



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali

XXXIII Ciclo

Coordinatore: Ch.mo Prof. Francesco Squadrito

**ACTIVATION OF WNT/B-CATENIN
PATHWAY BY A2 LIGANDS AS A
PROMISING STRATEGY TO
INCREASE BONE FORMATION**

Tesi di Dottorato:

Dott.ssa Federica **Mannino**

Tutor:

Prof. Alessandra **Bitto**

Triennio 2017-2020

INDICE

Introduzione	pagina 3 – 29
Materiali e metodi	pagina 30 – 43
Risultati	pagina 44 - 50
Discussione	pagina 51 - 56
Figure e tabelle	pagina 57 – 73
Bibliografia	pagina 74 - 106
Legenda delle figure	pagina 107 - 111

INTRODUZIONE

L'osteoporosi è una malattia sistemica dell'apparato scheletrico e rappresenta uno dei principali problemi che affligge la salute pubblica mondiale; è una condizione cronica caratterizzata da progressiva riduzione della massa ossea, del numero e dello spessore delle trabecole ossee, e da progressivo deterioramento della microarchitettura del tessuto osseo, con conseguente aumento della fragilità e suscettibilità alle fratture, legato prevalentemente all'invecchiamento. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), l'osteoporosi interessa più di 75 milioni di persone negli Stati Uniti, in Europa e in Giappone. In particolare, in Italia l'osteoporosi colpisce circa il 23% delle donne oltre i 40 anni e il 14% degli uomini con più di 60 anni (*Lane et al.; 2000*). L'insorgenza dell'osteoporosi è associata a diversi fattori di rischio, i quali sono distinti in modificabili e non modificabili. I fattori di rischio modificabili sono generalmente associati allo stile di vita e alle abitudini nutrizionali; tra questi riconosciamo carenza di minerali essenziali, basso peso corporeo, insufficiente apporto di calcio e vitamina D, consumo eccessivo di alcool, fumo di sigaretta e una inadeguata attività fisica. Tra i fattori non modificabili riconosciamo invece l'età, il sesso femminile, la carenza di ormoni estrogeni (per le donne), somatotropina, testosterone (sia per i maschi sia per le femmine), fattori genetici e familiarità. In particolare, il patrimonio genetico svolge un ruolo determinante, in quanto influenza la variabilità interpersonale della massa ossea; la

suscettibilità all'osteoporosi è infatti riconducibile alla presenza di diversi polimorfismi genetici, tra cui riconosciamo in particolare polimorfismi di geni che codificano il collagene tipo 1 (COL1A1), il recettore estrogenico (ER) e quello della vitamina D (VDR).

Oltre ai comuni fattori di rischio sopra elencati, anche alcune patologie e di conseguenza le diverse terapie farmacologiche ad esse associate possono aumentare il rischio di insorgenza di osteoporosi. Tra queste, vi sono le malattie del sistema endocrino, i disturbi digestivi e gastrointestinali, ormonale ed alimentari, le malattie autoimmuni e alcuni tumori solidi.

L'insorgenza di osteoporosi è principalmente dovuta ad uno squilibrio del rimodellamento osseo; in condizioni normali infatti l'attività dei due principali tipi cellulari, osteoblasti ed osteoclasti, coinvolte nel turnover dell'osso è bilanciata, mentre in condizioni patologiche l'attività degli osteoclasti predomina su quella degli osteoblasti, con conseguente aumento di riassorbimento osseo.

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo dinamico che svolge un ruolo di sostegno e un ruolo protettivo per gli organi vitali; è costituito da una parte organica e da una inorganica; la prima è composta dalle cellule proprie del tessuto, ovvero cellule osteoprogenitrici, osteoblasti, osteoclasti ed osteociti, dispersi in un'abbondante matrice extracellulare. Quest'ultima a sua volta è formata da una sostanza amorfa, molto ridotta e di natura proteoglicana, e da fibre collagene di tipo 1, che fungono da supporto per la sedimentazione di sali durante il processo di mineralizzazione. La parte inorganica è costituita da numerosi sali minerali

come i fosfati di calcio e magnesio e i citrati di Na, Mn, K e conferiscono alle ossa la caratteristica durezza.

Rimodellamento osseo

Il tessuto osseo va incontro ad un processo fisiologico necessario per mantenere la corretta integrità scheletrica e l'omeostasi minerale che prende il nome di rimodellamento osseo; le principali cellule coinvolte in questo processo sono gli osteoblasti, responsabili della deposizione di nuova matrice ossea, e gli osteoclasti, responsabili del riassorbimento osseo (*Raggatt et al., 2010*). Gli osteoclasti sono cellule mieloidi, appartenenti alla linea dei monociti-macrofagi, presenti in cavità all'interno della superficie ossea, conosciute come Lacune di Howship; si tratta di cellule multinucleate con aspetto schiumoso caratterizzate dalla presenza nella porzione basale di estroflessioni ed increspature, dalla presenza di numerosi mitocondri e polisomi e dall'espressione della fosfatasi acida e del recettore della calcitonina (*Hofbauer et al., 2000*). La cellula progenitrice del monocita-macrofago, in risposta all'osteoprotegerina (OPG), si fonde con altre di queste cellule svolgendo la loro funzione principale, ovvero rimuovere la matrice ossea. Il riassorbimento osseo si svolge essenzialmente in due fasi: demineralizzazione e proteolisi della matrice. La prima è dovuta all'abbassamento del pH a seguito del rilascio di ioni H⁺, mentre la proteolisi della matrice demineralizzata è effettuata da idrolisi lisosomiali e metalloproteinasi che dissolvono il contenuto minerale e gli enzimi della matrice organica. Il differenziamento delle cellule mieloidi in osteoclasti richiede

l'espressione di diversi fattori di trascrizione, come il fattore di trascrizione ETS PU.1, essenziale per lo sviluppo degli osteoclasti e di altre cellule mieloidi mature. È stato infatti dimostrato che topi knock out per il gene che codifica per PU.1 non riescono a sviluppare osteoclasti e macrofagi (*Tondravi et al., 1997*). Anche il fattore di trascrizione AP-1 c-Fos è essenziale per l'osteoclastogenesi; infatti topi knock out per il gene che codifica per c-Fos mostrano un aumento della densità ossea, causata da un difetto dello sviluppo o della funzione degli osteoclasti (*Grigoriadis et al., 1994*). Anche i fattori di trascrizione MITF (fattore di trascrizione associato alla microftalmia) e NFATc1 (fattore nucleare dei linfociti T attivati, citoplasmatico 1) sono necessari per la formazione degli osteoclasti e stimolano l'espressione dei geni necessari per la funzione degli osteoclasti, come la fosfatasi acida tartrato-resistente (*Luchin et al., 2000*) la catepsina K e il recettore della calcitonina (*Hu, et al., 2007*).

Osteoblastogenesi

Gli osteoblasti si sviluppano da cellule staminali mesenchimali pluripotenti, derivanti da cellule progenitrici della cresta neurale e mesodermale, le quali possono differenziarsi in adipociti, miociti, condrociti e osteoblasti; si tratta di cellule con intensa attività osteogenetica in quanto producono i costituenti organici della matrice ossea e regolano la deposizione dei componenti inorganici. Il differenziamento delle cellule progenitrici in osteoblasti è regolato da diversi fattori di trascrizione, tra cui riconosciamo le BMPs (bone

morphogenetic proteins) e RUNX-2 (runt-related transcription factor 2) (*Franceschi et al., 2003*).

Le Bone Morphogenetic proteins appartengono alla superfamiglia del fattore di crescita trasformante beta (TGF) e sono conosciute per la loro capacità di indurre in vivo la formazione di osso ectopico (*Urist et al., 1971*). Vengono sintetizzate nel citoplasma come precursori dimerici con un peptide segnale all'estremità N-terminale (*Harrison et al., 2011; Wang et al., 2014*) e poi secrete (*Sauermann et al., 1993*), mentre la porzione C-terminale sarà quella in grado di permettere il legame al loro recettore (*Wang et al., 2014*). Le BMPs svolgono la loro attività attraverso la stimolazione di due tipi di pathways, canonico e non canonico; la via canonica viene stimolata in seguito al legame della BMP con il suo recettore di membrana, i quali formano un complesso eterotetramerico formato da un dimero di recettori di tipo I e un dimero di recettori di tipo II della famiglia di recettori serina/treonina chinasi (*Heldin et al., 1997; Wang et al., 2014*). Il recettore di tipo II, costitutivamente attivo, fosforila il recettore di tipo I attivandolo, il quale a sua volta fosforila le proteine substrato note come R-Smads (*Horbelt et al., 2012; Wang et al., 2014*). Quest'ultime si associano a dei co-mediatori (co-Smad) formando un complesso che trasloca nel nucleo e, insieme ad altri coattivatori e corepressori, agisce da fattore di trascrizione regolando l'espressione di geni essenziali per il processo di osteoblastogenesi, come per esempio RUNX-2 (*Heldin et al., 2012; Wang et al., 2014*). Ad oggi si riconoscono più di 15 proteine BMP e, tra le diverse isoforme, le BMP-2, 4, 5, 6 e 7 sono principalmente coinvolte nel metabolismo osseo e la loro stimolazione scatena una cascata di eventi implicati nel processo di osteogenesi: chemotassi,

proliferazione e differenziamento delle cellule mesenchimali e controllo della sintesi di matrice extracellulare. In particolare, BMP6 è in grado di modulare l'espressione di tutti i marker osteogenetici nelle MSC; inoltre è stato recentemente dimostrato che la somministrazione della forma ricombinante umana della BMP-6 è in grado di indurre l'osteogenesi in topi e ratti che mostrano una condizione simil-osteoporotica e di stimolare il differenziamento di osteoblasti umani e murini incrementando i livelli di IGF-1 e EGF, le cui pathway attivate sembrano indurre il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali contribuendo agli effetti anabolici di BMP6 sull'osso in vivo (*Grasser et al., 2007*).

