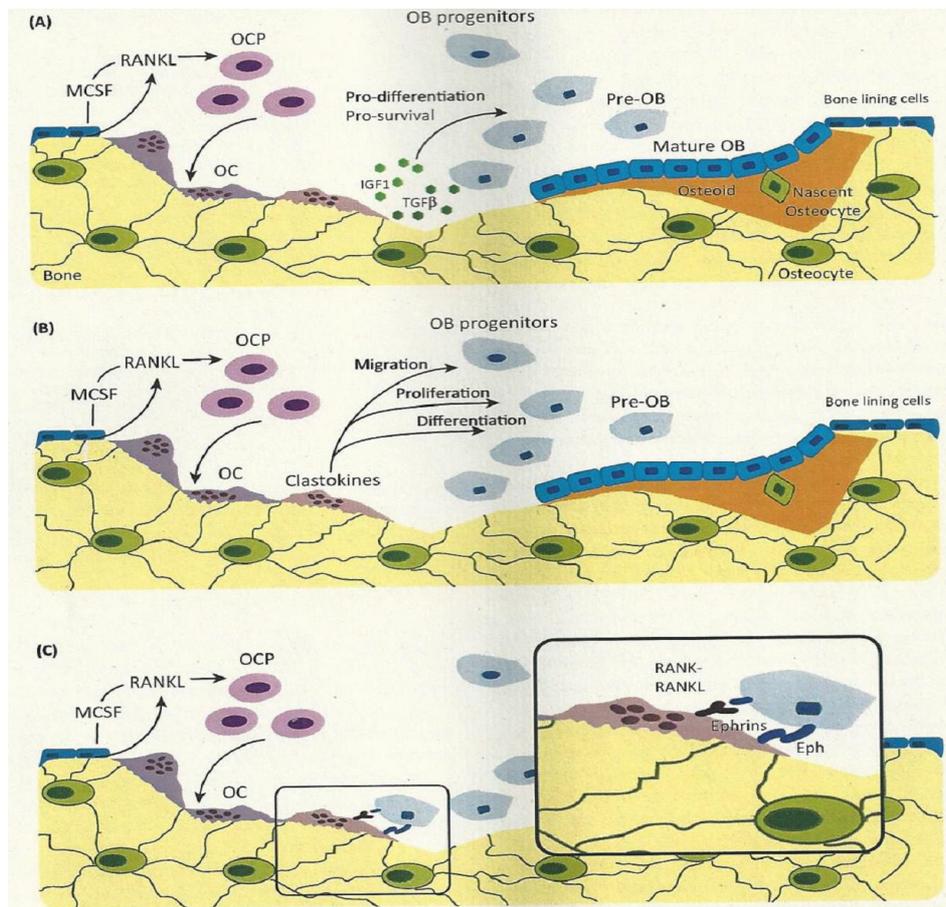


Fig. 12: Interazione tra gli osteoclasti e gli osteoblasti in una unità multicellulare di base (BMU). (A) Il differenziamento dei precursori degli osteoclasti (OCP) in osteoclasti maturi (OC) avviene grazie a fattori di crescita (MCSF, RANKL) rilasciati dalle cellule della linea osteoblastica. Gli osteoclasti maturi riassorbono l'osso, la matrice ossea rilascia TGFβ, IGF1. Questi fattori possono reclutare i precursori mesenchimali degli osteoblasti (OB progenitor) e promuovere il differenziamento in osteoblasti maturi (Mature OB) che sintetizzano nuova matrice. Gli osteoblasti che sono rimasti intrappolati nella matrice neo sintetizzata diventano osteociti, mentre gli osteoblasti presenti sulla superficie diventano cellule di rivestimento (bone lining cells). (B) Gli osteoclasti producono diverse clastochine che possono reclutare i progenitori degli osteoblasti e promuovere la proliferazione e il differenziamento. (C) meccanismo di contatto cellula-cellula mediato dalle efrine (Eph) (Charles and Aliprantis, 2014).

I fattori liberati dalla matrice, quali TGF-β, BMPs e IGF-II stimolando il reclutamento dei pre-osteoblasti e promuovendo il differenziamento in senso osteogenico regolando l'espressione di fattori trascrizionali importanti come RUNX-2, Osx, Dlx5 (Fig 12 A). I fattori liberati dalla matrice non sono sufficienti per determinare l'arresto degli osteoclasti e l'attivazione degli osteoblasti. Tale segnale viene amplificata dalle clastochine prodotte dagli osteoclasti, quali S1P (sphingosine 1-phosphate), mim-1 (myb-induced myeloid protein-1), PDGF BB (Bpolypeptide chain platelet-derived growth factor homodimeric), HGF (hepatocyte growth factor) (Fig. 12 B). SP-1, stimola la migrazione dei precursori

della linea osteoblastica verso la lacuna di Howship, interagisce con il suo recettore espresso sulla membrana dei precursori della linea osteoblastica stimolandone la sopravvivenza ed aumentando l'espressione di RANKL (Ryu et al., 2006; Pederson et al., 2008; Lotinun et al., 2013). *mim-1*, proteina di 35 kDa e PDGF BB stimolano la proliferazione dei precursori degli osteoblasti (Falany et al., 2001; Kubota et al., 2002; O'Sullivan et al., 2007). L'apoptosi degli osteoclasti dovuta ad elevati livelli di calcio (Lorget et al., 2000; Nielsen et al., 2007) inibisce la produzione di PDGF BB contribuendo all'attivazione del differenziamento osteoblastico (Kubota et al., 2002; O'Sullivan et al., 2007). Un altro fattore importante nella transizione tra riassorbimento e formazione ossea è rappresentato dal contatto diretto tra osteoclasti e osteoblasti mediato dalle efrine (Fig. 12 C). Le efrine hanno la capacità di trasdurre il segnale in maniera bidirezionale. Quando una cellula che esprime un recettore efrinico interagisce con una cellula che possiede il ligando, i segnali sono trasdotti in entrambe le cellule, tramite signaling 'reverse' e 'forward' rispettivamente (Matsuo and Otaki, 2012) (Fig. 13). Sono state identificate due classi di efrine, la classe A e la classe B che legano in modo specifico i recettori più affini EphA e EphB (Singh et al., 2012).

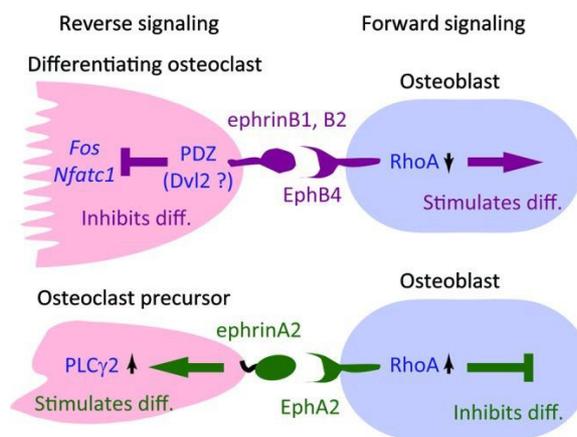


Fig. 13: Interazione tra osteoclasti-osteoblasti mediata dalle efrine e dai loro recettori Eph. EphB2 è espresso negli osteoclasti maturi, mentre EphA2 è espresso nelle prime fasi del differenziamento osteoclastico. Il reverse signaling sugli osteoclasti maturi avviene attraverso EphB2 e può essere mediato dal dominio PDZ di proteine quali dishevelled (Dvl2) che bloccano la trascrizione di Fos e NFATC1, inibendo così il differenziamento degli osteoclasti. Il forward signaling attivato da EphB4 inibisce l'attività di RhoA stimolando il differenziamento degli osteoblasti. Mentre il reverse signaling mediato dalla eparinaA2 è mediato dall'attivazione della fosfolipasi Cγ2 (PLCγ2). Il forward signaling attivato da EphA2 aumenta l'attività di RhoA bloccando la differenziazione degli osteoblasti (Matsuo and Otaki, 2012).

Durante il rimodellamento osseo gli osteoclasti maturi esprimono Ephrin B2 che si lega al suo recettore EphB4 espresso sulla membrana dei pre-osteoblasti. La segnalazione bidirezionale sopprime il riassorbimento osteoclastico e stimola la formazione ossea, facilitando la transizione tra questi due stati (Matsuo and Otaki, 2012). Terminata la differenziazione degli osteoblasti inizia il processo di formazione dell'osso che prevede il ripristino dell'osso riassorbito con nuova matrice osteoide che viene successivamente mineralizzata. Questa fase procede molto lentamente e dura molto più a lungo rispetto il processo di riassorbimento (Matsuo and Irie, 2008). Una volta che l'osso si è formato, gli osteociti producono sclerostina (SOST), che viene secreta a livello dai canalicoli, in questo modo l'azione di neodeposizione degli osteoblasti viene inibita dando inizio alla fase terminale del processo di riassorbimento.

#### **4.1.3. Fase di terminazione**

In questa fase gli osteoblasti presenti sulla superficie ossea modificano la loro struttura, presumibilmente con l'aiuto di SOST, diventando cellule di rivestimento (bone lining cells) (Hadjidakis and Androulakis, 2006; Robling et al., 2006).

Il mancato equilibrio tra riassorbimento e neo formazione durante il processo di rimodellamento può generare importanti conseguenze a carico della massa ossea. Si possono distinguere patologie caratterizzate dall'aumento della massa ossea come l'osteopetrosi, o patologie caratterizzate dalla diminuzione della massa ossea come l'osteoporosi.

## **4.2. Fattori Sistemici nel controllo del rimodellamento**

I fattori sistemici deputati alla regolazione dell'omeostasi ossea sono rappresentati da: estrogeni, paratormone (PTH), vitamina D e dallo stress ossidativo.

### **4.2.1. Estrogeni**

Gli estrogeni giocano un ruolo critico nel mantenimento dell'omeostasi ossea (Manolagas, 2000). Gli estrogeni rallentano il tasso di rimodellamento osseo e promuovono un saldo positivo tra riassorbimento e neo-formazione, esercitano un effetto pro-apoptotico sugli osteoclasti e un effetto anti-apoptotico su osteoblasti e osteociti (Manolagas, 2000; Syed et al., 2010; Manolagas et al., 2010). Gli estrogeni inibiscono il differenziamento degli osteoclasti attraverso un'interazione diretta con i propri recettori espressi su tali cellule (Nakamura et al., 2007; Martin-Millan et al., 2010). Queste attività sono responsabili degli

effetti protettivi esercitati dagli estrogeni sull'osso spongioso (Almeida and O'Brien, 2013). Il recettore degli estrogeni è presente nei progenitori della linea osteoblastica e media l'effetto protettivo esercitato dagli estrogeni contro il riassorbimento dell'osso endocorticale (Almeida et al., 2013). L'attenuazione della produzione di citochine come IL-1, IL-6, TNF-alfa e RANKL da parte di altre cellule presenti nel midollo osseo, compresi linfociti T e B, cellule stromali e cellule osteoblastiche, contribuiscono alle proprietà anti-osteoclastogeniche degli estrogeni (Jilka, 1998; Onal et al., 2012). La carenza di estrogeni determina un aumento del differenziamento osteoclastico a favore di un maggior riassorbimento osseo e un aumento dell'apoptosi di osteoblasti e osteociti. Evidenze sperimentali e cliniche condotte sia nel ratto che nell'uomo hanno mostrato come la carenza di estrogeni determini un'involuzione della massa ossea contribuendo alla perdita ossea relativa all'età e all'incremento dello stress ossidativo (Almeida and O'Brien, 2013).

#### **4.2.2. Paratormone (PTH)**

L'ormone calciotropo rappresenta un segnale endocrino importante per il mantenimento dell'omeostasi del calcio. Viene secreto dalle cellule principali delle paratiroidi in risposta alla riduzione di calcio nel siero, agisce a livello osseo e a livello renale (Raggatt and Partridge, 2010). A livello osseo promuove la mobilitazione del calcio dallo scheletro agendo come un regolatore del processo di rimodellamento osseo, mentre a livello renale diminuisce il riassorbimento del fosforo a livello del tubulo contorto prossimale ed aumenta il rilascio di calcio dal tubulo distale. La formazione e rilascio del PTH oltre ad essere controllata dalla calcemia, il cui aumento porta ad una riduzione del PTH, viene inibita dalla  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Il PTH agisce mediante il suo recettore (PTH1R) accoppiato alle proteine G, espresso sulla superficie delle cellule della linea osteoblastica (Jüppner et al., 1991). L'interazione con il recettore attiva una serie di risposte trascrizionali che producono e modulano la secrezione di molecole chiave, quali RANKL, necessarie nel reclutamento dei precursori degli osteoclasti, nel loro differenziamento e nella loro attività riassorbente (Swarthout et al., 2002; Raggatt and Partridge, 2010).

#### **4.2.3. Vitamina D**

Le azioni della vitamina D sono da attribuire al suo metabolita attivo, 1,25-diidrossicolecalciferolo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . La sua produzione è aumentata dal PTH, dall'ipocalcina, attraverso l' $\alpha$ -idrossilasi renale, e dagli estrogeni, attraverso la 25-idrossilasi. La vitamina D rappresenta un fattore fondamentale per il mantenimento di un adeguato metabolismo osseo e per l'omeostasi di calcio e fosfato. Tali effetti sono possibili

attraverso un azione diretta a livello intestinale e renale, dove induce rispettivamente la sintesi di proteine coinvolte nell'aumento dell'assorbimento di calcio e fosfato e un aumento del riassorbimento di calcio e fosfato. A livello osseo stimola la secrezione di RANKL negli osteoblasti attivando il differenziamento e la fusione dei progenitori osteoclastici e gli osteoclasti a riposo accelerando così il riassorbimento osseo (DeLuca, 2004).

#### **4.2.4. Stress ossidativo**

Numerose evidenze suggeriscono come la biologia dell'osso sia particolarmente influenzata dalla regolazione dell'equilibrio redox (Wauquier et al., 2009). Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) in condizioni fisiologiche sono coinvolte nell'omeostasi del tessuto minerale e contribuiscono al corretto equilibrio tra osteoclasti e osteoblasti (Bai et al., 2005; Ha et al., 2004; Koh et al., 2006; Lee et al., 2005) mentre un'eccessiva produzione di ROS determina uno squilibrio tra riassorbimento e neoformazione. Recenti osservazioni hanno suggerito che lo stress ossidativo possa essere coinvolto nella patogenesi di malattie ossee quali l'osteoporosi (Wauquier et al., 2009; Almeida, 2012; Filaire and Toumi, 2012). Tale patologia è caratterizzata da una bassa densità minerale ossea (BMD), deterioramento della microarchitettura del tessuto osseo, aumento della suscettibilità alle fratture (Urano and Inoue, 2014), dovuto ad un'alterazione del rimodellamento osseo a favore dell'attività riassorbente degli osteoclasti (Neve et al., 2011). L'osteoporosi ha un impatto negativo sulla qualità di vita dell'individuo e rappresentano un problema sanitario importante per l'invecchiamento progressivo della società (Demontiero et al., 2012). La diminuzione della BMD, caratteristica generale dell'osteoporosi, è associata ad un indice elevato di stress ossidativo (Almeida et al., 2007; Altindag et al., 2008; Jilka et al., 2010). Sendur et al., (2009) hanno avvalorato questa osservazione mostrando una correlazione negativa tra l'ossidazione lipidica e i valori di BMD nelle donne osteoporotiche comparate con gruppo controllo sottolineando lo stretto legame tra danno ossidativo, degenerazione tissutale e invecchiamento. Esperimenti condotti su topi anziani sia maschi che femmine hanno confermato ulteriormente il ruolo dei ROS nell'osteoporosi senile mostrando elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno e una riduzione del tasso di neoformazione ossea (Almeida et al., 2007). In questo studio Almeida e collaboratori hanno sottolineato come l'aumento dei ROS si deve ad una riduzione delle difese antiossidanti della cellula e che gli stessi livelli di specie reattive dell'ossigeno sono stati riprodotti da gonadectomia. A tale proposito, si è visto come le manifestazioni cliniche dell'osteoporosi si manifestano principalmente nella popolazione

anziana con una maggior prevalenza nelle donne in postmenopausa dove si è notato una ridotta attività degli enzimi antiossidanti (Manolagas, 2013; Almeida, 2012; Wauquier et al., 2009; Ozgocmen et al., 2007). L'eccessiva produzione di ROS che si verifica nell'osso, incrementa la fosforilazione di p53 e p66 portando all'apoptosi di osteoblasti e osteociti e può privilegiare il differenziamento delle cellule stromali del midollo osseo verso gli adipociti, con conseguente aumento dell'adipogenesi e la diminuzione dell'osteoclastogenesi (Stenderup et al., 2003; Sethe et al., 2006; Kasper et al., 2009; Coipeau et al., 2009). Le cellule mesenchimali staminali sia di topo che di ratto trattate con perossido di idrogeno hanno mostrato una riduzione dei markers osteogenici come il collagene di tipo I, la fosfatasi alcalina (ALP) e il fattore trascrizionale Runx2 confermando una soppressione del differenziamento osteoblastico (Liu et al., 2004). Questi studi suggeriscono un legame meccanicistico tra gli ossidanti intracellulari e il declino della funzione rigenerativa delle cellule staminali adulte, che si verifica come una normale conseguenza dell'invecchiamento (Almeida and O'Brien, 2013). I ROS aumentano il numero degli osteoclasti e il riassorbimento osseo stimolando l'espressione di RANKL e TNF-alfa attraverso l'attivazione di ERK e NF-kB (Manolagas, 2010). L'aumento dell'attività degli osteoclasti porta ad un aumento della formazione di anione superossido, all'inibizione dell'attività della superossido dismutasi e della glutatione perossidasi con conseguente perdita di massa ossea (Sheweita et al., 2007). L'identificazione di composti in grado di modulare contemporaneamente l'attività degli osteoblasti e di ridurre gli effetti negativi dello stress ossidativo sulla massa ossea potrebbero rappresentare un approccio terapeutico mirato per il trattamento dell'osteoporosi.