Alcune BMP invece possono inibire la formazione ossea, ad esempio, BMP3 è un regolatore negativo della densità ossea e BMP13 è un forte inibitore della formazione ossea (*Daluiski et al., 2001; Shen et al., 2009; Wang et al., 2014*).

RUNX2 appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione con dominio di omologia Runt, di cui fanno parte anche RUNX-1, 2 e 3 e svolge un ruolo chiave nel differenziamento degli osteoblasti, per la produzione di matrice e per la sua mineralizzazione, e nella morfogenesi scheletrica; è stato infatti dimostrato che topi knock out per il gene che codifica per questo fattore di trascrizione non presentano osteoblasti (*Ducy et al., 1997*).

RUNX2 è up-regolato negli osteoblasti immaturi e down-regolato negli osteoblasti maturi (*Komori et al., 2017*). RUNX-1, 2 e 3 presentano in dominio di legame con il DNA, chiamato Runt Domain (*Karsenty, 2000*). Durante il processo di formazione di nuova matrice, l'espressione di RUNX-2 aumenta (*Komori et al., 2008*) e la sua attività risulta essere influenzata dall'interazione

con proteine regolatrici del differenziamento osteoblastico, Sp7/Osterix, e con alcune proteine del segnale Wnt (Lef/Tcf) (*Gaur et al., 2005; Kahler et al., 2003; Reinhold et al., 2007*). Questa interazione blocca il differenziamento delle cellule progenitrici in adipociti e condrociti, favorendo invece il loro differenziamento in osteoblasti; RUNX-2, attivato in seguito alla sua fosforilazione da parte di una MAPK (mitogen-activated protein kinase) e della proteina chinasi A (PKA), può regolare positivamente o negativamente la trascrizione dei geni coinvolti nel processo di formazione ossea; ad esempio la sua interazione con molecole tipo HES, p300, CBP agiscono da repressori impedendo il legame di Runx2 al DNA alterandone la struttura e/o bloccandone l'interazione con i coattivatori (*Lian et al., 2003*). Al contrario, grazie alla presenza di un sito di legame specifico presente negli osteoblasti, chiamato cis-acting element (OSE2) e situato nel promotore di diversi geni specifici dell'osteoblasto (*Ducy et al., 1997; Liu et al., 2012*), RUNX-2 regola positivamente la trascrizione di Collagene di tipo 1, fosfatasi alcalina ossea, osteocalcina, RANKL, sclerostina e DMP1 (dentin matrix protein 1) (*Lian et al., 2006*) essenziali per l'osteoblastogenesi.

In seguito all'espressione di RUNX-2 e Collagene di tipo I, le cellule progenitrici degli osteoblasti proliferano in pre-osteoblasti, i quali cominceranno a depositare nuova matrice ossea formata da fibre collagene disposte in modo non organizzato e lasso con un basso grado di mineralizzazione; inoltre queste cellule subiscono cambiamenti morfologici, diventando grandi cellule cuboidi con un nucleo basale rotondo, altamente positive per l'attività della bone ALP e molto attive nella secrezione delle proteine della matrice ossea (*Capulli et al., 2014*).

Il passaggio successivo prevede il differenziamento dei pre-osteoblasti in osteoblasti maturi con successiva deposizione di matrice costituita da collagene le cui fibre sono disposte in modo regolare e fitto con alto grado di mineralizzazione. Durante questo processo, i livelli di espressione di RUNX-2 si abbassano mentre vengono prodotte molecole in grado di regolare la mineralizzazione della matrice come l'osteocalcina, l'osteopontina e l'ostectina, il RANKL, necessario per la differenziazione degli osteoclasti, nonché il recettore per il PTH (PTH1R) (*Bonewald, 2006*).

Gli osteoblasti maturi rimangono quindi "intrappolati" nella matrice ossea appena depositata e mineralizzata, subendo modifiche morfologiche: il corpo cellulare si riduce di dimensioni e da esso iniziano a emergere processi citoplasmatici, il numero di organelli diminuisce mentre il rapporto tra nucleo e citoplasma aumenta (*Hancox et al., 1965*). Gli osteoblasti maturi si differenziano così in osteociti maturi; durante questo differenziamento si ha una downregolazione dei geni precedentemente stimolati, come collagene di tipo I, bone ALP e osteocalcina, mentre l'espressione dei geni target degli osteociti, come la proteina dentinmatrix 1 (DMP1) e la sclerostina, risulta aumentata. Gli osteociti sono cellule quiescenti e rappresentano circa il 90-95% di tutte le cellule del tessuto osseo maturo (*Bonewald, 2007*); queste cellule presentano prolungamenti dendritici che attraversano i canalicoli della matrice mineralizzata permettendo le interazioni con altri osteociti, all'interno dell'osso mineralizzato, e con le cellule di rivestimento osseo sulla superficie ossea e con quelle del midollo osseo (*Kamioka, et al., 2001*).

Il ruolo principale degli osteociti è quello di fungere da meccano sensori: sono infatti coinvolti nella traduzione di stimoli meccanici in segnali biochimici. In seguito ad un maggiore carico meccanico, gli osteociti stimolano indirettamente la neoformazione ossea attraverso la riduzione dell'espressione di sclerostina. Inoltre, gli osteociti sono coinvolti nell'omeostasi minerale, poiché secernono il phosphate regulator Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23), il quale riduce i livelli serici di fosfato inibendo il riassorbimento dello stesso a livello renale e l'attivazione della vitamina D (*Chen et al., 2015*); infine producono fattori osteoclastogenici come il fattore 1 stimolante le colonie dei macrofagi (CSF-1) e il ligando del recettore di NF-κB (RANKL) per indurre il rimodellamento osseo (*Schett et al., 2009*). A seguito della mechanosensation e della sua successiva conversione in segnale chimico, gli osteociti regolano la formazione ossea e il riassorbimento osseo, agendo sulla differenziazione e sulla funzione degli osteoblasti e degli osteoclasti. Nonostante siano necessari ulteriori studi per comprendere il cross-talk tra osteoblasto-osteocita, il principale marker secreto dagli osteociti che regola la formazione ossea è sicuramente il gene SOST, che codifica per la sclerostina; si tratta di una glicoproteina che inibisce il differenziamento e la funzione degli osteoblasti, antagonizzando alcune proteine della famiglia delle BMPs (*Bellido et al., 2005*). Numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato che la sclerostina regola negativamente l'attività degli osteoblasti; infatti è stato osservato che topi knock out per il gene SOST mostrano una massa ossea elevata e un'augmentata resistenza ossea (*Li et al., 2008*); mentre topi transgenici che mostrano una

overespressione del gene SOST mostravano una ridotta massa ossea (*Rhee et al., 2011*).