## **SCOPO DELLA RICERCA**

Nello scheletro adulto approssimativamente il 5-10% dell'osso esistente viene sostituito ogni anno con osso meccanicamente più competente, attraverso il processo di rimodellamento osseo. La sequenza di eventi che costituisce il processo di rimodellamento osseo incomincia con il riassorbimento osseo ad opera degli osteoclasti, seguito dalla neo deposizione ossea ad opera degli osteoblasti. Il mantenimento di una massa ossea normale e sana dipende da diversi fattori sia locali che sistemici in grado di influenzare la funzione delle cellule ossee e la comunicazione tra queste. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono generate da numerosi agenti ambientali come dal normale metabolismo. Recentemente è emerso come lo stress ossidativo dovuto ad un aumento eccessivo di ROS possa contribuire allo sviluppo di patologie degenerative correlate all'invecchiamento, tra cui l'osteoporosi (Muller et al., 2007; Wauquier et al., 2009; Jilka et al., 2010; Almeida, 2012). Lo stress ossidativo svolge un ruolo importante nella perdita di massa ossea correlata all'età, non solo nei roditori (Banfi et al., 2008), ma anche negli esseri umani (Basu et al., 2001; Maggio et al., 2013), con conseguente aumento dell'apoptosi di osteoblasti e osteociti e una riduzione del tasso di formazione ossea (Manolagas and Parfitt, 2010). E' possibile ipotizzare che l'identificazione di composti in grado di modulare l'attività degli osteoblasti e ridurre gli effetti negativi dello stress ossidativo sulla massa ossea potrebbe rappresentare un approccio terapeutico mirato per il trattamento dell'osteoporosi. La nostra attenzione si è focalizzata su ghrelina, un peptide costituito da 28 aminoacidi identificato nel 1999 da Kojima e collaboratori come ligando endogeno dei recettori dei composti in grado di stimolare la secrezione di ormone della crescita (GH). Negli ultimi anni, gli effetti di ghrelina sul tessuto osseo hanno ricevuto una crescente attenzione (van der Velde et al., 2008; Nikolopoulos et al., 2010; Delhanty et al., 2014). Ghrelina è infatti coinvolta nella regolazione del metabolismo osseo, indipendentemente dalla sua attività di stimolo della secrezione del GH. La somministrazione periferica del peptide determina un aumento della massa ossea (Fukushima et al., 2005) principalmente

dovuto ad un'attività anabolica diretta sugli osteoblasti (Maccarinelli et al., 2005; Kim et al., 2005), inoltre è in grado di inibire l'apoptosi delle cellule MC3T3-E1 (Kim et al., 2005). In particolare è emerso che il peptide diminuisce il danno ossidativo in vari tessuti sia periferici (El Eter et al., 2007; Kawczynska-Drozd et al., 2006; Iseri et al., 2008; Zhang et al., 2011) che nel cervello (Obay et al., 2008). Sulla base di queste premesse abbiamo esaminato la possibilità che ghrelina potesse proteggere gli osteoblasti dal danno ossidativo indotto dal *t*-BHP, un idroperossido organico ampiamente utilizzato nell'indurre stress ossidativo in diversi tipi di cellule. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare gli effetti di ghrelina sulla tossicità indotta dal *t*-BHP sulla vitalità cellulare e sui cambiamenti morfologici di una linea stabilizzata di pre-osteoblasti murini, MC3T3-E1. Successivamente, per verificare se il recettore GHSR-1a fosse responsabile dell'effetto protettivo esercitato dal peptide, abbiamo esaminato l'effetto di analoghi sintetici che agiscono come agonisti (EP1572) e antagonisti specifici (D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6) del GHSR-1a e di DAG, isoforma naturale di ghrelina, presente in concentrazione maggiore nel sangue, che non si lega al GHSR-1a. Abbiamo poi esaminato se ghrelina contrastasse gli effetti del danno ossidativo indotto dal *t*-BHP sugli osteoblasti differenziati andando a valutare due markers specifici della funzionalità osteoblastica, la fosfatasi alcalina (ALP) e il collagene. Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo valutato il coinvolgimento del pathway PI3K/Akt nell'effetto protettivo esercitato da ghrelina mediante il pre-trattamento con l'inibitore selettivo del PI3K, Ly294002. In fine, poiché è noto dalla letteratura che il pathway PI3K/Akt controlla la fosforilazione di diversi bersagli tra cui la glicogeno sintasi chinasi-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) fondamentale nella regolazione della sopravvivenza e del differenziamento degli osteoblasti attraverso  $\beta$ -catenina, abbiamo esaminato se ghrelina in condizioni basali potesse agire su GSK-3 $\beta$  e  $\beta$ -catenina e successivamente se il pre-trattamento con Ly294002 fosse in grado di prevenire gli effetti del peptide sui livelli di GSK-3 $\beta$  e  $\beta$ -catenina.

# **MATERIALI E METODI**

## **1. Colture cellulari e loro mantenimento**

In questo studio sono state utilizzate una linea stabilizzata di osteoblasti murini MC3T3-E1 (ATCC numero di catalogo CRL-2593) e colture primarie di osteoblasti derivati da calvaria di ratti (Sprague Dawley, Charles River Laboratories, Inc) di due-tre giorni di età. Per il mantenimento delle colture cellulari si è utilizzato un terreno completo formato da Dulbecco Modified Eagle (D-MEM, Euroclone, Italia), a cui si sono aggiunti: 1% di L-glutamina, 100 µg / ml di streptomina e 100 U / ml di penicillina e il 10% di siero fetale bovino (FBS, Euroclone, Italia) a 37 ° C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Il mantenimento delle colture prevede il cambio del medium di coltura e, se necessario, la divisione delle cellule mediante l'utilizzo di tripsina, quando raggiungono la confluenza.

## **2. Isolamento di osteoblasti derivati da calvaria di ratto (rOB)**

Dopo aver liberato la calotta cranica, le ossa parietali sono state prelevate, ed il periostio è stato eliminato per raschiamento. I frammenti di osso così ottenuti sono stati lavati dapprima con soluzione fisiologica e successivamente con 5 ml di terreno Jocklik Minimum Essential Medium (MEM) privo di calcio (Sigma). I frammenti sono stati successivamente incubati in una soluzione di Jocklik MEM contenente collagenasi di tipo IV (10mg/ml) (Sigma) per 20 minuti a 37°C, in agitazione. Al termine dell'incubazione, l'attività collagenasica è stata inibita mediante l'aggiunta di un pari volume di terreno completo; i frammenti di osso così digeriti sono stati piastrati in flasks di 75cm<sup>2</sup> in terreno completo e mantenute a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo una settimana, è possibile osservare un monostrato confluyente di cellule con caratteristiche osteoblastiche, definite "rat osteoblast like cells" (rOB).

## **3. Valutazione del contenuto di collagene**

Le cellule MC3T3-E1 sono state seminate in terreno completo ad una concentrazione di  $1 \times 10^4$  cell/pozzetto in multiwell da 48 pozzetti, sono state trattate, al 90 % di confluenza, con terreno completo contenente 10 mM di β-glicerolfosfato e 50 µg/ml di acido ascorbico per indurre il differenziamento. Il medium differenziante è stato cambiato ogni due giorni per un totale di tre step differenzianti. Il contenuto di collagene è stata valutata utilizzando il colorante Sirius Red (Sigma Aldrich, Italia) che presenta un'affinità specifica per il collagene.

Le cellule sono state fissate con fissativo Bouin (acido picrico in soluzione acquosa satura, formalina ed acido acetico glaciale in rapporto 15:5:1), per 1 ora a temperatura ambiente. Avvenuta la fissazione, le cellule sono state lavate per 15 minuti sotto l'acqua corrente e

successivamente lasciate asciugare all'aria. Per la colorazione del collagene è stato quindi aggiunto ad ogni pozzetto una soluzione di Sirius Red allo 0,1% in soluzione satura di acido picrico per 1 ora a temperatura ambiente in leggera agitazione. Dopo un lavaggio con HCL 0,001 N per rimuovere il colorante in eccesso si è preceduto con l'eluizione del colorante legato al collagene mediante NaOH 0,1 N. L'eluato così ottenuto è stato successivamente letto allo spettrofotometro (Victor<sup>tm</sup>, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) alla lunghezza d'onda di 550 nm.

#### **4. Attività della fosfatasi alcalina (ALP)**

Le cellule MC3T3-E1 sono state seminate in terreno completo ad una concentrazione di  $1 \times 10^4$  cell/pozzetto in multiwell da 48 pozzetti, sono state trattate, al 90 % di confluenza, con terreno completo contenente 10 mM di  $\beta$ -glicerolfosfato e 50  $\mu$ g/ml di acido ascorbico per indurre il differenziamento. L'attività dell'ALP è stata misurata con un metodo biochimico basato sulla conversione del p-nitrofenil fosfato in p-nitrofenolo. Le cellule sono state lisate con 0.2% di triton X-100 e centrifugate a 14000xg per 5 min. Il surnatante è stato incubato in un tampone AMP (2-amino-2metile-1propanolo) pH 10,3 in presenza di p-nitrofenil fosfato (Sigma-Aldrich) come substrato. Dopo un'incubazione di 30 minuti a 37°C, la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di NaOH 0.5 mol/L ed è stata effettuata la lettura spettrofotometrica dei campioni a 405 nm, utilizzando uno spettrofotometro (Victor<sup>tm</sup>, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). L'attività della ALP è stata calcolata per interpolazione dei valori di assorbanza su una curva standard costituita da diluizioni seriali di una soluzione di p-nitrofenolo. I risultati sono stati espressi come nmoli di p-nitrofenolo formato in 1 min e normalizzati per il quantitativo totale di proteine misurate sugli stessi campioni mediante un kit commerciale (Pierce, Rockford) basato sull'acido bicinconinico (BCA).

#### **5. Misurazione della vitalità cellulare**

Le cellule MC3T3-E1 sono state seminate in terreno completo ad una concentrazione di  $3 \times 10^3$  cell/pozzetto in multiwell da 96 pozzetti, sono state lasciate aderire alla plastica per 24 ore. Le cellule sono state trattate con i composti in esame in terreno privo di FBS. La vitalità cellulare è stata valutata mediante il test MTT 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT, Sigma-Aldrich Chemical, Italia) che consiste in un saggio colorimetrico standard che si basa sulla capacità degli enzimi mitocondriali, succinato deidrogenasi, di ridurre l'MTT a formazano. Tale metodica prevede che in ogni pozzetto siano depositati 100  $\mu$ l di una soluzione di MTT 0,5 mg/ml e il tutto venga

incubato per 3 ore a 37 ° C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> al buio. La formazione dei cristalli di formazano è stata valutata dopo solubilizzazione con 100 µl di dimetil solfossido (DMSO). L'intensità della colorazione rilevabile allo spettrofotometro (Victor<sup>tm</sup>, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) alla lunghezza d'onda di 550 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di formazano ed è quindi espressione della vitalità cellulare.

Le osservazioni fenotipiche delle cellule sono state realizzate utilizzando un microscopio Olympus TH4-200 a contrasto di fase, munito di fotocamera digitale con zoom C-4040 Olympus per registrare gli eventuali cambiamenti morfologici.

## **6. Microscopia a fluorescenza**

### **6.1. Condensazione della cromatina nelle cellule MC3T3-E1 (Hoechst staining)**

I vetrini da 22 mm di diametro, sono stati lavati con etanolo puro, collocati in una petri da 10 cm e sterilizzati per 5-10 minuti in microonde alla massima potenza in presenza di un becker pieno di acqua. I vetrini vengono collocati nei pozzetti di una multiwell da 6 pozzetti; le cellule sono state seminate in terreno completo ad una concentrazione di 5 x 10<sup>3</sup> per pozzetto, dopo 48 ore le cellule sono state trattate. Al termine dei trattamenti le cellule adese ai vetrini sono state lavate con PBS e fissate con una soluzione di paraformaldeide al 4% per 20 minuti a 37° C. Dopo un lavaggio con PBS le cellule sono state permeabilizzate con 0,1 % TritonX-100 in PBS per 5 minuti (300 µl/ pozzetto) a temperatura ambiente, e successivamente lavate con PBS (300 µl/ pozzetto) per 5 minuti. Per visualizzare il DNA si è effettuato un'incubazione per 5 minuti con Hoechst 33252 staining (Sigma-Aldrich Chemical., Italy; 10 µg/ml) a temperatura ambiente al buio al termine della quale si è effettuato un lavaggio con PBS per 5 minuti e i vetrini sono stati montati su un vetrino portaoggetto mediante un mowiol. Le cellule sono state osservate utilizzando un microscopio a fluorescenza (Axioplan).

La fluorescenza emessa nel blu permette di osservare la conformazione del DNA che risulta alterata nelle cellule apoptotiche. Queste cellule sono caratterizzate da una frammentazione e riduzione delle dimensioni nucleari e condensazione della cromatina. I vetrini sono stati analizzati con obiettivi non immersi in olio con ingrandimento 20x. Sono state contate almeno 200 cellule per ogni trattamento da 3 osservatori in cieco.

## **6.2. Riarrangiamenti citoscheletrici**

Le cellule fissate e permeabilizzate sono state lavate con PBS per 5 minuti e successivamente incubate 20 minuti con FICT-labeled falloidina (diluizione 1:100 in PBS, in cameretta umida, oscurata a temperatura ambiente) per la colorazione dei microfilamenti di actina. Al termine dell'incubazione si effettuano dei lavaggi con PBS per 2-4 volte per 5 minuti ciascuna. I vetrini sono stati montati su un vetrino portaoggetto con una goccia di medium acquoso (Vectashield Hard Set Mounting Medium) contenente 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA) un intercalante del DNA. Le immagini sono state ottenute usando un microscopio a fluorescenza (Axioplan) con un ingrandimento 20x. La lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione erano rispettivamente: FITC 488/490 (blu) – 525/520 (verde); DAPI 340 (UV) – 480/488 (blu).

## **7. Determinazione del contenuto proteico dei lisati cellulari**

La concentrazione totale di proteine nel lisato cellulare è stata determinata utilizzando un kit commerciale (Pierce) basato sull'acido bicinconinico (BCA). Questo metodo combina la riduzione del rame ( $\text{Cu}^{+2} \rightarrow \text{Cu}^{+1}$ ) effettuata dalle proteine in mezzo alcalino (reazione del Biureto) con la determinazione colorimetrica altamente sensibile e selettiva del catione  $\text{Cu}^{+1}$ , usando un unico reagente BCA. La reazione colorimetrica è data dalla chelazione di due molecole di BCA con uno ione rame. L'assorbanza di ogni campione è stata misurata allo spettrofotometro utilizzando una lunghezza d'onda pari a 550 nm. Le concentrazioni proteiche dei singoli campioni sono state misurate in riferimento ad una curva standard di BCA ed espresse in  $\mu\text{g/ml}$ .

## **8. SDS PAGE e Western Blotting**

Gli osteoblasti (rOB) sono stati piastrati in multiwell da 6 pozzetti, raggiunta la confluenza, le cellule sono state trattate in assenza di FBS. Al termine del trattamento le cellule sono state lisate per 30 minuti in ghiaccio utilizzando un buffer di lisi così costituito: RIPA Buffer (1% Triton, 0,5% Na deoxycolate e 0,1 % SDS) + inibitori delle fosfatasi (0.4 % del volume finale), inibitori delle proteasi (2 % del volume finale), EDTA 0,5M (2 % del volume finale), NaF 1M (2 % del volume finale) (Sigma). I lisati sono stati raccolti e centrifugati a 12000 rpm per 10 minuti a 4°C per eliminare i nuclei. Su un'aliquota del lisato è stato eseguito il dosaggio delle proteine totali (BCA, Pierce) in modo da caricare per ciascun aliquota la stessa quantità di proteine 35 $\mu\text{g}$ . Le proteine presenti negli estratti sono separate per elettroforesi su un gel di poliacrilammide al 10% con sodio

dodecilsolfato (SDS-PAGE) in presenza di Electrode Buffer e trasferite su membrana di nitrocellulosa.

**Electrode Buffer** (10X, pH 8,3-8,6) in 1L: Tris 30,3 g

SDS 10 g

Glicina 144,7 g

Il principio su cui si basa questa tecnica è l'attività denaturante dell'SDS; questo è in grado di interagire con le proteine in un rapporto costante 1.4g SDS ogni g di proteina.

La separazione avviene quindi per differenza fra pesi molecolari visto che il rapporto massa carica per ogni proteina denaturata con SDS rimane costante.

Il gel di poliacrilammide si compone di due parti:

- stacking gel (o gel di impaccamento): è la parte superiore del gel e la sua funzione è quella di concentrare il campione proteico caricato negli appositi pozzetti, in modo che tutti i campioni comincino la loro migrazione dallo stesso punto di partenza;
- running gel (o gel di separazione): è la parte inferiore e la sua funzione è quella di separare le proteine dei vari campioni sulla base del loro peso molecolare. In particolare è importante la concentrazione di acrilammide, per ottenere la porosità desiderata: concentrazioni maggiori portano a pori di dimensioni minori, dunque capaci di separare le proteine con una risoluzione maggiore.

**Running gel 10%** (gel di separazione):

- 1.3 ml Lower Buffer (1,5M Tris, 4% SDS, pH 8,8): 12,9% vol/vol
- 1.6 ml Acrilammide/Bis solution 29:1 (Biorad): 33% vol/vol
- 25 µl Ammonio Persolfato 1M (Biorad)
- 2.5 µl Temed

**Stacking gel** (gel di impaccamento):

- 1.3 ml Upper Buffer (0,5M Tris, 4% SDS, pH 6,8): 26% vol/vol
- 0.5 ml Acrilammide/Bis solution 29:1 (Biorad): 10%
- 25 µl Ammonio Persolfato 1M (Biorad)
- 5 µl Temed

I campioni sono stati bolliti per 5 minuti in un tampone contenente Tris HCl 1M pH 6,8, glicerolo 20%, SDS 10%, DTT 100mM, blu bromofenolo 0,005% (sample buffer, 1:5 del volume di ciascun campione), successivamente caricati nei pozzetti.

La corsa elettroforetica è stata eseguita a voltaggio costante, 100V.

Le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa 0,2 micron (Sigma) in transfer buffer tramite Trans-Blot semi-dry (Biorad) in 45 minuti a 15V.

**Transfer Buffer:** Tris 3,03 g

Glicina 14 g

Metanolo 200 ml

Acqua distillata q.b. a 1L

Al termine del trasferimento, le proteine su nitrocellulosa sono state visualizzate mediante colorazione con Rosso Ponceau (Ponceau S 2%, acido tricloroacetico 30%, acido sulfosalicilico 30%) per verificare l'uniformità in concentrazione e trasferimento delle proteine caricate nei diversi pozzetti.

In seguito, i filtri di nitrocellulosa sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione di latte disidratato e scremato al 5% in TBS-Tween (Tris-HCl 10mM, NaCl 150mM pH 7.4, 0.1% Tween20) per la saturazione dei siti aspecifici.

I livelli delle proteine di interesse sono stati valutati mediante incubazione over night a 4°C della membrana di nitrocellulosa con gli anticorpi primari specifici: anticorpo primario policlonale contro la regione carbossi-terminale della forma umana di  $\beta$ -catenina prodotto in capra (Santa-Cruz Biotechnology, diluito 1:5000 in latte al 5% in TBS-Tween), della forma fosforilata e totale di GSK-3 $\beta$  prodotto in coniglio (anti- $\beta$ -catenina, diluizione 1:2000 in latte al 5% in TBS-Tween, Cell Signaling). I livelli di  $\beta$ -catenina sono stati normalizzati sui livelli di actina, proteina costitutivamente prodotta; mentre i livelli della forma fosforilata di GSK-3 $\beta$  sono stati normalizzati sui livelli della forma totale di GSK-3 $\beta$ .

In seguito il filtro è stato lavato con tre lavaggi da 10 minuti in TBS-Tween ed incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi e specifico per ciascun anticorpo primario, (anti-rabbit 1:5000 in latte al 5% sciolto in TBS-Tween, Jackson ImmunoResearch e anti-goat 1:5000 in latte al 5% sciolto in TBS-Tween, Rockland). Il filtro è stato lavato con tre lavaggi da 10 minuti in TBS-Tween. La presenza del segnale è stata evidenziata mediante l'utilizzo di reagenti e di lastre specifiche impiegando il sistema di chemiluminescenza intensificata per rilevare l'attività perossidasi, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

L'analisi densitometrica delle bande elettroforetiche è stata effettuata tramite sistema di analisi dell'immagine comunemente utilizzato (NIH image J).

## **9. Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata eseguita con un pacchetto statistico GraphPad Prism5 (GraphPad Software San Diego, CA, USA). Tutti i dati sono rappresentati come media  $\pm$  SEM e gli esperimenti sono stati replicati almeno tre volte. Le differenze tra gruppi per dati non

parametrici sono state valutate mediante il test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Dunn. Per tutti i test è stato considerato come limite di significatività  $p < 0,05$ .

## 10. Farmaci

Ghrelin, Des-Acyl-Ghrelin (DAG) and EP1572 (Aib-DTrp-DgTRP-CHO) sono stati sintetizzati mediante sintesi in fase solida e purificati per almeno il 98% mediante HPLC da Neosystem (Strasburgo, Francia). D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 fornita da Bachem AG (Budendorf, Svizzera). Le sostanze sono state risospese in D-MEM senza siero.

Luperox® TBH70X, soluzione di tert-butyl-hydroperoxide 70 wt. % in acqua (*t*-BHP), Trolox e Ly294002 sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Italia). Il Trolox e Ly294002 sono stati dissolti rispettivamente in etanolo (70%) e dimetil solfossido (100%) e successivamente nel medium di coltura in modo che le concentrazioni finali di etanolo e dimetil solfossido fossero inferiori allo 0.5%.

## 11. Procedimenti Sperimentali

Nella prima serie di esperimenti abbiamo messo a punto il modello di stress ossidativo esaminando gli effetti di concentrazioni crescenti di *t*-BHP (125, 250, 500  $\mu$ M) a diversi tempi di incubazione (1, 3, 6 ore) sulla vitalità cellulare, misurata tramite il test MTT. Come controllo sono state utilizzate cellule incubate solo con D-MEM.

Abbiamo successivamente esaminato gli effetti del trattamento con concentrazioni crescenti di ghrelin ( $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  M, 2 ore) sul danno indotto da *t*-BHP (250  $\mu$ M, 3 ore) valutata mediante il test di vitalità cellulare con MTT.

Nella terza serie di esperimenti è stata valutata l'attività anti-apoptotica di ghrelin sugli osteoblasti mediante microscopio a fluorescenza mediante la colorazione della cromatina con Hoechst 33252. A tale scopo le cellule, MC3T3-E1 sono state incubate con ghrelin  $10^{-9}$  M per 2 ore e successivamente trattate con *t*-BHP (250  $\mu$ M, 3 ore).

Sono stati studiati anche gli effetti di ghrelin sulle alterazioni morfologiche e i cambiamenti del citoscheletro indotte dal *t*-BHP (250  $\mu$ M, 3 ore) mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza previa colorazione dei filamenti di  $\beta$ -actina tramite falloidina coniugata con FITC.

Per caratterizzare il tipo di recettore coinvolto nell'azione citoprotettiva esercitata da ghrelin sul danno indotto da *t*-BHP sulle MC3T3-E1, sono state allestite tre serie di esperimenti di vitalità cellulare utilizzando rispettivamente l'agonista selettivo del recettore GHSR-1a, EP1572, l'antagonista del recettore GHSR-1a, D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 e des-acil-ghrelin (DAG), che non lega il GHSR-1a. La caratterizzazione recettoriale è stata valutata

utilizzando il metodo dell'MTT. Nella prima serie di esperimenti le MC3T3-E1 sono state incubate con concentrazioni crescenti ( $10^{-11}$  -  $10^{-7}$  M) di EP1572, 2 ore prima dell'aggiunta del *t*-BHP (250 $\mu$ M, 3 ore). Nella seconda serie di esperimenti abbiamo voluto se il pre-trattamento (30 minuti) con D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 ( $10^{-7}$  M) fosse in grado di rimuovere l'effetto citoprotettivo di ghrelina. Nella terza serie gli osteoblasti sono stati trattati (2 ore prima) con dosi crescenti ( $10^{-11}$  -  $10^{-7}$  M) di DAG e successivamente esposte a *t*-BHP.

E' stato approfondito ulteriormente l'effetto di DAG ( $10^{-9}$ M, 2 ore) sul danno indotto da *t*-BHP valutando l'apoptosi con Hoechst staining, la morfologia e il citoscheletro con falloidina coniugata con FITC.

Successivamente abbiamo valutato se ghrelina ( $10^{-9}$  M, 2 ore) fosse in grado di contrastare anche gli effetti negativi dello stress ossidativo sugli osteoblasti differenziati (MC3T3-E1) prendendo in considerazione due markers specifici del differenziamento osteoblastico la fosfatasi alcalina e il collagene. L'attività della fosfatasi alcalina è stata valutato dopo 24 ore dal danno ossidativo mentre il contenuto di collagene è stato valutato dopo 48 ore dall'esposizione al *t*-BHP.

Sempre nelle cellule MC3T3-E1 abbiamo poi studiato gli effetti del pre-trattamento (30 minuti prima di ghrelina) con l'inibitore selettivo di PI3K, Ly294002 (10 $\mu$ M), sull'apoptosi indotta da *t*-BHP (250  $\mu$ M, 3 ore) mediante Hoechst 33252 staining.

Utilizzando le cellule rOB, in una nuova serie di esperimenti, abbiamo valutato gli effetti del trattamento con ghrelina sui livelli di GSK-3 $\beta$  fosforilato. I livelli di GSK-3 $\beta$  sono stati misurati tramite Western Blot in pre-osteoblasti incubati con D-MEM e o ghrelina  $10^{-9}$  M dopo 15, 30, 60, 90 minuti. I livelli di GSK-3 $\beta$  vengono normalizzati sui livelli di GSK-3 $\beta$  totale. Successivamente abbiamo studiato se l'aumento dei livelli di GSK-3 $\beta$  osservati con ghrelina determinassero un aumento dei livelli di  $\beta$ -catenina. A tale scopo sono stati valutati mediante Western Blot i livelli di  $\beta$ -catenina, dopo incubazione con ghrelina per 15, 30, 60, 90, 120 minuti. I livelli di  $\beta$ -catenina di ciascun campione sono stati normalizzati con quelli dell'actina misurati sullo stesso gel. Infine siamo andati ad indagare se il pre-trattamento (30 minuti) con Ly294002 (10 $\mu$ M) fosse in grado di rimuovere l'effetto stimolatorio di ghrelina sui livelli di GSK-3 $\beta$  fosforilato e  $\beta$ -catenina.

# **RISULTATI**

La **Figura 1** mostra l'effetto tempo e dose dipendente del *t*-BHP sulla vitalità cellulare delle MC3T3-E1. Dalla figura emerge come il trattamento di 3 ore con *t*-BHP alle concentrazioni di 250 e 500  $\mu$ M riduce in maniera statisticamente significativa la vitalità cellulare rispettivamente al  $59,47 \pm 2,42 \%$  e  $40,53 \pm 1,80 \%$  rispetto al gruppo controllo. L'effetto citotossico esercitato dal *t*-BHP si mantiene statisticamente significativo anche dopo incubazioni più lunghe, 6 ore.

Poiché in nostri studi precedenti avevamo osservato che la ghrelina esercita un'azione stimolante sulla vitalità cellulare a tempi superiori alle 6 ore, abbiamo trattato le cellule MC3T3-E1 con concentrazioni crescenti del peptide 2 ore prima dell'esposizione al *t*-BHP. La **figura 2a** mostra come ghrelina eserciti un effetto protettivo massimo alle concentrazioni di  $10^{-9}$  M e  $10^{-11}$  M contro la citotossicità indotta dal *t*-BHP. Concentrazioni maggiori del peptide non hanno aumentato l'effetto protettivo, ma, al contrario, sono risultate meno efficaci. Sulla base di questi risultati abbiamo scelto la concentrazione di  $10^{-9}$  M per i successivi esperimenti. L'efficacia delle nostre condizioni sperimentali sono state convalidate con l'uso del Trolox, un composto antiossidante noto. Abbiamo scoperto che una concentrazione di  $10^{-5}$  M di Trolox esercita un'azione protettiva contro la citotossicità indotta dal *t*-BHP paragonabile a quella di ghrelina alla concentrazione di  $10^{-11}$  M come evidenziato nella **figura 2b**. Si è studiato l'effetto della ghrelina sull'apoptosi indotta dal *t*-BHP. Come mostrato nella **figura 3b**, il trattamento con *t*-BHP (250  $\mu$ M per 3 ore) ha causato un significativo aumento delle cellule apoptotiche ( $28,0 \pm 3,3\%$ ) rispetto al gruppo controllo ( $5,9 \pm 1,0\%$  di cellule apoptotiche), mentre il trattamento con ghrelina ( $10^{-9}$  M) 2 ore prima del *t*-BHP ha significativamente ridotto la percentuale di cellule apoptotiche ( $10,7 \pm 1,3\%$ ). La **figura 3a** mostra l'azione protettiva di ghrelina contro i cambiamenti nucleari tipici dell'apoptosi cellulare valutata mediante Hoechst staining. Come si osserva, *t*-BHP aumenta la condensazione della cromatina e induce una maggior

luminescenza, due indici di aumentata attività apoptotica indotta dal *t*-BHP, mentre il pretrattamento con ghrelina previene questi effetti.

La **figura 4a** mostra gli effetti di *t*-BHP sulla morfologia delle cellule MC3T3-E1. Le cellule del gruppo controllo costituiscono un monostrato di cellule che presentano un nucleo rotondo e molti processi che collegano ogni cellula con le cellule vicine. Il trattamento con *t*-BHP determina perdita di contatto tra le cellule e condensazione del citoplasma. Inoltre, le cellule morte si staccano dal monostrato. Il trattamento con ghrelina ( $10^{-9}$  M) 2 ore prima del *t*-BHP diminuisce i cambiamenti morfologici indotti dal danno ossidativo ripristinando una situazione simile a quella del gruppo controllo.

Per verificare la possibilità che i cambiamenti morfologici indotti dal *t*-BHP (250  $\mu$ M) siano dovuti ad un rimodellamento del citoscheletro delle cellule MC3T3-E1, è stata valutata la capacità del *t*-BHP di alterare il citoscheletro dopo tre ore dal trattamento. I filamenti di  $\beta$ -actina sono stati visualizzati mediante legame con falloidina coniugata con FITC. In **figura 4b** sono riportate le immagini relative ai risultati ottenuti. Dalle immagini si evince come i microfilamenti delle cellule controllo siano disposti in direzione del loro asse principale e come l'esposizione al *t*-BHP induce una progressiva riorganizzazione dei microfilamenti che risultano addensati intorno al nucleo e non più distesi e ben distribuiti come nel gruppo controllo. Il trattamento con ghrelina ( $10^{-9}$  M) 2 ore prima dell'agente citotossico contrasta l'effetto di rimodellamento sul citoscheletro indotto da *t*-BHP, mantenendo le cellule in una condizione simile al gruppo controllo.

Per esaminare se l'effetto protettivo esercitato dalla ghrelina contro la citotossicità indotta dal *t*-BHP dipenda dall'interazione con GHS-R1a, le cellule MC3T3-E1 sono state trattate con l'agonista specifico del GHS-R1a, EP1572 a concentrazioni crescenti ( $10^{-7}$  -  $10^{-11}$  M).

La **figura 5a** mostra come il trattamento con EP1572 2 ore prima del *t*-BHP (250  $\mu$ M per 3 ore) non ha modificato in alcun modo l'effetto citotossico esercitato dal *t*-BHP sulla vitalità cellulare.

Da quanto osservato, si evince che l'effetto protettivo di ghrelina non dipende da una specifica interazione con il GHS-R1a. Questa osservazione è confermata nella **figura 5b**, che illustra come il pre-trattamento con l'antagonista selettivo del GHS-R1a, D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 ( $10^{-7}$  M), applicato 30 minuti prima di ghrelina ( $10^{-9}$  M) non rimuove gli effetti protettivi esercitati da ghrelina contro il danno ossidativo indotto dal *t*-BHP. La possibilità che l'effetto citoprotettivo della ghrelina sia legato ad un'interazione con un recettore diverso dal GHS-R1a è stata confermata dai risultati ottenuti con DAG, che non lega il GHS-R1a. La **figura 6** mostra come il trattamento con concentrazioni crescenti ( $10^{-5}$  -  $10^{-11}$  M) di DAG sia in grado di aumentare in modo statisticamente significativo la vitalità cellulare rispetto le cellule trattate solo con *t*-BHP. In base a questi risultati è stata scelta la concentrazione di  $10^{-9}$  M per i successivi esperimenti.

La **figura 7b** mostra come DAG  $10^{-9}$  M sia in grado di ridurre in maniera statisticamente significativa la percentuale di cellule apoptotiche ( $13,1 \pm 1,1\%$ ) rispetto alle cellule trattate con *t*-BHP ( $26,0 \pm 3,0\%$ ), nella **figura 7a** sono rappresentate le alterazioni nucleari delle cellule apoptotiche.