Osteoclastogenesi

Il corretto equilibrio tra formazione e riassorbimento osseo è regolato non solo da fattori sistemici, ma anche da connessioni tra osteoblasti e osteoclasti; diversi studi hanno infatti evidenziato che gli osteoblasti, in seguito ad una stimolazione di tipo paracrino, sono in grado di attivare il differenziamento del precursore monocita-macrofago in osteoclasto grazie alla secrezione del fattore stimolante la linea cellulare dei macrofagi (M-CSF). Si tratta di una glicoproteina transmembrana che regola specificamente la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione delle cellule della linea dei monocitici-macrofagi attraverso un recettore della superficie cellulare selettivamente espresso su questi tipi di cellule, c-fms. L'M-CSF viene rilasciato dagli osteoblasti e dalle cellule progenitrici del midollo osseo, si lega al suo recettore c-fms sui pre-osteoclasti attivando una cascata intracellulare e promuovendo così il differenziamento e la proliferazione dei precursori in osteoclasti maturi. Un effetto omologo viene esercitato sui macrofagi dalla via di segnale RANKL/RANK, basata su un'interazione osteoblasti-preosteoclasti. RANKL, membro della superfamiglia 11 del ligando del fattore di necrosi tumorale, è una proteina di membrana omotrimerica di tipo II espressa sulla superficie delle cellule stromali, monociti, cellule T e B attivate, osteociti e precursori degli osteoblasti che formano l'osso, e può essere rilasciata dalle cellule per proteolisi da una delle numerose proteasi

extracellulari (*Hikita et al., 2006; Lynch et al., 2005; Nagy et al., 2015*); una volta secreta si lega al suo recettore RANK espresso sulla superficie dei precursori degli osteoclasti. Il legame RANKL/RANK attiva la fusione e il differenziamento dei preosteoclasti in osteoclasti maturi; in particolare, il recettore RANK va incontro ad un fenomeno di oligomerizzazione che causa il reclutamento di numerose molecole, tra cui il fattore TRAF6 (fattore 6 associato al recettore TNF). L'interazione tra recettore e TRAF6 causa la fosforilazione, su residui di tirosina, della molecola adattatrice Grb2, che a sua volta attiva diverse molecole di segnale che presentano domini di omologia Scr2 (*Boyce et al., 2007; Wada et al., 2005*). Questa proteina attiva la MAPK che induce la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione NF- κ B che innesca l'upregolazione di c-Fos; quest'ultimo si lega a NFATc1 in un complesso regolato da ioni calcio promuovendo il differenziamento dei preosteoclasti in osteoclasti maturi (*Nagy et al., 2015; Yavropoulou et al., 2008*). TRAF6 può anche formare un complesso con c-Src, attivando la serina/treonina chinasi anti-apoptotica Akt, con conseguente fosforilazione e inibizione della proteina pro-apoptotica Bad (*Nagy et al., 2015; Wong et al., 1999*). RANKL, quindi, avvia la riorganizzazione citoscheletrica e la polarizzazione cellulare degli osteoblasti maturi per attivare la loro attività di riassorbimento osseo (*Nagy et al., 2015; Yavropoulou et al., 2008*).

Molecole regolatrici del rimodellamento osseo

Un'altra molecola in grado di regolare il rimodellamento osseo è l'osteoprotegerina (OPG), chiamato anche membro della superfamiglia 11B del recettore del fattore di necrosi tumorale (TNFRSF11B); si tratta di un recettore delle citochine solubili appartenente alla famiglia del TNF (*Belibasakis et al., 2012*) e prodotta da osteoblasti, fibroblasti e molti altri tipi di cellule. L'OPG, come suggerisce il nome stesso, protegge l'osso dal riassorbimento sia fisiologico che patologico poiché fungendo da recettore esca naturale, si lega a RANKL evitando la sua interazione con RANK ed inibendo di conseguenza l'osteoclastogenesi. Pertanto, il differenziamento e la proliferazione degli osteoclasti si basa su un corretto equilibrio tra RANKL/OPG, fattori prodotti entrambi dagli osteoblasti.

Anche diverse citochine proinfiammatorie possono influenzare il riassorbimento osseo (*Graves et al., 2011*) attraverso la stimolazione della produzione di RANKL. Tra queste citochine riconosciamo il TNF- α prodotto principalmente dai macrofagi attivati, ma anche da altri tipi di cellule come le cellule T attivate, i leucociti polimorfonucleati, le cellule epiteliali, le cellule endoteliali, i fibroblasti e le cellule di rivestimento osseo, inclusi gli osteoblasti. Il TNF- α upregola l'espressione di c-Fos, recettore di M-CSF e induce i precursori degli osteoclasti e le cellule stromali del midollo a produrre citochine osteoclastogeniche, come IL-1, RANKL e M-CSF. Inoltre numerosi studi dimostrano che il TNF- α è in grado di regolare il rimodellamento osseo inibendo anche l'attività degli osteoblasti attraverso la regolazione di RUNX2 che causa

una riduzione nel reclutare i precursori degli osteoblasti (*Karmakar et al., 2010*). Anche le interleuchine 1 e 6 sembrano essere coinvolte nel processo di riassorbimento osseo; in particolare, la prima è in grado di stimolare la produzione di altre citochine e prostaglandine che possono a loro volta indurre l'espressione di RANKL nonché la produzione di enzimi degradativi, mentre l'IL-6 stimola il riassorbimento osseo migliorando la formazione di osteoclasti attraverso un meccanismo dipendente da RANKL (*Palmqvist et al., 2002*).

Tra gli altri fattori paracrini, sempre prodotti dagli osteoblasti e che regolano positivamente l'osteoclastogenesi, riconosciamo la proteina correlata all'ormone para-tiroideo (PTHrP), il cui recettore è espresso su entrambe le superfici cellulari di osteoblasti ed osteoclasti. Il PTH è un ormone prodotto dalle ghiandole paratiroidi ed agisce in maniera diretta sugli osteoblasti e indiretta sugli osteociti aumentando la mobilitazione ossea di calcio; in particolare, il legame del PTH con il suo recettore stimola la sintesi del fattore M-CSF a livello degli osteoclasti, e la produzione di RANKL, a livello degli osteoblasti. Inoltre il PTH riduce la secrezione di OPG (*Boyce et al., 2005; Glass et al., 2005*).

Processo importante della regolazione del rimodellamento osseo sembra essere anche l'apoptosi degli osteociti; questo processo infatti potrebbe stimolare le cellule vicine, osteociti e osteoblasti, variando l'espressione dei geni pro e anti-osteoclastogenici. In particolare l'apoptosi degli osteociti potrebbe stimolare gli osteoblasti ma anche gli stessi osteociti a produrre e secernere RANKL (*Nakashima et al., 2011*). Inoltre, anche gli osteociti esprimono sulla superficie cellulare il recettore per il PTH e la sua attivazione potrebbe regolare il riassorbimento osseo; è stato infatti dimostrato in topi transgenici che

l'attivazione di questo recettore a livello degli osteociti è associato ad un aumento di RANKL (*Bellido et al., 2012*) mentre una ridotta densità ossea, durante la fase di allattamento, è causata da un aumento di espressione del PTHrP e del recettore ad esso associato (*O'Brien et al., 2008*). Numerosi studi hanno infatti dimostrato che gli osteociti presenti in animali durante la fase di allattamento mostrano un'elevata espressione di geni tipicamente espressi dagli osteoclasti e necessari alla loro funzione di riassorbimento, come la fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP) e la catepsina k, dimostrando che probabilmente gli osteociti promuovono il riassorbimento della matrice mineralizzata mediante meccanismi molecolari simili a quelli innescati dagli osteoclasti (*Qing et al., 2012*). Infine, numerose evidenze indicano che gli osteociti potrebbero produrre OPG e il fattore M-CSF, dimostrando quindi che gli osteociti svolgono un ruolo chiave nel processo di riassorbimento osseo in quanto sono in grado di controllare e regolare in maniera diretta o indiretta il differenziamento e la funzione degli osteoclasti in condizioni fisiologiche e patologiche.

Wnt/ β -catenin signaling pathway

Un'altra via di segnale essenziale per l'osteogenesi è la via Wnt/ β -catenin, coinvolta anche in numerosi processi biologici tra cui lo sviluppo embrionale, la tumorigenesi (*Chen et al., 2009*), la promozione di eventi mitotici e la differenziazione di alcune linee cellulari, e il rinnovamento di molti tessuti, tra cui l'osso. Le Wnts appartengono ad una famiglia di glicoproteine di segnale, ricche in cisteina, che svolgono un ruolo essenziale nella regolazione di