Il trattamento con DAG ( $10^{-9}$  M 2 ore prima del *t*-BHP) diminuisce sia i cambiamenti morfologici (**figura 8a**) sia l'alterazione dei filamenti di  $\beta$ -actina (**figura 8b**) indotto dall'effetto citotossico del *t*-BHP. Nella figura 9 sono mostrati gli effetti di ghrelina nel contrastare il danno ossidativo sugli osteoblasti differenziati. A tale scopo sono stati analizzati due markers specifici della funzionalità osteoblastica, l'attività della fosfatasi alcalina (ALP, **Figura 9a**) misurato nei lisati cellulari e il contenuto di collagene valutato mediante l'utilizzo del colorante Sirius Red (**figura 9b**). Il trattamento con *t*-BHP (250  $\mu$ M, 3 ore) è in grado di ridurre in maniera statisticamente significativa i livelli di ALP ( $73,5 \pm 5,4 \%$ ) e il contenuto di collagene ( $81,9 \pm 1,2 \%$ ) rispetto al gruppo controllo e tale effetto viene contrastato dal trattamento con ghrelina ( $10^{-9}$  M, 2 ore prima del *t*-BHP). Il coinvolgimento del pathway PI3K/Akt nell'azione citoprotettiva di ghrelina ( $10^{-9}$  M) è

stato valutato mediante il pre-trattamento con l'inibitore di PI3K/Akt, Ly294002 (10 $\mu$ M ) sull'apoptosi indotta da *t*-BHP. Dai risultati ottenuti Ly294002, che di per sé non è in grado di indurre apoptosi (3,2  $\pm$  0,72 %), è in grado di rimuovere in maniera statisticamente significativa l'effetto anti-apoptotico di ghrelina (20,75  $\pm$  1,02 %) (**Figura 10b**). La **figura 10a** mostra immagini rappresentative dei vari trattamenti sui cambiamenti nucleari tipici dell'apoptosi valutati mediante Hoechst staining.

Come si osserva nella **Figura 11a,b**, in osteoblasti primari ottenuti da calvarie di ratto, Ghrelina (10<sup>-9</sup> M), favorisce la fosforilazione della glicogeno sintasi chinasi-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) a partire dai 30 minuti in condizioni basali, favorendo così l'accumulo della  $\beta$ -catenina nel citoplasma e la sua successiva traslocazione nel nucleo.

Nella **Figura 12 a, b** si osserva invece che, nelle stesse cellule, l'inibizione del pathway PI3K/Akt con Ly294002 (10 $\mu$ M ) riduce la fosforilazione di GSK-3 $\beta$  indotta da ghrelina e i livelli di  $\beta$ -catenina rispetto ai livelli del gruppo di controllo.

# **FIGURE**

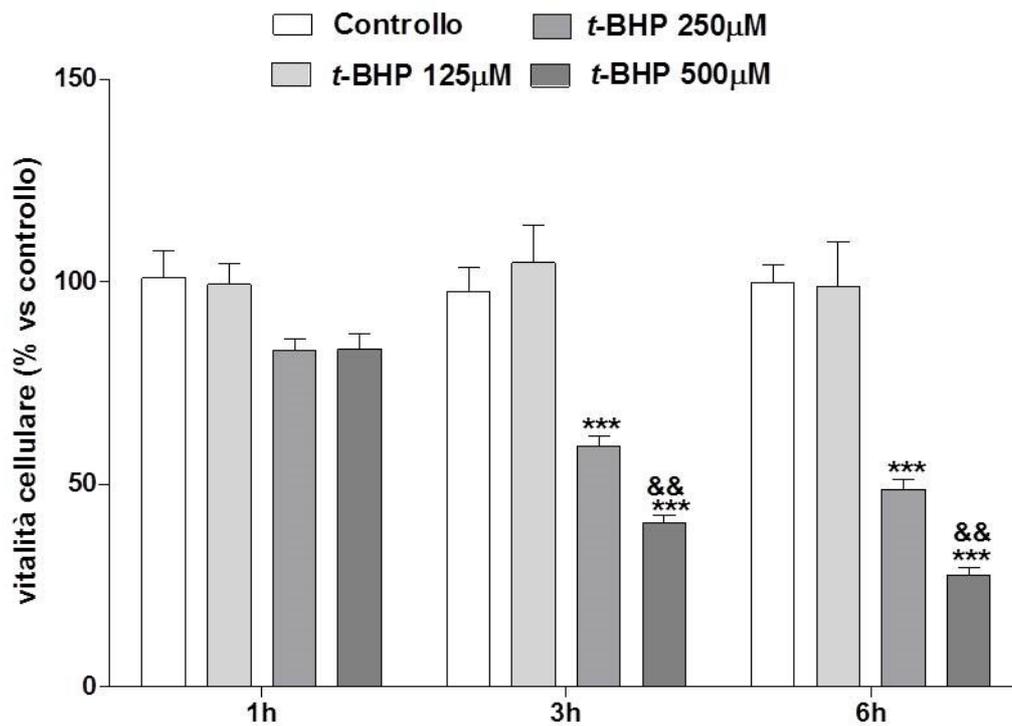


Figura 1: Effetto tempo e dose dipendenti del *t*-BHP sulla vitalità cellulare delle MC3T3-E1.

Le cellule sono state incubate con dosi crescenti di *t*-BHP (125-500 µM) e incubate a diversi tempi (1 – 6 h). I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo e sono espressi come la media  $\pm$  SEM di 4 replicati all'interno di un singolo esperimento che è stato ripetuto per tre volte. \*\*\*  $p < 0.001$  vs controllo; &&  $p < 0.01$  vs *t*-BHP (250 µM).

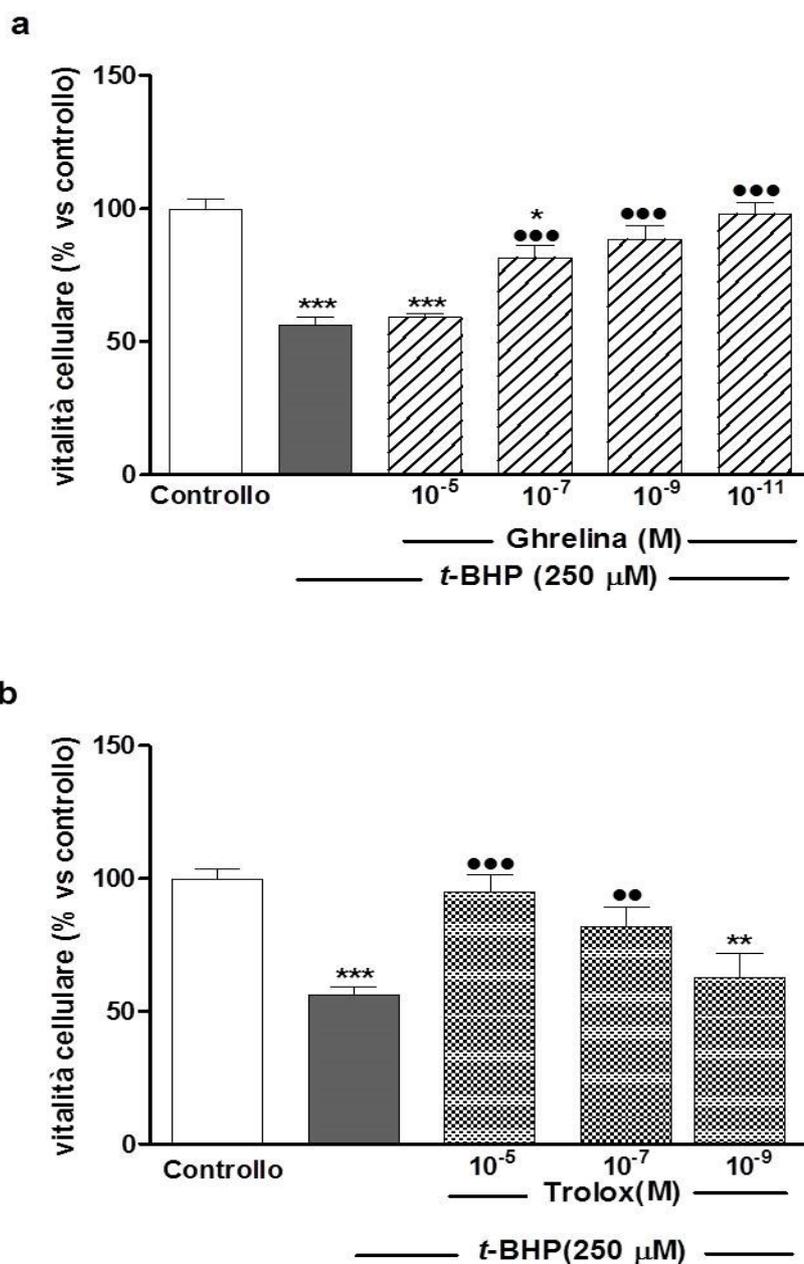


Figura 2: Effetti di Ghrelina (a) e Trolox (b) sulla citotossicità indotta dal *t*-BHP (250 μM) sulle MC3T3-E1.

Le cellule sono pre-incubate con Ghrelina (10<sup>-5</sup> – 10<sup>-11</sup> M) o Trolox (10<sup>-5</sup> – 10<sup>-9</sup> M) 2 h prima del trattamento con *t*-BHP (250 μM, 3 h ). La vitalità cellulare è stata misurata tramite MTT. I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo e sono espressi come la media ± SEM di 4 replicati all'interno di un singolo esperimento che è stato ripetuto per tre volte. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  vs controllo; ●●  $p < 0.01$ ; ●●●  $p < 0.001$  vs *t*-BHP

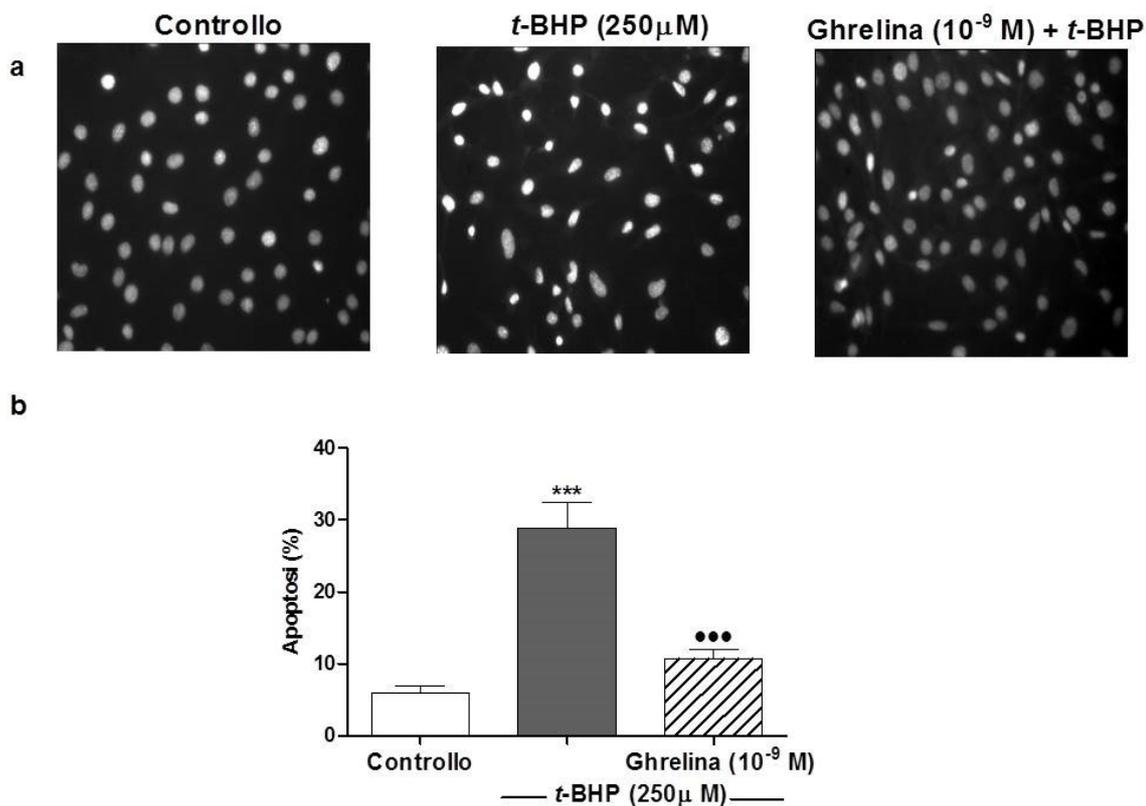


Figura 3: Ghrelin inibisce l'apoptosi indotta dal *t*-BHP (250 μM) nelle MC3T3-E1.

Le cellule sono preincubate con Ghrelin (10<sup>-9</sup> M) 2 h prima del trattamento con *t*-BHP (250 μM, 3 h). L'apoptosi è stata valutata tramite Hoechst 33258. **(a)** Immagini rappresentative dei tre trattamenti dove è possibile vedere la condensazione della cromatina e una maggior luminescenza tipica di una cellula apoptotica. **(b)** Quantificazione dell'apoptosi. I risultati sono espressi come media ± SEM di diversi duplicati di tre esperimenti diversi. \*\*\*  $p < 0.001$  vs controllo; ●●●  $p < 0.001$  vs *t*-BHP

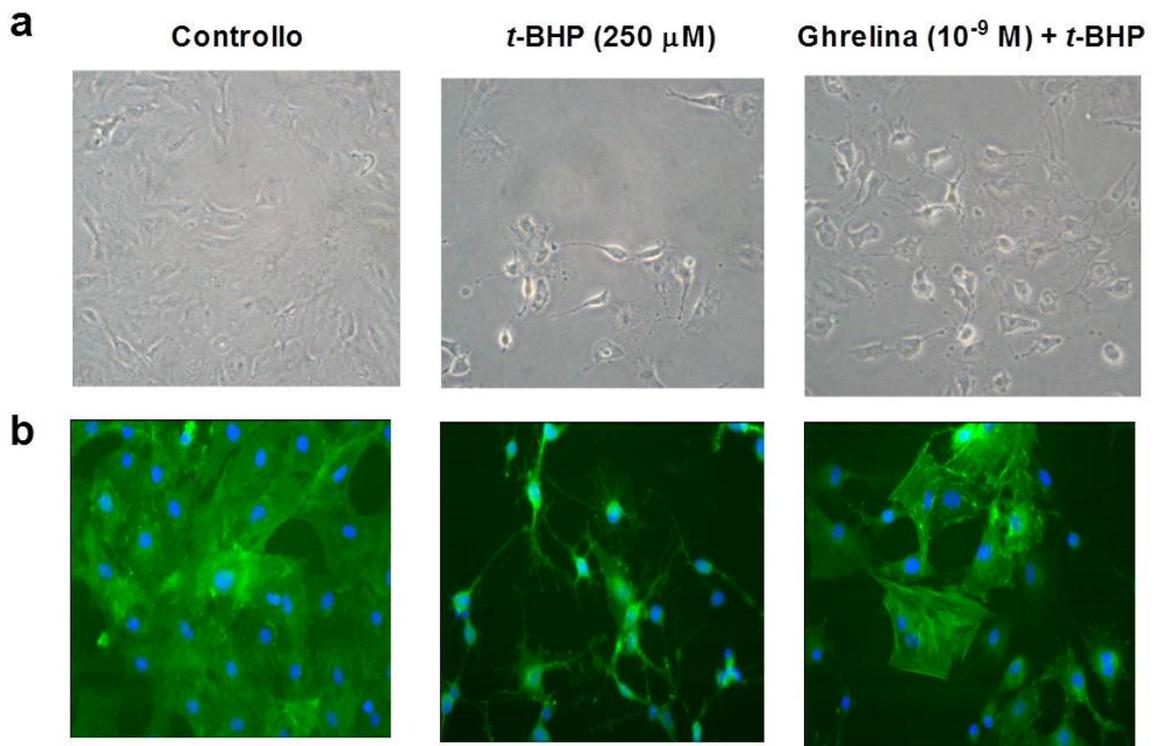


Figura 4. Effetti protettivi di Ghrelin sulla morfologia e sulle alterazioni citoscheletriche indotte dal *t*-BHP.

Le cellule MC3T3-E1 sono state preincubate con Ghrelin (10<sup>-9</sup> M) 2 h prima del trattamento con il *t*-BHP (250  $\mu$ M, 3 h). Sono state quindi fissate e colorate come descritto nella sezione “Materiali e Metodi” con falloidina-FITC (verde) per evidenziare i filamenti di  $\beta$ -actina e con DAPI (blu) per la colorazione dei nuclei. Immagini rappresentative (**a**) dei cambiamenti morfologici valutati con il microscopio in contrasto di fase; (**b**) delle alterazioni citoscheletriche valutate con microscopio a fluorescenza (Axioplan, ingrandimento 20x).

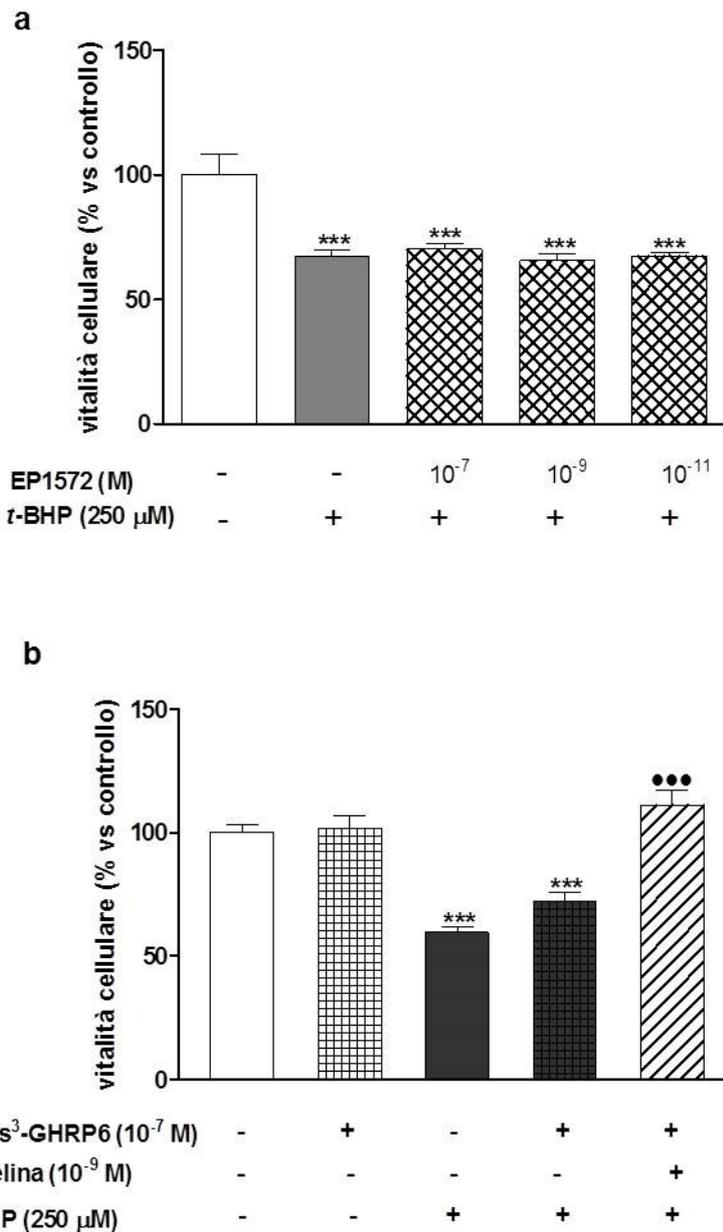


Figura 5: Mancanza del coinvolgimento del GHS-R1a nell'effetto protettivo di ghrelina contro la citotossicità indotta dal t-BHP nelle MC3T3-E1.

L'agonista del GHS-R1a, EP1572 ( $10^{-5}$  –  $10^{-11}$  M) è stato somministrato 2h prima del trattamento con t-BHP (250 μM, 3 h). **(b)** MC3T3-E1 sono state pretrattate con l'antagonista specifico del GHS-R1a, D-Lys<sup>3</sup>-GHRP6 ( $10^{-7}$  M), 30 minuti prima di Ghrelin ( $10^{-9}$  M) successivamente incubate per 2h prima del t-BHP (250 μM, 3 h). La vitalità cellulare è stata valutata mediante MTT. I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo e sono espressi come la media  $\pm$  SEM di 4 replicati all'interno di un singolo esperimento che è stato ripetuto per tre volte. \*\*\*  $p < 0.001$  vs controllo;

••• $p < 0.001$  vs t-BHP.

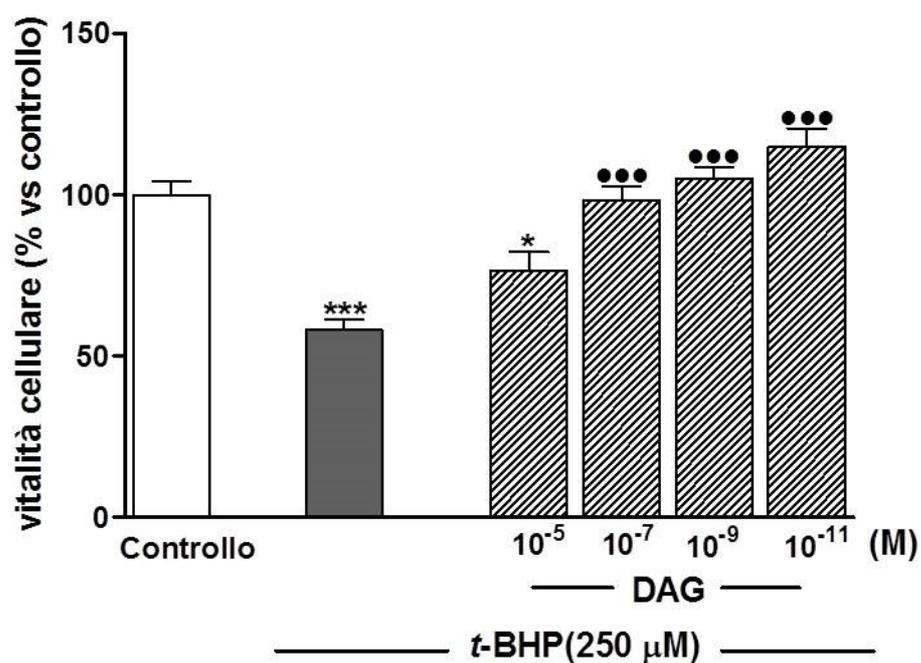


Figura 6: DAG protegge le MC3T3-E1 dalla citotossicità indotta dal *t*-BHP.

Le cellule sono state trattate con DAG ( $10^{-5} - 10^{-11}$  M) 2h prima del trattamento con *t*-BHP (250  $\mu$ M, 3 h). La vitalità cellulare è stata valutata mediante MTT. I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo e sono espressi come la media  $\pm$  SEM di 4 replicati all'interno di un singolo esperimento che è stato ripetuto per tre volte. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs controllo; ••• $p < 0.001$  vs *t*-BHP.

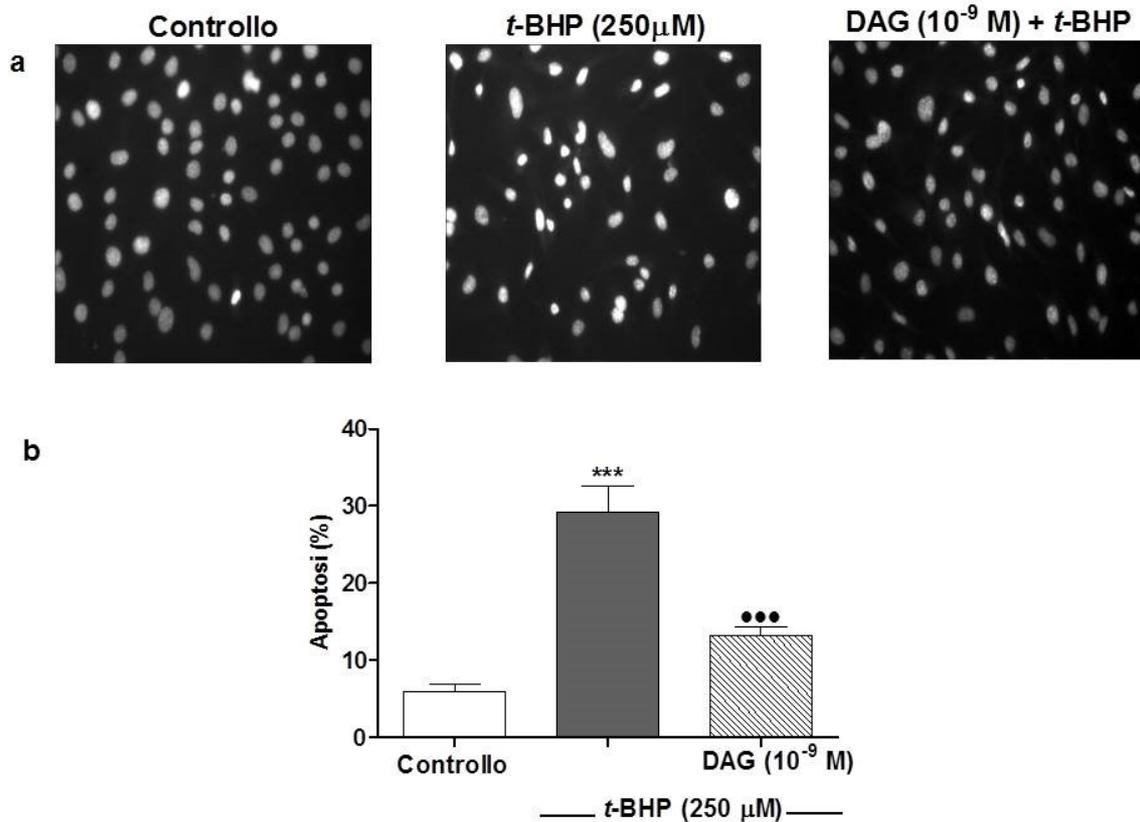


Figura 7: DAG inibisce l'apoptosi indotta dal *t*-BHP (250 μM) nelle MC3T3-E1.

Le cellule sono trattate con DAG (10<sup>-9</sup> M) 2 h prima del trattamento con *t*-BHP (250 μM, 3h). L'apoptosi è stata valutata tramite Hoechst 33258 staining. **(a)** Immagini rappresentative dei tre trattamenti dove è possibile vedere la condensazione della cromatina e una maggior luminescenza tipica di una cellula apoptotica. **(b)** Quantificazione dell'apoptosi. I risultati sono espressi come media ± SEM di diversi duplicati di tre esperimenti diversi. \*\*\*  $p < 0.001$  vs controllo; ●●●  $p < 0.001$  vs *t*-BHP

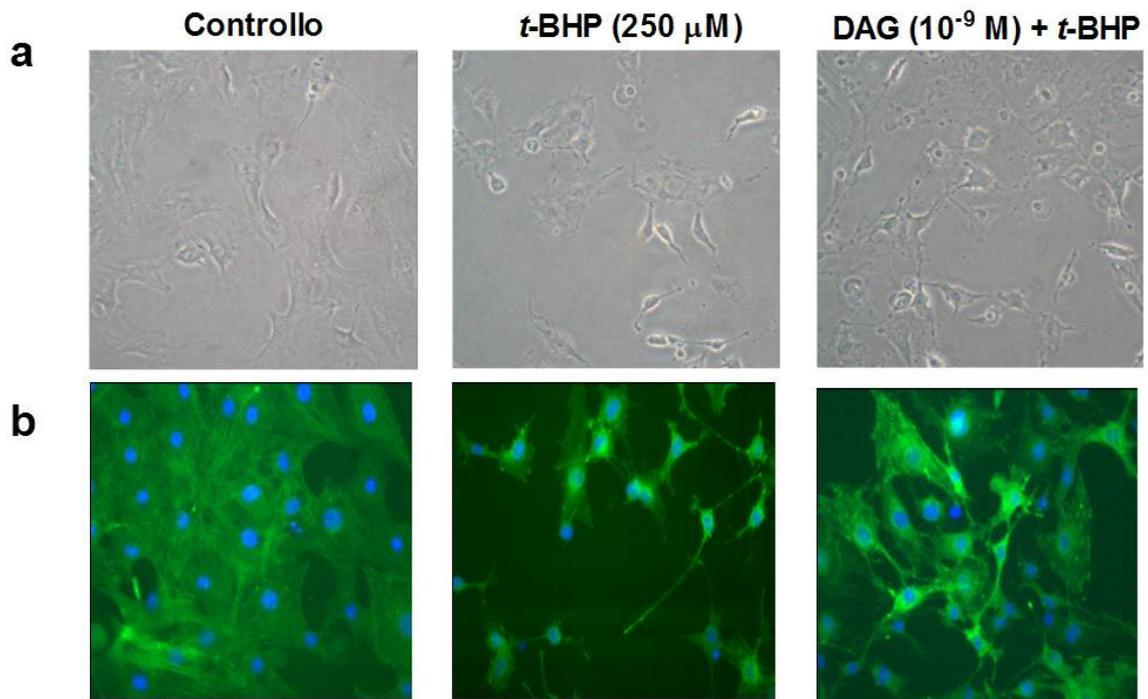


Figura 8: Effetti protettivi di DAG sulla morfologia e sulle alterazioni del citoscheletro indotte dal *t*-BHP.

Le cellule MC3T3-E1 sono state trattate con DAG ( $10^{-9}$  M) 2 h prima del trattamento con il *t*-BHP (250  $\mu$ M, 3 h). Immagini rappresentative (**a**) dei cambiamenti morfologici valutati con il microscopio in contrasto di fase; (**b**) delle alterazioni citoscheletriche dei filamenti di actina. Le immagini sono state acquisite con un microscopio a fluorescenza (Axioplan, ingrandimento 20x).

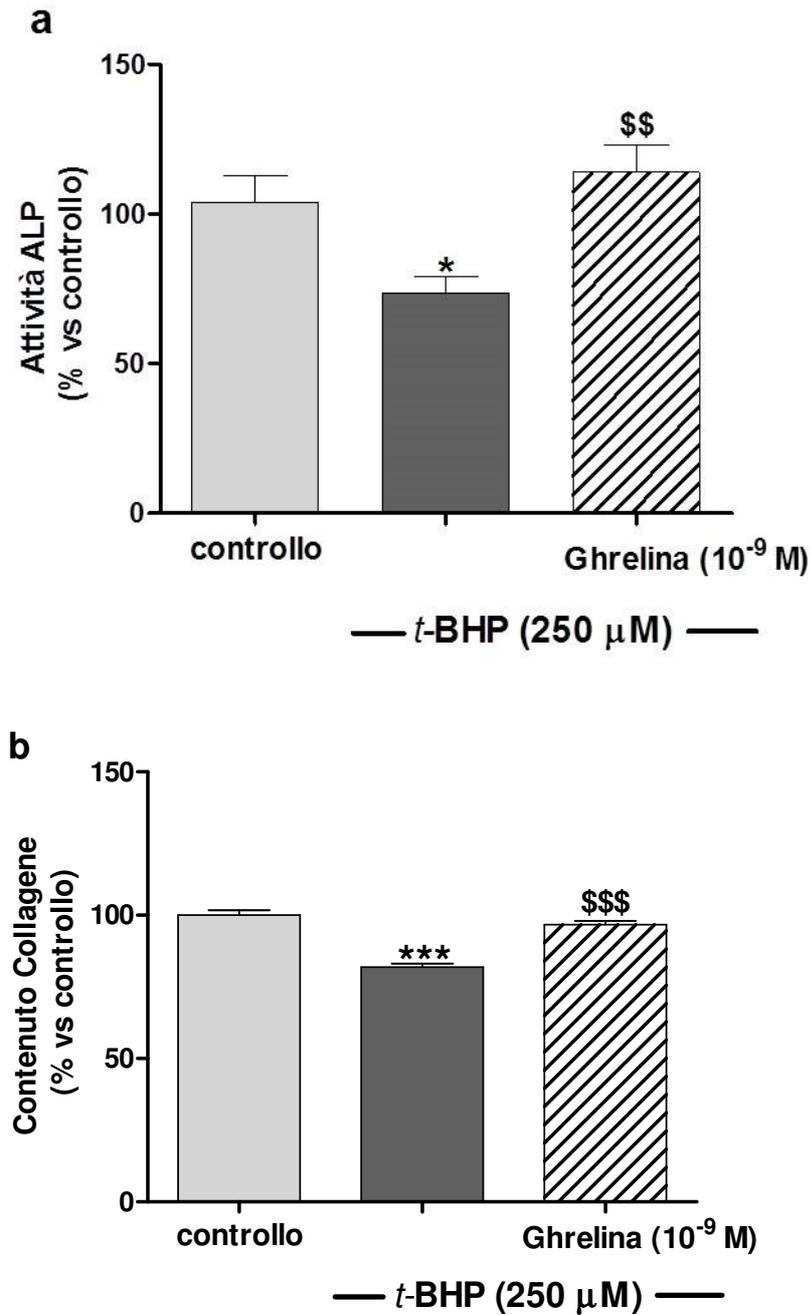


Figura 9: Effetti della Ghrelin sulla funzionalità delle cellule MC3T3-E1 in presenza di *t*-BHP.

(a) Effetto del trattamento con ghrelin (2h prima del danno ossidativo) sull'attività della fosfatasi alcalina; (b) Effetto del trattamento con ghrelin (2h prima del danno ossidativo) sul contenuto di collagene, delle MC3T3-E1 differenziate. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM di diversi duplicati di tre esperimenti diversi. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs controllo; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs *t*-BHP

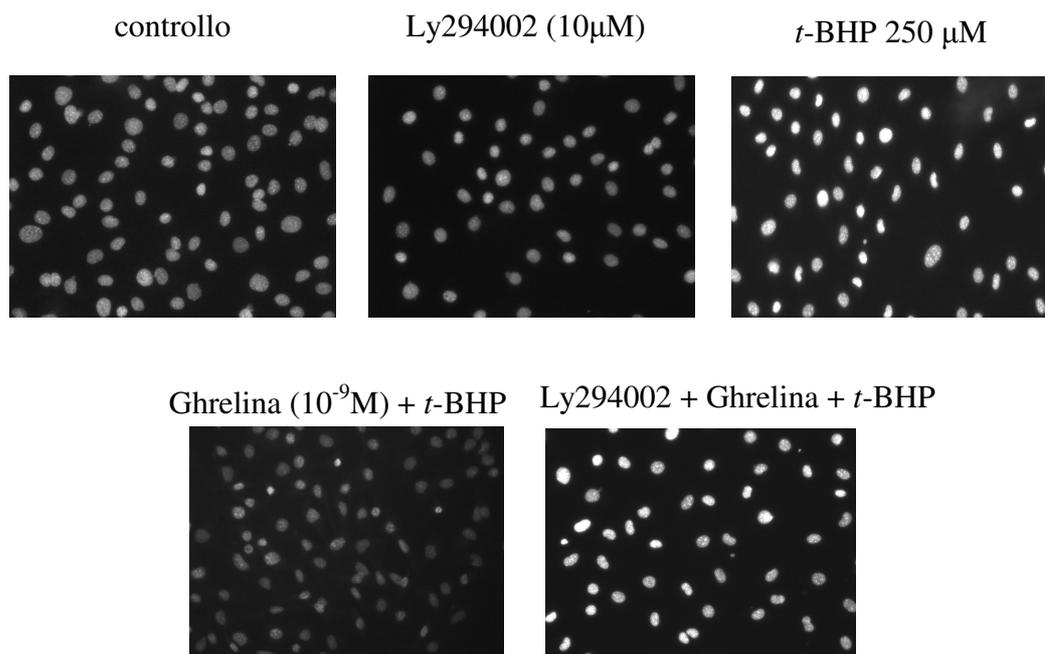
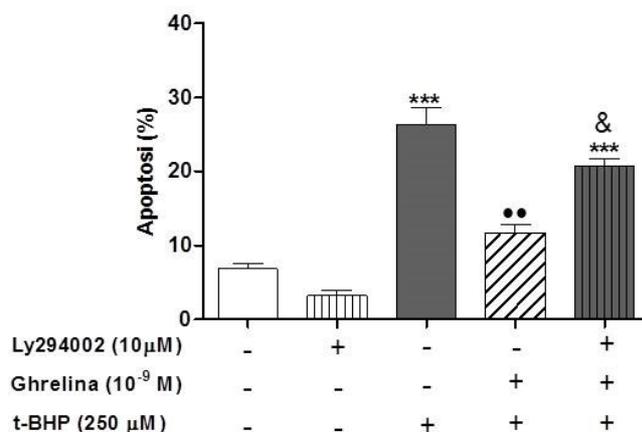
**a****b**

Figura 10: Coinvolgimento di PI3K/Akt negli effetti protettivi di ghrelin sulla apoptosi indotta da *t*-BHP nelle MC3T3-E1. Le cellule sono preincubate con Ly294002 (10 µM) 30 min prima del trattamento con ghrelin (10<sup>-9</sup> M, 2h) e successivamente trattate con *t*-BHP (250 µM, 3h). L'apoptosi è stata valutata tramite Hoechst 33258. (a) Immagini rappresentative dei trattamenti dove è possibile vedere la condensazione e la frammentazione dei nuclei tipiche di una cellula apoptotica. (b) Quantificazione dell'apoptosi. I risultati sono espressi come media ± SEM di diversi duplicati di tre esperimenti diversi. \*\*\*  $p < 0.001$  vs controllo; \*\*  $p < 0.01$  vs *t*-BHP; &  $p < 0.05$  vs Ghrelin + *t*-BHP.