numerosi processi biologici quali il controllo della proliferazione cellulare e della sopravvivenza cellulare. La regolazione di questi processi avviene grazie al legame dei ligandi di Wnt con i loro recettori Frizzled (FZD) e i corecettori delle lipoproteine a bassa densità LDL-related protein (LRP) 5/6; quest'ultimi sono recettori della membrana plasmatica conservati coinvolti in numerosi processi, tra cui il metabolismo dei lipidi, il trasporto del carico e la segnalazione cellulare. I recettori Frizzled sono proteine a sette domini transmembrana altamente versatili che contribuiscono all'attivazione dei diversi pathways di Wnt grazie alla loro interazioni con la fosfoproteina citoplasmatica Dishevelled (Dsh); riconosciamo infatti la via canonica (β -catenin dipendente) e la via non canonica (Planar Cell Polarity e Wnt/Ca²⁺ pathways, calcio dipendente) (*Liu et al., 2009*). Nella prima via, in assenza del legame tra Wnt e il suo recettore, la proteina β -catenina risulta legata con le proteine Axin 1 e 2, la poliposi poliposica adenomatosa (APC), caseina chinasi (CK1) e glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK3) in un complesso citoplasmatico; quest'ultimo fosforila i residui amino-terminali di serina e treonina della β -catenina ed il complesso viene riconosciuto da Trcp, una subunità della E3 ubiquitina ligasi, che porterà all'ubiquitinazione e degradazione del complesso a livello del proteasoma (*He et al., 2004*), prevenendo così la traslocazione della β -catenina nel nucleo e quindi l'espressione dei geni tramite i fattori di trascrizione T cell/lymphoid enhancer (TCF/LEF). Invece, quando Wnt lega il suo recettore transmembrana Frizzled ed i suoi corecettori LDL-related protein (LRP) 5/6, si forma il complesso Wnt/Fz/LRP5-6 che richiama la proteina scaffold Dsh; si ha così la fosforilazione di LRP5/6 da parte della GSK3 del complesso con l'axina a livello

del recettore, l'inibizione della fosforilazione della β -catenina, che risulta quindi stabile, e il suo accumulo al livello citoplasmatico. La β -catenina trasloca quindi nel nucleo, si lega con TCF/LEF ed attiva l'espressione genica dei target di Wnt (*Bryan T., et al.*). La via canonica risulta essere quindi principalmente coinvolta nel processo di deposizione di nuova matrice ossea; infatti, viene espressa in tutte le cellule della linea osteoblastica, promuove la differenziazione dei precursori mesenchimali in osteoblasti a discapito dell'adipogenesi (*Bodine et al., 2006*), migliora la sopravvivenza degli osteoblasti e degli osteociti in vitro ed è stato dimostrato essere coinvolta anche nella meccano-trasduzione, guarigione delle fratture e maturazione degli osteoclasti (*Robinson et al., 2006*). Il pathway Wnt/ β -catenina può anche influenzare il processo di riassorbimento osseo, poiché attraverso l'upregolazione di OPG e la downregolazione di RANKL negli osteoblasti ed osteociti riduce l'osteoclastogenesi (*Takahashi et al., 2011*)

Le vie non canoniche di Wnt sono β -catenina-indipendenti, sono meno conosciute rispetto alla via canonica e vengono suddivise in due diversi pathways: la Planar Cell Polarity pathway e Wnt/ Ca^{2+} pathway. In quest'ultima via, il complesso Wnt/Fz/LRP5-6 recluta oltre alla proteina Dsh anche una proteina G, le quali attivano la fosfolipasi C (PLC) promuovendo così il rilascio intracellulare di Calcio; l'aumento di Calcio intracellulare attiva secondi messaggeri come la protein chinasi C (PKC), la chinasi calcio-calmodulina-dipendente II (CamKII) o la calcineurina fosfatasi calcio-dipendente (CaN) (*Ahumada et al., 2002; Kohn and Moon 2005; Kuhl et al., 2000; Lien WH. et al., 2014; Ma and Wang 2007; Sheldahl et al., 2003*); in particolare, il CaN

attivato defosforila NFAT, che può quindi entrare nel nucleo e attivare i suoi geni bersaglio (*Lien et al., 2014; Mikels et al., 2006; Murphy et al., 2002*), mentre PKC attiva la GTPase Cdc42 che a sua volta può prendere parte nel percorso di polarità delle cellule planari (PCP), che può essere co-regolata dalle proteine Rho e Rac le quali sono attivate nella segnalazione non canonica Wnt/JNK. Questa via usa un circuito Ror2- dipendente per attivare effettori a valle dell'attivazione della AP-1 (proteina appartenente ad una famiglia di fattori di trascrizione) (*Lien et al., 2014; Oishi et al., 2003; Schambony et al., 2007*).

Oltre a fattori coadiuvanti, la via di segnale Wnt/ β -catenin può essere inibita da diversi fattori, come le proteine Dickkopf-related protein 1 (DKK1) e la sclerostina; entrambi sono prodotti dagli osteociti e inibiscono la formazione dell'osso, limitano anche la sua riparazione grazie alla soppressione della via WNT/ β -catenin (*Liu et al., 2018*). La sclerostina agisce come un'antagonista di Wnt e, legandosi al corecettore Lrp5/6 (*Li et al., 2012*), blocca gli effetti di trasduzione del segnale a valle e inibisce la proliferazione e la differenziazione degli osteoblasti mentre aumenta la loro apoptosi (*Takahashi et al., 2011*). I soggetti che presentano mutazioni del gene che codifica per la sclerostina mostrano elevati livelli di massa ossea e vanno incontro alle cosiddette patologie sclerosanti (sclerosteosi e malattia di Van Buchem); un'aumentata espressione di sclerostina causa invece perdita ossea e riduzione della resistenza alle fratture. Come già evidenziato, i livelli di espressione di sclerostina da parte degli osteociti possono ridursi in condizioni di ipercortisolismo (*Van Lierop et al., 2012*), in risposta al carico meccanico, al trattamento con PTH (*Keller et al., 2005*). In particolare con l'avanzare dell'età, una riduzione nella massa ossea

risulta essere associata all'immobilizzazione e ad un aumento dell'espressione della sclerostina.

Dkk1 è una glicoproteina espressa dagli osteoblasti e dagli osteociti maturi e, come la sclerostina, antagonizza la via di segnale Wnt/Bcatenin legando e sequestrando i corecettori Lrp5/6. Questa proteina presenta affinità verso le proteine Kremen 1/2 (Krm 1/2), che collaborano per bloccare il pathway di Wnt (Nakamura *et al.*, 2008), ed è stato inoltre dimostrato che Dkk1 potrebbe inibire la via canonica di Wnt anche grazie all'aumento di espressione di octamer-binding transcription factor 4 (Ou *et al.*, 2016). È stato inoltre evidenziato che, a differenza della sclerostina, il trattamento con il PTH non regola negativamente i livelli di espressione di Dkk1.

Osteoporosi indotta da glucocorticoidi

La regolazione delle interazioni tra i diversi tipi cellulari che costituiscono il tessuto osseo e le proteine, citochine e fattori di crescita finora discussi garantisce il corretto equilibrio del processo di rimodellamento osseo in condizioni fisiologiche, ma che risulta alterato, a favore del riassorbimento osseo, in condizioni patologiche di osteoporosi. L'osteoporosi può essere classificata in primitiva o secondaria; del primo tipo fanno parte l'osteoporosi idiopatica, osteoporosi di tipo I o post-menopausale, osteoporosi di tipo II o senile. Quest'ultima è causata da una ridotta produzione di vitamina D da parte dell'organismo e/o da un ridotto assorbimento di calcio a livello intestinale. Le osteoporosi secondarie derivano invece da condizioni patologiche quali malattie

endocrine-metaboliche, malattie neoplastiche, iperparatiroidismo, ipercorticosurrenalismo, malattie congenite o dall'utilizzo di farmaci osteopenizzanti come cortisonici (*Khosla et al., 2018*). In particolare, quest'ultimo rappresenta la forma più comune di osteoporosi secondaria, in quanto i glucocorticoidi sono usati cronicamente per il trattamento di numerose condizioni patologiche (*Mudano et al., 2001*); si stima, infatti, che nel 30-50% dei pazienti sottoposti a terapia cronica con GC a lungo termine, si verifica una perdita ossea rilevante e 1 su 4 sviluppa anche un certo grado di osteonecrosi (*Reid, 1997*). Un aumento del rischio di frattura risulta essere l'evento avverso più grave associato all'uso cronico di glucocorticoidi e sembra essere influenzato dal dosaggio e dalla durata del trattamento: più lungo e più intenso è il trattamento, maggiore è il rischio di frattura (*Amiche et al., 2018*). In generale, la terapia con GC è responsabile della perdita ossea tramite diversi meccanismi che causano essenzialmente una diminuzione della formazione ossea e un aumento del riassorbimento osseo.