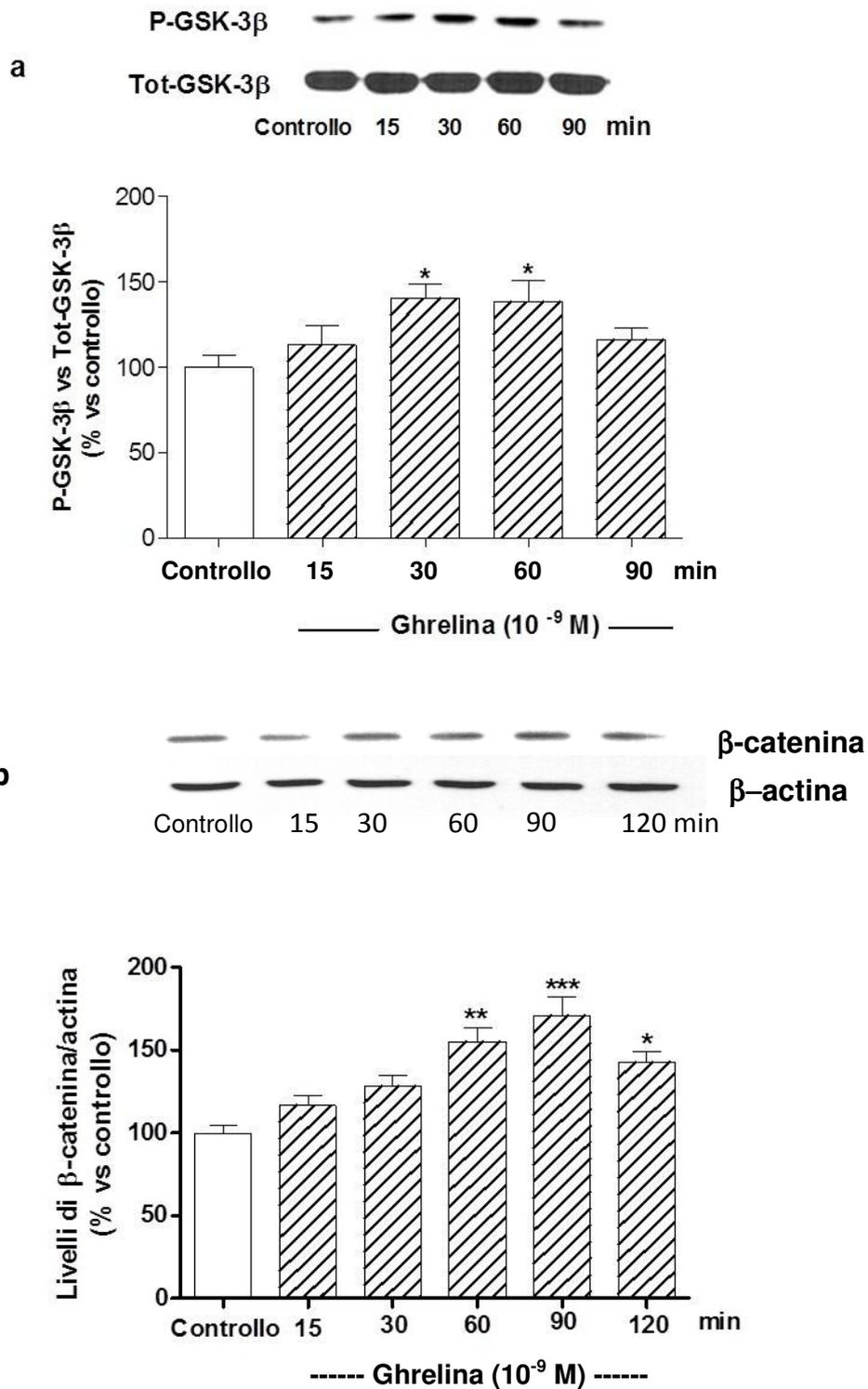


Figura 11: Effetti di Ghrelina ( $10^{-9}$  M) sui livelli di P-GSK-3 $\beta$  (a) e sui livelli totali di  $\beta$ -catenina (b) misurati in osteoblasti primari di ratto (rOB) mediante Western blot a vari tempi di incubazione. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM di tre esperimenti diversi. Sono riportate le immagini di due gel rappresentativi sopra l'istogramma.\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs controllo.

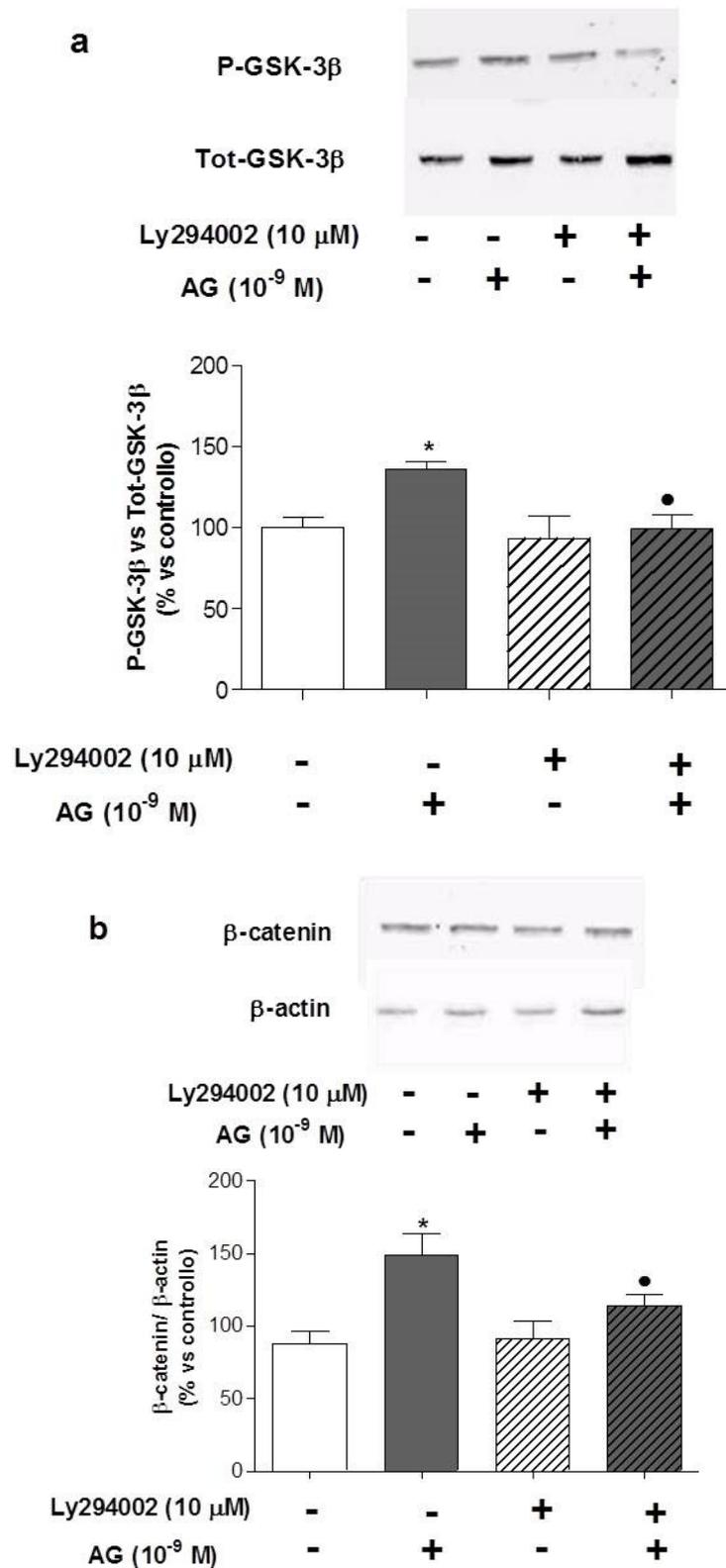


Figura 12: Effetti del pretrattamento con l'inibitore PI3K/Akt, Ly294002 sull'attività stimolatoria di Ghrelina (AG, 10<sup>-9</sup> M) sui livelli di P-GSK-3 $\beta$  (a) e  $\beta$ -catenina (b) misurati in osteoblasti primari di ratto (rOB) mediante Western Blot nei tempi in cui si aveva il massimo effetto stimolatorio. \*  $p < 0.05$  vs controllo; <sup>•</sup> $p < 0.05$  vs *t*-BHP.

## **DISCUSSIONE**

Studi sia in vivo che in vitro hanno dimostrato che la riduzione degli antiossidanti e l'aumento dello stress ossidativo sono coinvolti nella patogenesi e nell'eziologia di molte malattie, tra cui l'osteoporosi causata dall'invecchiamento e dalla carenza di estrogeni (Maggio et al., 2003).

Il riassorbimento osseo viene accelerato, determinando una riduzione della massa ossea, dovuta ad un aumento dell'apoptosi di osteoblasti e osteociti (Baek et al., 2010; Zhang et al., 2011; Basu et al., 2001) e ad una maggior differenziazione degli osteoclasti. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), sono molecole chimicamente attive (Betteridge, 2000), coinvolte in una serie di processi biologici, se prodotto in quantità eccessive sono note per causare danno ossidativo potenzialmente tossico, mutagenico o cancerogeno. Nel presente studio, abbiamo utilizzato il tert-butyl idroperossido (*t*-BHP) come induttore diretto dello stress ossidativo su una linea stabilizzata di pre-osteoblasti murini, MC3T3-E1. Il *t*-BHP è in grado di attraversare le membrane biologiche e andare ad interagire con un'ampia gamma di siti intracellulari.

In letteratura è riportato che il *t*-BHP riduce la vitalità cellulare e aumenta l'apoptosi in diversi tipi di cellule, quali epatociti (Chen et al., 2010), cellule endoteliali (Li et al., 2011), cellule epiteliali del pigmento retinico (Zou et al., 2012), cellule neuronali (Pavlica and Gebhardt, 2010).

In linea con queste osservazioni i risultati da noi ottenuti a seguito dell'esposizione delle MC3T3-E1 al *t*-BHP ha determinato una riduzione della vitalità cellulare, un incremento dell'apoptosi e un'alterazione morfologica. Il trattamento con ghrelina ha revertito questi effetti. Ghrelina, è un peptide bioattivo, scoperto nel 1999, che possiede molteplici effetti fisiologici. L'attività di ghrelina nella regolazione del metabolismo osseo è stata riportata ampiamente in letteratura (van der Velde et al., 2008; Nikolopoulos et al., 2010; Delhanty et al., 2014). La somministrazione periferica del peptide determina un aumento della massa ossea (Fukushima et al., 2005) principalmente dovuta ad un'attività di stimolo sulla

proliferazione e il differenziamento degli osteoblasti (Maccarinelli et al., 2005; Kim et al., 2005), inoltre è in grado di diminuire il danno ossidativo in vari tessuti sia periferici (El Eter et al. 2007; Kawczynska-Drozd et al 2006; Iseri et al. 2008; Zhang et al. 2011) che nel cervello (Obay et al. 2008 ). Sulla base di queste osservazioni, abbiamo quindi voluto valutare se il trattamento con ghrelina fosse in grado di ridurre o addirittura impedire gli effetti negativi causati dal *t*-BHP sulle MC3T3-E1. È interessante notare che l'effetto protettivo esercitato da ghrelina sulla vitalità cellulare in condizioni di stress ossidativo non è dose-dipendente. L'effetto massimo del peptide è stato osservato a basse concentrazioni. E' stato riportato da studi precedenti che la ghrelina è in grado di inibire l'apoptosi in diverse cellule, come cardiomiociti, cellule endoteliali, adipociti, cellule della zona glomerulare surrenale, cellule  $\beta$ -pancreatiche, cellule epiteliali intestinali e neuroni ipotalamici (Chung et al., 2008; Granata et al., 2007; Kui et al., 2009; Mazzocchi et al., 2004; Rodriguez et al., 2012). L'apoptosi è un processo necessario per lo sviluppo, rappresenta una caratteristica tipica di tutti i tessuti che si rinnovano, compreso l'osso, si definisce come il processo di morte cellulare associata all'attivazione delle caspasi (Jilka et al., 2007). L'apoptosi degli osteoblasti svolge un ruolo critico durante lo sviluppo embrionale degli arti, nella maturazione scheletrica, nei processi di rimodellamento osseo durante la guarigione di una frattura e nella rigenerazione ossea, si tratta di un processo controllato attivamente che viene innescato da segnali pro-apoptotici (Hock et al., 2001). Le bone morphogenetic protein (BMPs), le proteine Wnts, le citochine, gli estrogeni, i fattori di crescita, i glucocorticoidi e lo stress ossidativo associato con l'invecchiamento contribuiscono alla regolazione della apoptosi degli osteoblasti. Nel 2005, Kim e collaboratori hanno riportato l'effetto protettivo di ghrelina sull'apoptosi indotta dall'esposizione con TNF- $\alpha$  delle cellule MC3T3-E1 (Kim et al., 2005). Nei nostri esperimenti abbiamo utilizzato Hoechst 33258 staining, un metodo classico per valutare l'apoptosi cellulare attraverso la visualizzazione dei cambiamenti morfologici della

cromatina nucleare. I nostri dati dimostrano che ghrelina alla concentrazione di  $10^{-9}$  M è in grado di inibire l'apoptosi e le alterazioni a carico dei microfilamenti indotti dal *t*-BHP nelle MC3T3-E1.

E' noto dalla letteratura che ghrelina esercita le sue attività biologiche mediante l'interazione con recettori specifici. A seguito dello splicing alternativo del gene del recettore sono state identificate due isoforme denominate GHS-R1a e GHS-R1b. La presenza dell'mRNA per il recettore GHS-R1a sugli osteoblasti (Maccarinelli et al., 2005) ci ha indotto ad esaminare se l'effetto protettivo esercitato da ghrelina sulla citotossicità indotta dal *t*-BHP potesse dipendere da un'interazione specifica con il GHS-R1a. Il trattamento con l'agonista specifico del GHS-R1a, EP1572 non previene la riduzione della vitalità cellulare indotta dal *t*-BHP. Inoltre, in presenza dell'antagonista specifico del GHS-R1a, D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6, ghrelina è ancora in grado di esercitare il suo effetto protettivo sul danno ossidativo. Il mancato coinvolgimento del GHS-R1a nel mediare gli effetti protettivi di ghrelina è in linea con i risultati ottenuti con DAG, che non lega il GHS-R1a (Muccioli et al., 2007). E' improbabile che DAG possa esercitare il suo effetto protettivo sulle cellule MC3T3-E1 attraverso l'interazione con un sito di legame specifico non riconosciuto dalla ghrelina, come precedentemente riportato nei cardiomiociti (Lear et al., 2010).

I nostri dati, infatti, hanno dimostrato che sia la ghrelina che DAG svolgono un'azione ugualmente protettiva contro il danno ossidativo indotta dal *t*-BHP sulla vitalità cellulare, sull'apoptosi e sui cambiamenti morfologici, suggerendo l'esistenza di un recettore sconosciuto diverso da GHS-R1a, che DAG potrebbe riconoscere. Prove dell'esistenza di un recettore alternativo di ghrelina sono state riportate in precedenza. Ghrelina e DAG condividono infatti alcuni effetti nelle cellule che non esprimono GHS-R1a e in modelli animali knockout per il GHS-R (Baldanzi et al., 2002; Delhanty et al., 2006; Granata et al., 2007). Inoltre, DAG condivide con ghrelina un'azione inibitoria sul dolore infiammatorio (Sibilia et al., 2012) e un effetto stimolante sull'adipogenesi (Thompson et al. 2004). Costa

et al., (2011) hanno dimostrato che la ghrelina promuove la proliferazione degli osteoblasti di ratto attraverso un percorso indipendente dal GHS-R1a, confermando i dati precedentemente riportato da Delhanty et al., (2006) in osteoblasti umani.