A livello molecolare, i glucocorticoidi influenzano direttamente il metabolismo osseo inibendo la trascrizione dei geni coinvolti nel processo di deposizione di nuova matrice ossea attraverso due vie principali: la prima prevede l'aumento di espressione del recettore gamma 2 attivato dal proliferatore del perossisoma (PPAR γ 2) che favorisce la differenziazione delle cellule progenitrici pluripotenti in adipociti rispetto agli osteoblasti, con conseguente diminuzione del numero di osteoblasti (*Wu et al., 1996*); la seconda invece è dovuta all'inibizione della via canonica di Wnt/ β -catenin (*Ohnaka et al., 2005*). Nello specifico, i glucocorticoidi aumentano i livelli di espressione degli antagonisti di Wnt,

sclerostina e Dkk1, con conseguente riduzione del differenziamento e della proliferazione dei precursori degli osteoblasti in osteoblasti maturi e incrementata apoptosi di osteoblasti ed osteociti (*Hayashi et al., 2009*). L'importanza della sclerostina nella modulazione di questi processi biologici è dimostrata da diversi studi in cui topi che non esprimono la sclerostina mostrano un'integrità ossea mantenuta anche in presenza di glucocorticoidi (*Sato et al., 2016*). I glucocorticoidi regolano in maniera diretta anche il processo di riassorbimento osseo attraverso vari meccanismi molecolari: aumentando la produzione di fattore stimolante le colonie di macrofagi (M-CSF) e di RANKL, riducono la produzione di OPG da parte degli osteoblasti ed osteociti, con conseguente aumento sia del numero che dell'attività degli osteoclasti (*Swanson et al., 2006*) e stimolano la secrezione di IL-6, citochina che stimola l'osteoclastogenesi (*Dovio et al., 2006*). I glucocorticoidi inoltre possono anche influenzare negativamente la vitalità e l'attività degli osteociti, con conseguente riduzione della microarchitettura ossea (*Chappard et al., 1996*).

I glucocorticoidi hanno anche un effetto negativo sulla forza muscolare, con conseguente aumento del rischio di caduta e quindi di frattura (*Sato et al., 2017*), ed effetti sistemici sul metabolismo osseo, in particolare sull'omeostasi del calcio. Infatti, si ha un ridotto assorbimento a livello intestinale e una maggiore perdita di calcio nelle urine a causa di un metabolismo difettoso della vitamina D3 (*Patschan et al., 2001*); queste condizioni causano un iperparatiroidismo secondario che, a sua volta, produce un aumento del riassorbimento osseo (*McIlwain, 2003*).

Terapie farmacologiche

Ad oggi, per prevenire e curare l'osteoporosi indotta da glucocorticoidi (GIO) la FDA (Food and Drug Administration) ha approvato diversi farmaci: bifosfonati antiriassorbitivi (alendronato, risedronato e zoledronato), denosumab e per le donne gli estrogeni (terapia ormonale sostitutiva), i modulatori selettivi dei recettori per gli estrogeni (approvati in Italia Raloxifene e Bazedoxifene) e l'ormone paratiroideo ricombinante, teriparatide. Nonostante vi siano numerosi farmaci attualmente approvati e commercializzati per l'osteoporosi, la maggior parte di essi ha come effetto la riduzione della perdita di osso (bifosfonati, estrogeni, SERMs, calcitonina e anticorpi monoclonali come il denosumab), solo poche molecole hanno come effetto la formazione di nuova matrice ossea (frammenti ricombinanti del paratormone e ranelato di stronzio). Questi farmaci presentano però delle limitazioni d'uso ed effetti collaterali che spesso causano l'interruzione della terapia da parte dei pazienti. Per esempio, i bifosfonati sono farmaci relativamente sicuri e ben tollerati ma possono agire sinergicamente con i glucocorticoidi inducendo l'osteonecrosi della mandibola (*Rutkowski, 2011*). Il denosumab è un anticorpo monoclonale umanizzato che agisce formando degli immunocomplessi con il RANKL; possiede un profilo di sicurezza simile ai bisfosfonati, ma è stato evidenziato che l'interruzione del trattamento potrebbe causare un aumento delle fratture vertebrali (*Anastasilakis et al., 2017*). Il teriparatide è un polipeptide sintentico ricombinante dell'ormone umano paratiroideo utilizzato ad intermittenza e non per lunghi periodi (*Rossini et al., 2013*) e presenta molti problemi di compliance (*Bultink, et al., 2013*). Inoltre

considerato che l'osteoporosi è una patologia che può svilupparsi anche in seguito a trattamenti farmacologici cronici di ampio utilizzo (terapia steroidea o con ormoni tiroidei) appare evidente come sia necessario identificare nuove molecole in grado di promuovere la formazione dell'osso e possibilmente prive, o quasi, di effetti collaterali o interazioni con altri farmaci.

Diverse ricerche hanno dimostrato che l'adenosina è un importante regolatore del rimodellamento osseo (*Mediero et al., 2013; He et al., 2013*). L'adenosina, generata dal catabolismo dei nucleotidi dell'adenina e rilasciata nei siti di lesione ed ipossia, modula diversi processi biologici tramite il legame con specifici recettori espressi sulla superficie cellulare, ovvero i recettori dell'adenosina suddivisi in A1, A2A, A2B, A3 (A1R, A2AR, A2BR, A3R rispettivamente), ciascuno dei quali presenta un profilo farmacologico unico (*Fredholm et al., 2011*). Questi recettori appartengono ad una famiglia di recettori accoppiati a proteine G, sono espressi in diversi tessuti e tipi cellulare e svolgono un ruolo fondamentale in processi come l'embriogenesi, la differenziazione cellulare e il rimodellamento dei tessuti. Tra le diverse isoforme, è stato dimostrato che i recettori A1 e A2A agiscono come regolatori positivi del rimodellamento osseo (*Mediero et al., 2015*). Nello specifico, il recettore A1 svolge un ruolo fondamentale per la differenziazione e la funzione degli osteoclasti; studi in vitro hanno infatti dimostrato che il blocco o la delezione del recettore A1 sopprime l'espressione di RANKL (*Kara et al., 2010*). Invece, l'attivazione del recettore A2A inibisce la differenziazione e la funzione degli osteoclasti in vitro tramite l'inibizione PKA-dipendente della traslocazione nucleare NF- κ B (*Mediero et al., 2013*); inoltre la stimolazione di questo recettore causa un aumento dei livelli

di OPG e della secrezione di IL-10, una potente citochina antinfiammatoria, una riduzione dei livelli di RANKL, M-CSF, IL-1 β e TNF- α (*Mediero et al., 2012*) e infine promuove la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo, risultando la sua espressione upregolata nelle fasi tardive di differenziamento degli osteoblasti (*Gharibi et al., 2011*). Di conseguenza, gli agonisti del recettore A2A potrebbero essere utili nel trattamento dell'osteoporosi o dei meccanismi che portano all'insorgenza di questa patologia.

Polideossiribonucleotide

Il PDRN, o polideossiribonucleotide, è un frammento di Dna a basso peso molecolare che possiede numerose attività: riparazione dei tessuti, effetti anti ischemici e anti-infiammatori (*Baek et al., 2018*). Attualmente è impiegato per il trattamento di lesioni cutanee nell'ambito della medicina rigenerativa, di lesioni del connettivo in patologie distrofiche e distrofico-ulcerative come il piede diabetico (*Squadrito et al., 2017*). Dal punto di vista chimico, il PDRN è un polianione lineare di desossiribonucleotidi con legami fosfodiesterici in cui le unità monomeriche sono rappresentate da nucleotidi purinici e pirimidinici. Queste catene polimeriche sono accoppiate per formare una struttura sterica definita come una doppia elica (*Tonello et al., 1996*). L'unità monomerica della catena polideossiribonucleotidica è il desossiribonucleotide di peso molecolare fra 50 e 1500 KDa; la frazione più rappresentata è fra 80 e 132 KDa corrispondenti ad un range da 50 a 2000 paia di basi. Il PDRN viene estratto

dallo sperma di trota (*Oncorhynchus mykiss*) e salmone (*Oncorhynchus keta*) (*Bitto et al., 2008*) attraverso processi di estrazione con procedure di purificazione e sterilizzazione ad alta temperatura per ottenere un principio attivo puro > 95%, senza proteine e peptidi farmacologicamente attivi (*Bianchini et al., 1981*); una volta internalizzato, il PDRN viene degradato dagli enzimi di membrana attivi e funge così da fonte di deossinucleosidi purinici e pirimidinici e desossiribonucleotidi, aumentando la proliferazione cellulare e l'attività in diversi tessuti (*Bitto et al., 2008*): questo processo prende il nome di “salvage pathway” (*Sini et al., 1999*). In alcuni particolari condizioni di stress, per esempio in seguito a danneggiamento del tessuto, le cellule utilizzano nucleosidi provenienti da DNA o RNA frammentato per ricostituire nucleotidi utilizzabili nella sintesi del DNA. Il PDRN protegge le cellule dal danneggiamento indotto dagli UV, infatti, in fibroblasti irradiati provoca l'attivazione di p53 e migliora la riparazione del DNA innescando il salvage pathway (*Belletti et al., 2007*).

Il principale meccanismo d'azione del PDRN è però rappresentato dalla sua interazione con il recettore A2A, coinvolto in diversi processi biologici, come la crescita cellulare, l'angiogenesi e l'infiammazione (*Jacobson et al., 2009*; *Linden et al., 2005*). In particolare, è stato dimostrato che il PDRN sia in grado di incrementare i livelli di VEGF e angiopoietina-1 (*Thellung et al., 2017*; *Bitto et al., 2013*; *Galeano et al., 2008*), contestualmente mantiene il controllo della proliferazione cellulare e previene una esagerata iperproliferazione (*Altavilla et al., 2009*). Clinicamente è impiegato per migliorare la ripitelizzazione della cute come nelle ferite nei pazienti diabetici o in caso di bruciature (*Bitto et al., 2008*; *Galeano et al. 2008*). Il farmaco riesce ad aumentare anche la

proliferazione dei pre-adipociti (*Raposio et al., 2008*) ed ha anche effetti anti infiammatori, è quindi impiegato per migliorare i segni clinici dell'artrite riducendo i valori ematici di molte citochine infiammatorie e incrementando l'espressione di quelle antinfiammatorie come IL-10 (*Bitto et al., 2008*). Nella rigenerazione del tessuto osseo, il PDRN gioca un importante ruolo come stimolatore della crescita degli osteoblasti, per la formazione di osso e la riduzione del tempo impiegato per la riparazione del tessuto osseo (*Bowler et al., 2001; Guizzardi et al., 2003*). Il PDRN è anche candidato come terapia per la rigenerazione della cartilagine considerando gli effetti testati sulla linea primaria di condrociti (*Gennero et al., 2013*). Altre conferme derivano da studi sperimentali eseguiti su osteoblasti che hanno messo in evidenza gli effetti osteogenici del PDRN e quindi la possibilità di utilizzarlo sui pazienti affetti da difetti ossei (*Buffoli et al., 2017*), valutando come geni target RUNX2, OCG3, OPN.

Delivery system: Acido ialuronico

Per migliorare la farmacocinetica e il *delivery* e ridurre gli effetti indesiderati dei diversi farmaci utilizzati nel trattamento dell'osteoporosi, vengono utilizzati diversi sistemi che prevedono l'associazione dei diversi farmaci con molecole attive, come l'acido ialuronico, e molecole non attive, come per esempio il polietilenglicole (PEG). Ad esempio, alcuni studi hanno dimostrato che l'alendronato coniugato con il PEG inibisce efficacemente la riduzione della cartilagine di accrescimento nell'osso di ratti osteoporotici, riducendo inoltre gli

effetti collaterali dell'alendronato sul rivestimento mucoso e gastrico (*Hughes et al., 1994*). In altri studi invece, per migliorare il rilascio intradermico, viene utilizzato l'alendronato in associazione con acido ialuronico sotto forma di gel per migliorare il processo di guarigione delle ferite e nella rigenerazione ossea (*Makvandi, et al., 2020*).

L'acido ialuronico (HA) è un polisaccaride lineare appartenente alla classe dei glicosaminoglicani, costituito da ripetizioni di acido D-glucuronico e di unità disaccaridiche di N-acetil-D-glucosamina legate da legami glicosidici β (1,4) e β (1,3), rispettivamente, e massa molecolare nell'intervallo da 104 a 107 Da. L'HA è espresso in tutti i tessuti maturi poiché rappresenta un componente essenziale delle matrici extracellulari (ECM) e si trova in molte parti del corpo umano, come le cavità sinoviali, gli occhi, il cordone ombelicale e i tessuti connettivi; è importante per lo sviluppo e la riparazione dei tessuti, regola il contenuto di acqua e il traffico molecolare formando un gel con proprietà viscoelastiche specifiche e svolge un ruolo chiave anche nell'omeostasi dei tessuti. L'HA viene sintetizzato da ialuronasi sintasi, enzimi di membrana che producono il polimero estrudendo la catena attraverso le membrane cellulari e consentendo così una crescita del polimero che raggiunge i 1000-10.000 kDa (*Guizzardi et al., 2013*); l'HA mostra un'elevata affinità per il recettore di differenziazione CD44 presente sulla superficie di molte cellule; l'interazione HA-CD44 richiama le ialuronidasi che degradano l'HA, consentendo il suo ingresso all'interno delle cellule (*Harada et al., 2007*). Si riconoscono due tipi di HA che differiscono tra di loro per il diverso peso molecolare, alto peso molecolare (HMWHA > 500 kDa) e basso peso molecolare (LMWHA < 500kDa)

e per le funzioni biologiche; infatti LMWHA è coinvolto nella risposta infiammatoria poiché agisce come molecola di segnale stimolando la produzione di molte citochine, come l'IL-8 (*Bai et al., 2005*), mentre HMWHA è coinvolto nel mantenimento dell'integrità strutturale della ECM.

L'HA svolge un ruolo importante nel tessuto osseo poiché interagisce con le cellule coinvolte nel metabolismo osseo (monociti, fibroblasti, osteoblasti, osteoclasti, osteociti) e con le proteine (fattori di crescita, collagene tipo I, collagene tipo V, fibronectina, calcitonina), stimolando la migrazione cellulare, l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule mesenchimali indifferenziate in cellule osteoblastiche (*Dechert et al., 2006; Kim et al., 2007; Pasquinelli et al., 2008*) e l'adesione degli osteoclasti alla superficie ossea (*Prince et al., 2004*). Inoltre, materiali a base di HA sono stati utilizzati in diversi modelli animali da soli o associati a scaffold, promuovendo e/o migliorando la formazione ossea (*Mendes et al., 2008; Suzuki et al., 2014*). L'elevata capacità di HA di trattenere l'acqua e l'elevata viscoelasticità, insieme alla sua biocompatibilità, biodegradabilità e non immunogenicità, gli conferiscono un profilo unico tra i materiali biologici e lo rendono adatto a varie applicazioni mediche e farmaceutiche.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare gli effetti del PDRN, agonista del recettore A2A, sul processo di formazione di nuova matrice ossea attraverso la stimolazione del pathway di Wnt/ β -catenina.

MATERIALI E METODI

Processo di estrazione e purificazione del PDRN

Il processo di estrazione dei polinucleotidi avviene a partire dalle gonadi di trote (*Oncorhynchus mykiss*) maschi provenienti da allevamenti italiani; una volta recuperato, lo sperma di trota viene sottoposto ad un trattamento iniziale, suddiviso in diverse fasi: lisi enzimatica di almeno 12 ore con papaina, frammentazione parziale delle catene di DNA e depurinazione del DNA. La lisi enzimatica viene catalizzata dalla papaina; questo enzima è in grado di idrolizzare i legami ammidici convertendo le proteine a catena lunga in peptidi e successivamente in amminoacidi; inoltre, rispetto ad altre proteasi, presenta una buona attività idrolitica contro un'ampia gamma di substrati proteici. Una volta avvenuta la lisi enzimatica si ha la frammentazione parziale delle catene di DNA necessaria per ridurre i pesi molecolari; in particolare, in questa fase viene utilizzata una molecola chimica in grado di aumentare la produzione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) che a loro volta causano specifici danni sulle catene del DNA andando in contro a frammentazione. Infine, si ha la fase di depurinazione che causa la perdita di una base azotata purinica, adenina o guanina, in seguito alla rottura di un legame glicosidico che lega il 1'-C del deossiribosio e la posizione 9 dell'anello purinico; ciò porta alla formazione di un sito apurinico (AP) su un'elica del DNA in cui è presente un gruppo ossidrilico al posto della purina eliminata in posizione 1' del deossiribosio del DNA. La reazione viene indotta mediante l'utilizzo di un acido ed è responsabile della

perdita dell'informazione genetica. Tutte le fasi sono condotte all'interno di un reattore termostato ad una temperatura di 40-50°C e pH vicino alla neutralità, ottenendo un composto ricco in polinucleotidi. Il composto ottenuto è stato quindi sottoposto ad una fase sterilizzazione all'interno di un reattore termostato; questo passaggio prevede l'utilizzo di elevate temperature (100°C) e bassa acidità (pH >4,5), avviene in condizioni di anaerobiosi ed è necessario per disattivare le proteine presenti. Successivamente il composto va incontro ad una fase di filtraggio mediante un filtro a pressa in grado di trattenere le proteine disattivate, mediante la lisi enzimatica, durante la fase precedente. Il prodotto filtrato viene poi sottoposto ad una sterilizzazione chimica con idrossido di sodio, sostanza basica in grado di disattivare i prioni in grado di resistere alla lisi enzimatica con papaina e alla successiva filtrazione. Si tratta di agenti infettivi di natura proteica in grado di causare diverse patologie; nello specifico sono isomeri che differiscono dalle glicoproteine normalmente espresse solamente per un'alterazione conformazionale, ed essendo delle proteine, sono prive di acido nucleico e quindi del materiale genetico. La sterilizzazione chimica avviene sempre all'interno di un reattore termostato ad elevate temperature e in condizioni di pH basico, ottenendo così un composto ricco di soli polinucleotidi. Il prodotto filtrato ottenuto viene quindi precipitato mediante l'aggiunta di benzoalconio cloruro, una miscela di sali di ammonio quaternario, e nuovamente filtrato mediante un filtro a sacco per permettere la separazione dell'ammonio dai polinucleotidi; questi ultimi sono poi essiccati mediante un essiccatore a letto fluido a tamburo e sottoposti a granulazione mediante un

granulatore umido oscillante in grado di granulare i materiali velocemente e con standard elevati di consistenza ed omogeneità.