Gli osteoblasti rappresentano le cellule responsabile della formazione delle ossa, perchè sintetizzano e regolano la deposizione e la mineralizzazione della matrice extracellulare. Le cellule MC3T3-E1, sono in grado di sintetizzare collagene di tipo 1, aumentare i livelli di ALP e produrre noduli di mineralizzazione a seguito di uno stimolo differenziante. Una ridotta differenziazione degli osteoblasti rappresenta un fattore importante nella patogenesi dell'osteoporosi. I risultati da noi ottenuti indicano che in presenza di *t*-BHP si osserva una riduzione del contenuto di collagene e dell'attività del ALP delle MC3T3-E1 differenziate rispetto al gruppo controllo, mentre la pre-incubazione con ghrelina 2 ore prima dello stress ossidativo è in grado di contrastare gli effetti negativi del *t*-BHP sulla funzionalità delle MC3T3-E1. I nostri dati sono in linea con i risultati ottenuti da Choi et al., (2009) e da Xu et al., (2011); dove il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha determinato un inibizione del contenuto di collagene, dell'attività del ALP e del contenuto di calcio rispetto al gruppo controllo.

I meccanismi attraverso i quali ghrelina è in grado di inibire l'apoptosi indotta dal *t*-BHP sulle MC3T3-E1 non sono ancora stati chiariti. A tale scopo abbiamo voluto indagare quale potesse essere la via di segnale attivata dal peptide in condizione di stress ossidativo. La nostra attenzione si è focalizzata sul pathway PI3K/Akt , via di segnale coinvolta nella regolazione di differenti processi fisiologici quali il differenziamento cellulare, il ciclo cellulare, la trascrizione, la traduzione, il metabolismo e l'apoptosi. Dalla letteratura emerge come ghrelina (10<sup>-9</sup> M) in condizioni basali aumenti i livelli di fosforilazione di Akt in diversi tipi cellulari e il pre-trattamento con l'inibitore selettivo di PI3K, Ly294002 sia in grado di ridurre la fosforilazione di Akt (Chung et al., 2008; Liang et al., 2013). La possibilità che ghrelina espliciti il suo effetto anti-apoptotico nelle cellule MC3T3-E1

mediante l'attivazione del pathway PI3K/Akt è stata valutata mediante Hoechst 33252 staining, utilizzando Ly294002. I risultati ottenuti mostrano che il pre-trattamento con l'inibitore selettivo di PI3K, Ly294002 è in grado di ridurre l'effetto anti-apoptotico di ghrelina. Sulla base di tali risultati possiamo ipotizzare che ghrelina inibisca l'apoptosi delle MC3T3-E1 indotta dal t-BHP attraverso l'attivazione del pathway PI3K/Akt. Akt può fosforilare proteine effettrici a livello della membrana o del citoplasma come la glicogeno sintasi chinasi-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), o agire come un fattore di trascrizione (Song et al., 2005). Nel presente studio, utilizzando le cellule rOB abbiamo mostrato che la fosforilazione di GSK-3 $\beta$  è aumentata dal trattamento con ghrelina in condizioni basali. GSK-3 $\beta$  regola numerose funzioni cellulari tra cui l'apoptosi e il differenziamento degli osteoblasti mediante il pathway di Wnt. Quando il segnale canonico di Wnt viene attivato, l'inattivazione per fosforilazione della GSK-3 $\beta$  determina l'accumulo di  $\beta$ -catenina nel citoplasma e la sua successiva traslocazione nel nucleo. La traslocazione nucleare di  $\beta$ -catenina è richiesta per promuovere l'interazione con diversi fattori trascrizionali modulando così l'espressione di numerosi geni bersaglio implicati nella proliferazione, nel differenziamento e nell'inibizione dell'apoptosi. Nel nostro studio abbiamo potuto dimostrare che ghrelina aumenta i livelli di  $\beta$ -catenina, mentre il pre-trattamento con l'inibitore selettivo di PI3K, Ly294002 è in grado di inibire sia la fosforilazione di GSK-3 $\beta$ , sia l'aumento di  $\beta$ -catenina.

In conclusione, i risultati ottenuti suggeriscono che l'effetto anti-apoptotico di ghrelina possa coinvolgere la via di segnale PI3K/Akt mediante l'inattivazione per fosforilazione di GSK-3 $\beta$  e successiva stabilizzazione della  $\beta$ -catenina. Recenti osservazioni (Manolagas and Almeida 2007; Almeida, 2012; Iyer et al., 2013) affermano che in condizioni di stress ossidativo  $\beta$ -catenina, proteina multifunzionale possa andare ad interagire non più con i fattori trascrizionali della famiglia dei T-Cell Factors (TCF) o dei Lymphoid Enhancer Factors (LEFT), modulando così l'espressione di numerosi geni bersaglio coinvolti nella

differenziazione e nella proliferazione degli osteoblasti ma devi verso la trascrizione mediata da FoxO modulando l'espressione di geni responsabili della de-tossificazione cellulare.

La nostra ipotesi è che ghrelina in condizioni di stress ossidativo sia comunque in grado di aumentare il pool di  $\beta$ -catenina in modo tale da consentire un'attività anti-apoptotica e un ripristino della funzionalità osteoblastica.

## **BIBLIOGRAFIA**

**Almeida M**, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, Kousteni S, O'Brien CA, Bellido T, Parfitt AM, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem*. 2007;282: 27285-97.

**Almeida M**, Iyer S, Martin-Millan M, Bartell SM, Han L, Ambrogini E, Onal M, Xiong J, Weinstein RS, Jilka RL, O'Brien CA, Manolagas SC. Estrogen receptor- $\alpha$  signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual. *J Clin Invest*. 2013;123:394-404.

**Almeida M**, O'Brien CA. Basic biology of skeletal aging: role of stress response pathways. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013; 68: 1197-208.

**Almeida M**. Aging mechanisms in bone. *Bonekey Rep*. 2012;1. pii: 102.

**Altindag O**, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int*. 2008;28:317-21.

**Andersen TL**, Abdelgawad ME, Kristensen HB, Hauge EM, Rolighed L, Bollerslev J, Kjærsgaard-Andersen P, Delaisse JM. Understanding coupling between bone resorption and formation: are reversal cells the missing link? *Am J Pathol*. 2013; 183: 235-46.

**Anderson HC**. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep*. 2003;5:222-6.

**Asagiri M**, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, Morita I, Wagner EF, Mak TW, Serfling E, Takayanagi H. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med*. 2005;202:1261-9.

**Baek KH**, Oh KW, Lee WY, Lee SS, Kim MK, Kwon HS, Rhee EJ, Han JH, Song KH, Cha BY, Lee KW, Kang MI. Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. *Calcif Tissue Int*. 2010; 87: 226–235.

**Bai XC**, Lu D, Liu AL, Zhang ZM, Li XM, Zou ZP, Zeng WS, Cheng BL, Luo SQ. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem*. 2005;280:17497-506.

**Baldanzi G**, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, Graziani A. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol*. 2002; 159: 1029-37.

**Banfi G**, Iorio EL, Corsi MM. Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46:1550-5.

**Baron R**, Rawadi G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology*. 2007;148:2635-43.

**Basu S**, Michaëlsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 288: 275-9.

**Bellido T**, Saini V, Pajevic PD. Effects of PTH on osteocyte function. *Bone.* 2013;54:250-7.

**Bellido T**. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int.* 2014;94:25-34.

**Bennett CN**, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102: 3324-3329.

**Betteridge DJ**. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000;49:3-8.

**Bianco P**, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008;2:313-9.

**Bonewald LF**. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26:229-38.

**Boyce BF**, Rosenberg E, de Papp AE, Duong le T. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *Eur J Clin Invest.* 2012; 42: 1332-41.

**Boyden LM**<sup>1</sup>, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* 2002;346:1513-21.

**Cao Y**, Zhou Z, de Crombrughe B, Nakashima K, Guan H, Duan X, Jia SF, Kleinerman ES. Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. *Cancer Res.* 2005;65:1124-8.

**Capulli M**, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561C:3-12.

**Case N**, Rubin J. Beta-catenin--a supporting role in the skeleton. *J Cell Biochem.* 2010;110:545-53.

**Chamberlain G**, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007;25:2739-49.

**Charles JF**, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med.* 2014;20:449-59.

**Chen CR**, Liao YW, Wang L, Kuo YH, Liu HJ, Shih WL, Cheng HL, Chang CI. Cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* and their cytoprotective activity in tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity of HepG2 cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2010;58:1639-42.

- Chen G**, Deng C, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012;8:272-88.
- Chen J**, Long F.  $\beta$ -catenin promotes bone formation and suppresses bone resorption in postnatal growing mice. *J Bone Miner Res.* 2013;28:1160-9.
- Choi EM**, Kim GH, Lee YS. *Atractylodes japonica* root extract protects osteoblastic MC3T3-E1 cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. *Phytother Res.* 2009;23:1537-42.
- Chung H**, Seo S, Moon M, Park S. Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 beta and ERK1/2 pathways mediate protective effects of acylated and unacylated ghrelin against oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis in primary rat cortical neuronal cells. *J Endocrinol.* 2008;198:511-21.
- Civitelli R.** Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473:188-92.
- Coipeau P**, Rosset P, Langonne A, Gaillard J, Delorme B, Rico A, Domenech J, Charbord P, Sensebe L. Impaired differentiation potential of human trabecular bone mesenchymal stromal cells from elderly patients. *Cytotherapy.* 2009;11:584-94.
- Costa JL**, Naot D, Lin JM, Watson M, Callon KE, Reid IR, Grey AB, Cornish J. Ghrelin is an Osteoblast Mitogen and Increases Osteoclastic Bone Resorption In Vitro. *Int J Pept.* 2011;2011:605193.
- Davis SW**, Camper SA. Noggin regulates Bmp4 activity during pituitary induction. *Dev Biol.* 2007;305:145-60.
- Day TF**, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 2005; 8: 739-750.
- Delaisse JM.** The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *Bonekey Rep.* 2014; 3: 561.
- Delhanty PJ**, van der Eerden BC, van der Velde M, Gauna C, Pols HA, Jahr H, Chiba H, van der Lely AJ, van Leeuwen JP. Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *J Endocrinol.* 2006;188:37-47.
- Delhanty PJ**, van der Eerden BC, van Leeuwen JP. Ghrelin and bone. *Biofactors.* 2014;40:41-8.
- DeLuca HF.** Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1689S-96S.

**Demontiero** O, Vidal C, Duque G. Aging and bone loss: new insights for the clinician. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2012;4:61-76.

**Dobrev** G, Chahrour M, Dautzenberg M, Chirivella L, Kanzler B, Fariñas I, Karsenty G, Grosschedl R. SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation. *Cell.* 2006;125:971-86.

**El Eter** E, Al Tuwajjiri A, Hagar H, Arafa M. In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22:1791-9.

**Ellies** DL, Viviano B, McCarthy J, Rey JP, Itasaki N, Saunders S, Krumlauf R. Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity. *J Bone Miner Res.* 2006;21:1738-49.

**Eriksen** CG, Olsen H, Husted LB, Sørensen L, Carstens M, Søballe K, Langdahl BL. The expression of IL-6 by osteoblasts is increased in healthy elderly individuals: stimulated proliferation and differentiation are unaffected by age. *Calcif Tissue Int.* 2010;87:414-23.

**Falany** ML, Thames AM 3rd, McDonald JM, Blair HC, McKenna MA, Moore RE, Young MK, Williams JP. Osteoclasts secrete the chemotactic cytokine mim-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281:180-5.

**Filaire** E, Toumi H. Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism: friend or enemy? *Joint Bone Spine.* 2012;79:341-6.

**Frost** HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res.* 1969; 3: 211-37.

**Fukushima** N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, Takeda S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kangawa K, Nagata K, Kojima M. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res.* 2005;20:790-8.

**Gazzerro** E, Smerdel-Ramoya A, Zanotti S, Stadmeier L, Durant D, Economides AN, Canalis E. Conditional deletion of gremlin causes a transient increase in bone formation and bone mass. *J Biol Chem.* 2007;282:31549-57.

**Genetos** DC, Toupadakis CA, Raheja LF, Wong A, Papanicolaou SE, Fyhrie DP, Loots GG, Yellowley CE. Hypoxia decreases sclerostin expression and increases Wnt signaling in osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2010;110:457-67.

**Genetos** DC, Yellowley CE, Loots GG. Prostaglandin E2 signals through PTGER2 to regulate sclerostin expression. *PLoS One.* 2011;6:e17772.

**Georgess** D, Machuca-Gayet I, Blangy A, Jurdic P. Podosome organization drives osteoclast-mediated bone resorption. *Cell Adh Migr.* 2014;8:191-204.

**Ghosh-Choudhury** N, Abboud SL, Nishimura R, Celeste A, Mahimainathan L, Choudhury GG. Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription. *J Biol Chem.* 2002;277:33361-8.

**Giustina** A, Mazziotti G, Canalis E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2008;29:535-59.

**Gong** Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Jüppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML; Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001;107:513-23.

**Govoni** KE. Insulin-like growth factor-I molecular pathways in osteoblasts: potential targets for pharmacological manipulation. *Curr Mol Pharmacol.* 2012;5:143-52.

**Granata** R, Settanni F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F, Destefanis S, Annunziata M, Martinetti M, Catapano F, Ghè C, Isgaard J, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G. Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidyl inositol 3-Kinase/Akt signaling. *Endocrinology.* 2007;148:512-29.

**Graves** DT, Jiang Y, Valente AJ. Regulated expression of MCP-1 by osteoblastic cells in vitro and in vivo. *Histol Histopathol.* 1999;14:1347-54.

**Ha** H, Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp Cell Res.* 2004;301:119-27.

**Hadjidakis** DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092:385-96.

**Han** Y, Jin YH, Yum J, Jeong HM, Choi JK, Yeo CY, Lee KY. Protein kinase A phosphorylates and regulates the osteogenic activity of Dlx5. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;407:461-5.

**Harris SE**, MacDougall M, Horn D, Woodruff K, Zimmer SN, Rebel VI, Fajardo R, Feng JQ, Gluhak-Heinrich J, Harris MA, Abboud Werner S. Meox2Cre-mediated disruption of CSF-1 leads to osteopetrosis and osteocyte defects. *Bone*. 2012;50:42-53.

**Hock JM**, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res*. 2001;16:975-84.

**Holmbeck K**, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham RC, Wu W, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H, Poole AR. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci*. 2005;118:147-56.

**Işeri SO**, Sener G, Saglam B, Ercan F, Gedik N, Yeğen BC. Ghrelin alleviates biliary obstruction-induced chronic hepatic injury in rats. *Regul Pept*. 2008;146:73-9.

**Ishii M**, Saeki Y. Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules. *Mod Rheumatol*. 2008;18:220-7.

**Itzstein C**, Coxon FP, Rogers MJ. The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases. *Small GTPases*. 2011;2:117-130.

**Iyer S**, Ambrogini E, Bartell SM, Han L, Roberson PK, de Cabo R, Jilka RL, Weinstein RS, O'Brien CA, Manolagas SC, Almeida M. FOXOs attenuate bone formation by suppressing Wnt signaling. *J Clin Invest*. 2013;123:3409-19.

**James AW**. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:684736.

**Jilka RL**, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Roberson PK, Weinstein RS, Manolagas SC. Decreased oxidative stress and greater bone anabolism in the aged, when compared to the young, murine skeleton with parathyroid hormone administration. *Aging Cell*. 2010;9:851-67.

**Jilka RL**, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC. Quantifying osteoblast and osteocyte apoptosis: challenges and rewards. *J Bone Miner Res*. 2007;22:1492-501.

**Jilka RL**. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone*. 1998;23:75-81.

**Jüppner H**, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF Jr, Hock J, Potts JT Jr, Kronenberg HM, et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science*. 1991;254:1024-6.

**Jurdic P**, Saltel F, Chabadel A, Destaing O. Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol*. 2006;85:195-202.

**Kang S**, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing

CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 2007;282:14515-24.

**Kasper G**, Mao L, Geissler S, Draycheva A, Trippens J, Kühnisch J, Tschirschmann M, Kaspar K, Perka C, Duda GN, Klose J. Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. *Stem Cells.* 2009;27:1288-97.

**Kawai M**, Rosen CJ. Insulin-like growth factor-I and bone: lessons from mice and men. *Pediatr Nephrol.* 2009;24:1277-85

**Kawano Y**, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 2003;116:2627-34.

**Kawczynska-Drozd A**, Olszanecki R, Jawien J, Brzozowski T, Pawlik WW, Korbut R, Guzik TJ. Ghrelin inhibits vascular superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2006;19:764-7.

**Kim SW**, Her SJ, Park SJ, Kim D, Park KS, Lee HK, Han BH, Kim MS, Shin CS, Kim SY. Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone.* 2005;37:359-69.

**Knothe Tate ML**, Falls TD, McBride SH, Atit R, Knothe UR. Mechanical modulation of osteochondroprogenitor cell fate. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:2720-38.

**Koga T**, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, Takai T. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature.* 2004;428:758-63.