Coniugazione del PDRN con Acido Ialuronico

Il composto ricco in polinucleotidi è stato coniugato con HA ad alto e basso peso molecolare. Per l'HMWHA, 400 mg di HA di peso molecolare medio 150 000 Da è stato sciolto in 40 mL di acqua deionizzata.

A causa della sua elevata solubilità in acqua e della rapida degradazione nel corpo umano, l'HA a basso ed alto peso molecolare viene coniugato al polietilenglicole (PEG), un polietere solubile e biocompatibile, mediante un processo di fotopolimerizzazione. Questa coniugazione è necessaria per aumentare il tempo di circolazione, inibire la degradazione enzimatica e migliorare la solubilità dell'HA. Il complesso HA/PEG viene a sua volta coniugato con il composto ricco in polinucleotidi e sottoposto a prove di permeabilità di membrana, solubilità e stabilità al fine di ottenere la formulazione da utilizzare nei successivi studi in vitro e in vivo.

Alla soluzione di HA è stato aggiunto un legante a base di diidrazide 1 (35,7 mg, 0,15 mmol) che permette la coniugazione con i polideossiribonucleotidi; la miscela è stata posta in agitazione *overnight* e l'indomani sono state valutati il grado di coniugazione, la viscosità, la densità e la stabilità della miscela ottenuta. L'HA ad alto peso molecolare (H-HA) è stato sintetizzato in modo analogo a partire da 400 mg di HA di MW medio 150 000 Da.

Culture cellulari di osteoblasti primari

Per questo esperimento, le colture primarie cellulari di osteoblasti sono state allestite utilizzando cellule prelevate dalle ossa lunghe di topi di sesso maschile del ceppo C57BL/6 (Harlan, Italia) di circa quattro settimane, stabulati in condizioni di luce e temperatura controllate e con acqua e cibo ad libitum, in accordo con le linee guida istituzionali. Per il prelievo delle ossa lunghe gli animali sono stati sacrificati, le zampe sono state disarticolate e prelevate a partire dalla testa del femore fino alla caviglia e dalla testa dell'omero alla attaccatura della zampa. Dopo essere state ripulite dal tessuto circostante le ossa sono state mantenute in PBS sterile, le epifisi sono state rimosse e il midollo osseo è stato eliminato attraverso un *flushing* con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies) e antibiotico (1% Pen/strep, Life Technologies). Le diafisi sono state tagliate in pezzi di circa 1-2mm, lavate diverse volte con PBS sterile e incubate a 37°C in agitazione per tre ore in una soluzione contenente DMEM addizionato a penicillina 10U/ml e streptomina 10 mg/ml e 2 mg/ml di collagenasi, per rimuovere i residui tissutali. Al termine delle tre ore le ossa sono state trasferite in piastre di coltura con DMEM addizionato a siero fetale bovino (FBS, Life Technologies) al 10%, pen/strep e acido ascorbico 0,1mg/ml per promuovere la migrazione degli osteoblasti. Le cellule sono state mantenute in condizioni standard (37°C, pressione parziale di CO² pari al 5%), il terreno è stato sostituito ogni 48 ore mentre le ossa sono state rimosse dalla piastra di coltura dopo 7 giorni. La migrazione cellulare è stata

osservata dopo circa 2 giorni e le cellule sono state trattate dopo aver raggiunto la confluenza.

Colture cellulari di bone marrow cells

Le bone marrow cells sono state isolate dal midollo osseo di topi di sesso maschile del ceppo C57BL/6 (Harlan, Italia) di circa quattro settimane. In particolare, una volta prelevate le ossa lunghe, il midollo osseo è stato recuperato mediante *flushing* con DMEM e antibiotico (Pen/strep 1%) e posto in piastra di coltura per 3 giorni, al termine dei quali le cellule aderenti sono state scartate mentre quelle aderenti sono state mantenute fino al raggiungimento della confluenza. Le cellule sono state lavate diverse volte con PBS, riseminate in piastre di coltura ad una densità di 1×10^5 cellule/cm² e differenziate in osteoblasti utilizzando un terreno “osteogenico” composto da α -MEM addizionato ad 1 μ M di desametasone, 50 μ g/ml di acido ascorbico e 10 mM di β -glicerofosfato. Le cellule sono state trattate al termine dei 10 giorni di differenziamento.

Colture cellulari di osteoclasti primari

Per l'isolamento degli osteoclasti primari, il midollo osseo è stato recuperato mediante *flushing* con α -MEM, posto in piastra di coltura ed incubato overnight in α -MEM contenente il 10% di siero bovino fetale e l'1% di pen/strep per ottenere una sospensione monocellulare. La mattina seguente, le cellule

mononucleate non aderenti sono state recuperate, seminate in piastra di coltura e coltivate per 48 ore con α -MEM addizionato con 30 ng/ml di M-CSF (fattore stimolante le colonie macrofagi) umano ricombinante; le cellule in questa fase sono state considerate macrofagi del midollo osseo M-CSF-dipendenti (BMM) e utilizzate come precursori degli osteoclasti. La differenziazione in osteoclasti è stata ottenuta coltivando le cellule BMM con il terreno “osteoclastogenico” contenente α -MEM addizionato con M-CSF umano (30 ng/ml) e RANKL umano ricombinante (30 ng/ml) per 7 giorni, al termine dei quali le cellule sono state sottoposte a trattamento.

Culture cellulari di MLO-A5 cell line

In questo studio sono state utilizzate le cellule MLO-A5 (Kerafast), post-osteoblasti/pre-osteociti murini che esprimono geni normalmente espressi dagli osteoblasti maturi come fosfatasi alcalina, recettori PTH di tipo 1 e osteocalcina. Le cellule MLO-A5 sono state seminate in piastra di coltura *collagen coated* ad una densità di $3.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ e mantenute in un terreno di proliferazione composto da α -MEM addizionato con il 10% di FBS, pen/strep, 2 mM di L-glutamina e 10 mM di HEPES. Una volta raggiunta la confluenza, il terreno di proliferazione è stato sostituito con un terreno di differenziamento costituito da α -MEM addizionato con il 10% di FBS, pen/strep, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di acido ascorbico e 4 mM di β -glicerolo fosfato. Il terreno di differenziamento è stato cambiato ogni 2-3 giorni e mantenuto fino a 7-9 giorni, necessari affinché le cellule producano una matrice mineralizzata costituita da fibre collagene e che

assumano una tipica conformazione a nido d'ape. Al termine dei 9 giorni di differenziamento, le cellule sono state sottoposte ai vari trattamenti.

Trattamenti

Le cellule sono state trattate secondo il seguente schema: controllo (nessun trattamento), solo desametasone alla concentrazione di 1 μ M per 24 ore per indurre una condizione simil-osteoporotica; desametasone (1 μ M per 24h) e PDRN alla dose di 0,5, 1 e 2 μ M per altre 24h; desametasone più PDRN (0,5, 1 e 2 μ M) più HMWHA (20 mg/ml); desametasone più PDRN (0,5, 1 e 2 μ M) più LMWHA (20 mg/ml); desametasone più PDRN (0,5, 1 e 2 μ M) e ZM241385, inibitore selettivo del recettore A2A, alla concentrazione di 1 μ M per 24h.

Determinazione della citotossicità mediante analisi MTT

Per valutare la citotossicità del PDRN è stata effettuata un'analisi basata sulla determinazione della vitalità cellulare.

L'MTT è un colorante tetrazolo([tetrazolico]) di colore giallo che viene ridotto a formazano di colore viola nelle cellule vitali; subito dopo la reazione enzimatica, viene aggiunta una soluzione di solubilizzazione (solitamente dimetilsolfossido) in modo da dissolvere il formazano insolubile prodotto nella soluzione colorata. L'assorbanza della soluzione colorata può essere quantificata tramite misurazione spettrofotometrica, ad una lunghezza d'onda normalmente compresa tra i 500 e i 600 nm. La riduzione dell'MTT dipende dall'attività

metabolica cellulare che a sua volta dipende dal flusso di NAD(P)H. Cellule che hanno un metabolismo lento riducono minime quantità di MTT; al contrario, cellule in rapida divisione, e quindi con un metabolismo veloce, esibiscono un alto livello di riduzione dell'MTT.