**Koh JM**, Lee YS, Kim YS, Kim DJ, Kim HH, Park JY, Lee KU, Kim GS. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation. *J Bone Miner Res.* 2006;21:1003-11.

**Kojima M**, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999;402:656-60.

**Komori T**, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997;89:755-64.

**Kong YY**, Penninger JM. Molecular control of bone remodeling and osteoporosis. *Exp Gerontol.* 2000;35:947-56.

**Kramer I**, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, Feng JQ, Bonewald LF, Kneissel M. Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2010;30:3071-85.

- Kubota** K, Sakikawa C, Katsumata M, Nakamura T, Wakabayashi K. Platelet-derived growth factor BB secreted from osteoclasts acts as an osteoblastogenesis inhibitory factor. *J Bone Miner Res.* 2002;17:257-65.
- Kui** L, Weiwei Z, Ling L, Daikun H, Guoming Z, Linuo Z, Renming H. Ghrelin inhibits apoptosis induced by high glucose and sodium palmitate in adult rat cardiomyocytes through the PI3K-Akt signaling pathway. *Regul Pept.* 2009;155:62-9.
- Kular** J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem.* 2012;45:863-73.
- Kwon** OH, Lee CK, Lee YI, Paik SG, Lee HJ. The hematopoietic transcription factor PU.1 regulates RANK gene expression in myeloid progenitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335:437-46.
- Lear** PV, Iglesias MJ, Feijóo-Bandín S, Rodríguez-Penas D, Mosquera-Leal A, García-Rúa V, Gualillo O, Ghè C, Arnoletti E, Muccioli G, Diéguez C, González-Juanatey JR, Lago F. Des-acyl ghrelin has specific binding sites and different metabolic effects from ghrelin in cardiomyocytes. *Endocrinology.* 2010;151:3286-98.
- Lee** MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;309:689-94.
- Lee** NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, Kim N, Lee SY. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood.* 2005;106:852-9.
- Leupin** O, Piters E, Halleux C, Hu S, Kramer I, Morvan F, Bouwmeester T, Schirle M, Bueno-Lozano M, Fuentes FJ, Itin PH, Boudin E, de Freitas F, Jennes K, Brannetti B, Charara N, Ebersbach H, Geisse S, Lu CX, Bauer A, Van Hul W, Kneissel M. Bone overgrowth-associated mutations in the LRP4 gene impair sclerostin facilitator function. *J Biol Chem.* 2011;286:19489-500.
- Li** X, Cao X. BMP signaling and skeletogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 26-40.
- Li** X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Paszty C. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res.* 2008;23:860-9.
- Li** YB, Gao JL, Lee SM, Zhang QW, Hoi PM, Wang YT. Bisdemethoxycurcumin protects endothelial cells against t-BHP-induced cell damage by regulating the phosphorylation level of ERK1/2 and Akt. *Int J Mol Med.* 2011;27:205-11.

- Liang QH**, Liu Y, Wu SS, Cui RR, Yuan LQ, Liao EY. Ghrelin inhibits the apoptosis of MC3T3-E1 cells through ERK and AKT signaling pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;272:591-7.
- Lin C**, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J, Li Y, Feng G, Gao X, He L. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res.* 2009;24:1651-61.
- Linder S**, Wiesner C. Tools of the trade: podosomes as multipurpose organelles of monocytic cells. *Cell Mol Life Sci.* 2014 [Epub ahead of print]
- Little RD**, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet.* 2002;70:11-9.
- Liu AL**, Zhang ZM, Zhu BF, Liao ZH, Liu Z. Metallothionein protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. *Cell Biol Int.* 2004;28:905-11.
- Loots GG**, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, Ovcharenko D, Plajzer-Frick I, Rubin EM. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res.* 2005;15:928-35.
- Lorget F**, Kamel S, Mentaverri R, Wattel A, Naassila M, Maamer M, Brazier M. High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268:899-903.
- Lotinun S**, Kiviranta R, Matsubara T, Alzate JA, Neff L, Lüth A, Koskivirta I, Kleuser B, Vacher J, Vuorio E, Horne WC, Baron R. Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *J Clin Invest.* 2013;123:666-81.
- Luxenburg C**, Geblinger D, Klein E, Anderson K, Hanein D, Geiger B, Addadi L. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One.* 2007;2:e179.
- Maccarinelli G**, Sibilia V, Torsello A, Raimondo F, Pitto M, Giustina A, Netti C, Cocchi D. Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *J Endocrinol.* 2005;184:249-56.

- Maggio D**, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:1523-7.
- Maggio M**, Lauretani F, Ceda GP, De Vita F, Bondi G, Corsonello A, Cattabiani C, Lattanzio F, Ruggiero C, Nouvenne A, Meschi T, Bandinelli S, Ferrucci L. Use of proton pump inhibitors is associated with lower trabecular bone density in older individuals. *Bone.* 2013;57:437-42.
- Manolagas SC**, Almeida M. Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *Mol Endocrinol.* 2007;21:2605-14.
- Manolagas SC**, Parfitt AM. What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21 :369-74.
- Manolagas SC**. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000;21:115-37.
- Manolagas SC**. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2010;31:266-300.
- Manolagas SC**. Steroids and osteoporosis: the quest for mechanisms. *J Clin Invest.* 2013;123:1919-21.
- Mansukhani A.**, Ambrosetti D., Holmes G., Cornivelli L., Basilico C. Sox2 induction by FGF and FGFR2 activating mutations inhibits Wnt signaling and osteoblast differentiation. *J. Cell Biol.* 2005;168:1065–1076.
- Mao B**, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature.* 2002;417:664-7.
- Martin-Millan M**, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Zhao H, Weinstein RS, Jilka RL, O'Brien CA, Manolagas SC. The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Mol Endocrinol.* 2010;24:323-34.
- Matsuo K**, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473:201-9.
- Matsuo K**, Otaki N. Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases. *Cell Adh Migr.* 2012;6:148-56.
- Mazzocchi G**, Neri G, Rucinski M, Rebuffat P, Spinazzi R, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by

exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects. *Peptides*. 2004;25:1269-77.

**Mellis DJ**, Itzstein C, Helfrich MH, Crockett JC. The skeleton: a multi-functional complex organ: the role of key signalling pathways in osteoclast differentiation and in bone resorption. *J Endocrinol*. 2011;211:131-43.

**Montero A**, Okada Y, Tomita M, Ito M, Tsurukami H, Nakamura T, Doetschman T, Coffin JD, Hurley MM. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J Clin Invest*. 2000;105:1085-93.

**Morvan F**, Boulukos K, Clément-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssière B, Ammann P, Martin P, Pinho S, Pognonec P, Mollat P, Niehrs C, Baron R, Rawadi G. Deletion of a single allele of the *Dkk1* gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res* 2006;21:934-945.

**Mountzios G**, Dimopoulos MA, Bamias A, Papadopoulos G, Kastiris E, Syrigos K, Pavlakis G, Terpos E. Abnormal bone remodeling process is due to an imbalance in the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) axis in patients with solid tumors metastatic to the skeleton. *Acta Oncol*. 2007;46:221-9.

**Muccioli G**, Baragli A, Granata R, Papotti M, Ghigo E. Heterogeneity of ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. Toward the understanding of the molecular identity of novel ghrelin/GHS receptors. *Neuroendocrinology*. 2007;86:147-64.

**Muller FL**, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med*. 2007;43:477-503.

**Nakamura T**, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*. 2007;130:811-23.

**Neve A**, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res*. 2011;343:289-302.

**Nielsen RH**, Karsdal MA, Sørensen MG, Dziegiel MH, Henriksen K. Dissolution of the inorganic phase of bone leading to release of calcium regulates osteoclast survival. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;360:834-9.

**Nikolopoulos D**, Theocharis S, Kouraklis G. Ghrelin, another factor affecting bone metabolism. *Med Sci Monit*. 2010;16:RA147-62.

**Nishio Y**, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene* 2006; 372: 62-70.

**O'Sullivan S**, Naot D, Callon K, Porteous F, Horne A, Wattie D, Watson M, Cornish J, Browett P, Grey A. Imatinib promotes osteoblast differentiation by inhibiting PDGFR signaling and inhibits osteoclastogenesis by both direct and stromal cell-dependent mechanisms. *J Bone Miner Res.* 2007;22:1679-89.

**Obay BD**, Taşdemir E, Tümer C, Bilgin H, Atmaca M. Dose dependent effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides.* 2008;29:448-55.

**Onal M**, Xiong J, Chen X, Thostenson JD, Almeida M, Manolagas SC, O'Brien CA. Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) protein expression by B lymphocytes contributes to ovariectomy-induced bone loss. *J Biol Chem.* 2012;287:29851-60.

**Otto F**, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 1997;89:765-71.

**Ozgocmen S**, Kaya H, Fadillioglu E, Aydogan R, Yilmaz Z. Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Mol Cell Biochem.* 2007;295:45-52.

**Paic F**, Igwe JC, Nori R, Kronenberg MS, Franceschetti T, Harrington P, Kuo L, Shin DG, Rowe DW, Harris SE, Kalajzic I. Identification of differentially expressed genes between osteoblasts and osteocytes. *Bone.* 2009;45:682-92.

**Pandur P**, Maurus D, Köhl M. Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *Bioessays.* 2002;24:881-4.

**Pavlica S**, Gebhardt R. Protective effects of flavonoids and two metabolites against oxidative stress in neuronal PC12 cells. *Life Sci.* 2010;86:79-86.

**Pederson L**, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:20764-9.

**Peng XD**, Xu PZ, Chen ML, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, Sundararajan D, Chen WS, Crawford SE, Coleman KG, Hay N. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 2003;17:1352-65.

**Pinzone JJ**, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ, Shaughnessy JD. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood* 2009;113:517-525.

**Poole** KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, Reeve J. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J.* 2005;19:1842-4.

**Post** TM, Cremers SC, Kerbusch T, Danhof M. Bone physiology, disease and treatment: towards disease system analysis in osteoporosis. *Clin Pharmacokinet.* 2010;49:89-118.

**Powell** WF Jr, Barry KJ, Tulum I, Kobayashi T, Harris SE, Bringham FR, Pajevic PD. Targeted ablation of the PTH/PTHrP receptor in osteocytes impairs bone structure and homeostatic calcemic responses. *J Endocrinol.* 2011;209:21-32.

**Qing** H, Ardeshirpour L, Pajevic PD, Dusevich V, Jähn K, Kato S, Wysolmerski J, Bonewald LF. Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res.* 2012;27:1018-29.

**Raggatt** LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 2010;285:25103-8.

**Reardon** W, Winter RM, Rutland P, Pulleyn LJ, Jones BM, Malcolm S. Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat Genet.* 1994;8:98-103.

**Rhee** Y, Allen MR, Condon K, Lezcano V, Ronda AC, Galli C, Olivos N, Passeri G, O'Brien CA, Bivi N, Plotkin LI, Bellido T. PTH receptor signaling in osteocytes governs periosteal bone formation and intracortical remodeling. *J Bone Miner Res.* 2011;26:1035-46.

**Robling** AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:455-98.

**Rodríguez** A, Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Rotellar F, Valentí V, Silva C, Mugueta C, Pulido MR, Vázquez R, Salvador J, Malagón MM, Colina I, Frühbeck G. The ghrelin O-acyltransferase-ghrelin system reduces TNF- $\alpha$ -induced apoptosis and autophagy in human visceral adipocytes. *Diabetologia.* 2012;55:3038-50.

**Ryu** J, Kim HJ, Chang EJ, Huang H, Banno Y, Kim HH. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *EMBO J.* 2006;25:5840-51.

**Santos** A, Bakker AD, Klein-Nulend J. The role of osteocytes in bone mechanotransduction. *Osteoporos Int.* 2009;20:1027-31.

**Seibel** MJ. Clinical application of biochemical markers of bone turnover. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50:603-20.

**Seménov** M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem.* 2005;280:26770-5.

**Sendur** OF, Turan Y, Tastaban E, Serter M. Antioxidant status in patients with osteoporosis: a controlled study. *Joint Bone Spine*. 2009;76:514–518.

**Sethe** S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev*. 2006;5:91-116.

**Sharma** SM, Bronisz A, Hu R, Patel K, Mansky KC, Sif S, Ostrowski MC. MITF and PU.1 recruit p38 MAPK and NFATc1 to target genes during osteoclast differentiation. *J Biol Chem*. 2007;282:15921-9.

**Sheehan-Rooney** K, Pálincásová B, Eberhart JK, Dixon MJ. A cross-species analysis of *Satb2* expression suggests deep conservation across vertebrate lineages. *Dev Dyn*. 2010;239:3481-91.

**Sheweita** SA, Khoshhal KI. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Curr Drug Metab*. 2007;8:519-25.

**Sibilia** V, Pagani F, Mrak E, Dieci E, Tulipano G, Ferrucci F. Pharmacological characterization of the ghrelin receptor mediating its inhibitory action on inflammatory pain in rats. *Amino Acids*. 2012;43:1751-9.

**Sims** NA, Vrahnas C. Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Arch Biochem Biophys*. 2014; 561C:22-28.

**Singh** A, Winterbottom E, Daar IO. Eph/ephrin signaling in cell-cell and cell-substrate adhesion. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:473-97.

**Song** JJ, Lee YJ. Dissociation of Akt1 from its negative regulator JIP1 is mediated through the ASK1-MEK-JNK signal transduction pathway during metabolic oxidative stress: a negative feedback loop. *J Cell Biol*. 2005;170:61-72.

**Stenderup** K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003;33:919-26.

**Swarthout** JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene*. 2002;282:1-17.

**Syed** FA, Mödder UI, Roforth M, Hensen I, Fraser DG, Peterson JM, Oursler MJ, Khosla S. Effects of chronic estrogen treatment on modulating age-related bone loss in female mice. *J Bone Miner Res*. 2010;25:2438-46.

**Takayanagi** H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002;3:889-901.

**Takayanagi H**, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol Rev.* 2005;208:181-93.

**Teitelbaum SL**. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000;289:1504-8.

**Teitelbaum SL**. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol.* 2007;170:427-35.

**Teitelbaum SL**. The osteoclast and its unique cytoskeleton. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1240:14-7.

**Thompson NM**, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, Wells T. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology.* 2004;145:234-42.

**Tonna S**, Sims NA. Talking among ourselves: paracrine control of bone formation within the osteoblast lineage. *Calcif Tissue Int.* 2014;94:35-45.

**Urano T**, Inoue S. Genetics of osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 452: 287-293.

**van der Velde M**, Delhanty P, van der Eerden B, van der Lely AJ, van Leeuwen J. Ghrelin and bone. *Vitam Horm.* 2008;77:239-58.

**Wauquier F**, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med.* 2009;15:468-77.

**Winkler DG**, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003;22:6267-76.

**Wright HL**, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2009;2:56-64.

**Xavier CP**, Melikova M, Chuman Y, Üren A, Baljinnyam B, Rubin JS. Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/ $\beta$ -catenin signaling. *Cell Signal.* 2014;26:94-101.

**Xian L**, Wu X, Pang L, Lou M, Rosen CJ, Qiu T, Crane J, Frassica F, Zhang L, Rodriguez JP, Xiaofeng Jia, Shoshana Yakar, Shouhong Xuan, Argiris Efstratiadis, Mei Wan, Xu Cao. Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2012;18:1095-101.

**Xiao G**, Jiang D, Ge C, Zhao Z, Lai Y, Boules H, Phimphilai M, Yang X, Karsenty G, Franceschi RT. Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and

Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *J Biol Chem* 2005;280: 30689-30696

**Xiao Z**, Zhang S, Mahlios J, Zhou G, Magenheimer BS, Guo D, Dallas SL, Maser R, Calvet JP, Bonewald L, Quarles LD. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem*. 2006;281:30884-95.

**Xu J**, Tan JW, Huang L, Gao XH, Laird R, Liu D, Wysocki S, Zheng MH. Cloning, sequencing, and functional characterization of the rat homologue of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Bone Miner Res*. 2000;15:2178-86.

**Xu ZS**, Wang XY, Xiao DM, Hu LF, Lu M, Wu ZY, Bian JS. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis. *Free Radic Biol Med*. 2011;50:1314-23.

**Yakar S**, Kim H, Zhao H, Toyoshima Y, Pennisi P, Gavrilova O, Leroith D. The growth hormone-insulin like growth factor axis revisited: lessons from IGF-1 and IGF-1 receptor gene targeting. *Pediatr Nephrol*. 2005;20:251-4.

**Yamaguchi A**, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, Rosen V, Yoshiki S. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220:366-371.

**Yang F**, Tang W, So S, de Crombrughe B, Zhang C. Sclerostin is a direct target of osteoblast-specific transcription factor osterix. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;400:684-8.

**Yang X**, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, Li L, Brancorsini S, Sassone-Corsi P, Townes TM, Hanauer A, Karsenty G. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 2004; 117: 387-398.

**Zhang K**, Barragan-Adjemian C, Ye L, Kotha S, Dallas M, Lu Y, Zhao S, Harris M, Harris SE, Feng JQ, Bonewald LF. E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Mol Cell Biol*. 2006;26:4539-52.

**Zhang YB**, Zhong ZM, Hou G, Jiang H, Chen JT. Involvement of oxidative stress in age-related bone loss. *J Surg Res*. 2011;169:e37–e42.

**Zou X**, Feng Z, Li Y, Wang Y, Wertz K, Weber P, Fu Y, Liu J. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J Nutr Biochem*. 2012;23:994-1006.