Le cellule sono state trattate con desametasone (1 uM) da solo o in associazione con il PDRN (0,5, 1 e 2 uM); PDRN (0,5, 1 e 2 uM) più HMWHA; PDRN (0,5, 1 e 2 uM) più LMWHA per 24 ore in modo da determinare l'effetto citotossico. 5 mg/ml di colorante tetrazolio MTT bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma Aldrich, Milano, Italia) disciolto in PBS filtrato e sterile è stato aggiunto all'interno dei pozzetti (20 µl/pozzetto) 5 ore prima del termine del trattamento e la piastra è stata poi nuovamente incubata a 37C°; al termine delle 24h di trattamento è stato rimosso il mezzo di coltura e sono stati aggiunti 200 µl/pozzetto di dimetilsolfossido (DMSO) per sciogliere i cristalli insolubili di formazano; a questo punto, è stata valutata l'assorbanza alle lunghezze d'onda di 540 e 620 nm. La differenza tra i valori delle due assorbanze è stata utilizzata per calcolare il valore medio per ogni replicato e inoltre per valutare la citotossicità. Tutte le dosi sono state testate in quadruplicato in ogni piastra e l'esperimento è stato ripetuto cinque volte ed i risultati espressi come percentuale di vitalità.

Estrazione del RNA

Una volta terminati i trattamenti con il PDRN, le cellule sono state recuperate mediante la procedura di tripsinizzazione; il processo prevede l'eliminazione del terreno di coltura, due lavaggi in PBS (tampono fosfato salino) sterile per eliminare ogni traccia di FBS e l'aggiunta di tripsina 0,25 % (1X Gibco by Life Technologies), lasciandola agire per 5 minuti a 37C° in incubatore. Al termine dell'incubazione è stata aggiunta una quantità idonea di terreno (pari al doppio della tripsina utilizzata), necessaria per bloccare l'azione della tripsina che altrimenti risulterebbe tossica per le cellule, e la sospensione cellulare è stata centrifugata a 1200 rpm per 5 minuti. Eliminato il surnatante, il pellet cellulare ottenuto è stato risospeso in 0,5 mL di TRIzol (TRIzol® reagent, Invitrogen) e l'RNA è stato estratto secondo un protocollo standard. L'analisi quantitativa e qualitativa degli estratti è stata effettuata rispettivamente attraverso quantificazione al Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA) e mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Retrotrascrizione e Real-Time PCR

1 μ g di RNA totale estratto è stato retro-trascritto usando il kit Super-Script IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific e random primers secondo il protocollo standard). 1 μ l di cDNA ottenuto è stato usato per quantificare l'espressione dei geni coinvolti nel processo di rimodellamento osseo attraverso Real Time PCR, utilizzando la β -actina come controllo endogeno per consentire

una quantificazione relativa. La RTqPCR è stata eseguita in triplicato in piastre da 96 pozzetti utilizzando miscele di Fast Plus EvaGreen Master Mix, primers disegnati mediante l'impiego del Software Primer3 Plus (tabella 1). La progressione della RTqPCR è stata monitorata con lo strumento QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystem) e i prodotti amplificati sono stati quantificati misurando il ciclo soglia (CT) dei geni target e la β -actina. Dopo la normalizzazione, il valore medio dei controlli è stato utilizzato come calibratore e i risultati sono stati espressi secondo il metodo $2^{-\delta\delta_{ct}}$ rispetto alla media dei controlli.

Valutazione dell'espressione proteica mediante Western Blot

Una volta terminati i trattamenti con il PDRN, le cellule sono state lavate con PBS sterile e in ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l di RIPA buffer (10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% leupeptina, 1% pepstatina A, 0,5% PMSF); le cellule sono state staccate meccanicamente mediante l'utilizzo di uno scraper ed infine centrifugate a 15000 rpm per 15 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato raccolto ed utilizzato per la determinazione delle proteine mediante test colorimetrico secondo la metodica di Bradford (Bio-Rad DC Protein Assay), utilizzando l'albumina come riferimento standard. L'intensità del colore è valutata con rivelazione spettrofotometrica a 650 nm. Il lisato cellulare viene diluito con Laemmli buffer (Bio-Rad Laboratories) contenente 5% (v/v) di 2-betamercaptoetanololo; quest'ultimo L'azione di quest'ultimo è quella di rompere i legami disolfuro delle proteine, che, coniugata

alla bollitura di 5 minuti precedente al caricamento in gel, contribuisce alla denaturazione delle proteine, impedendo che la loro stessa morfologia vada ad influire sulla migrazione. Le proteine dei campioni (30ug) sono state separate su gel SDS/PAGE a differenti concentrazioni di poliacrilamide, in base ai pesi molecolari delle proteine di interesse, e trasferite su una membrana di fluoruro di polivinile (PVDF) in un buffer di trasferimento (39mM/l glicina, 48 mM/l Tris a pH 8,3 e 20% (v/v) metanolo) a 300mA per 2 ore. I siti aspecifici delle membrane sono stati bloccati con il latte al 5% (p/v) disciolto in PBS con 0,1% di Tween 20 per un'ora e successivamente sono stati effettuati tre lavaggi da 10 minuti ciascuno in PBS 0,1% Tween. Le membrane sono state incubate overnight con un anticorpo primario specifico per i seguenti target: β -catenin, Wnt5a, Wnt10b, DKK-1, sclerostina, Runx-2, BMP-6, Col1a1, b-ALP, NFATc1, catepsina K. Il giorno seguente, sono stati effettuati tre lavaggi da 10 minuti ciascuno con PBS/0,1% per eliminare l'anticorpo primario in eccesso e le membrane sono state incubate con un anticorpo secondario coniugato alla perossidasi (KPL) per un'ora a temperatura ambiente in PBS-Tween 0.15% e latte in polvere al 5%. Dopo i lavaggi in PBS 0,15% Tween, l'espressione delle proteine è stata visualizzata mediante una reazione di chemiluminescenza grazie all'impiego di ECL (KPL), ed è stato quantificata con la densitometria a scanner usando il sistema per immagini LI-COR. I risultati sono stati espressi come intensità integrata e sono stati confrontati ai valori di espressione della β -actina (Cell Signaling), valutata come controllo endogeno.

Animali e procedure sperimentali

Tutte le procedure sperimentali sono state approvate ed eseguite in conformità con le linee guida del Comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali della School of Medicine della New York University.

Per questo studio sono stati utilizzati topi del ceppo C57BL/6 *wild-type* (n=10) e topi A2AR knockout (A2AKO; n = 10), di sesso maschile e di età compresa tra 6 e 8 settimane, per valutare l'induzione da parte del desametasone di una condizione simil-osteoporotica. I topi *wild-type* e A2AKO sono stati forniti dal Dr. J. F. Chen (Boston University School of Medicine, Boston, MA, USA) e mantenuti in condizioni ambientali controllate (ciclo luce-buio di 12 ore, 23 °C), e alimentati con cibo e acqua *ad libitum* nella Facility per animali della New York University School of Medicine (NYUSoM). Prima dell'induzione, entrambi i topi *wild-type* e A2AKO sono stati suddivisi in maniera *random* in due gruppi di trattamento (gruppo controllo; gruppo GIO) da 5 animali ciascuno e stabulati in gabbie singole. I topi del gruppo Gio hanno ricevuto una somministrazione intraperitoneale giornaliera di desametasone alla dose di 30mg/kg per sette settimane; a partire dal giorno 0 di induzione e al termine di ogni settimana di trattamento, è stata misurata la *Bone Mineral Density* (BMD) mediante *micro-computed tomography* (microTC). Al termine delle sette settimane di induzione, i topi sono stati sacrificati in una camera a CO₂ e i femori dei topi sono stati prelevati e preparati per la successiva analisi in tomografia computerizzata (microTC).

MicroTC

I femori sono stati fissati in etanolo al 70% e preparati per microTC ad alta risoluzione. Questa tecnologia di imaging 3-D è stata utilizzata per valutare in maniera qualitativa e quantitativa le aree di riassorbimento osseo nell'osso femorale murino. Le analisi sono state eseguite in Skyscan 1172 microCT (Bruker, Fitchburg, WI, USA) utilizzando i seguenti parametri di imaging: 60 kV, 167 μ A, dimensione pixel 9,7 μ m, matrice 2000 \times 1332, passi di rotazione di 0,3 $^{\circ}$, 6 medie, correzione del movimento di 10, Filtro in alluminio da 0,5 mm, 2 segmenti scansionati per campione (56 min / segmento). Le immagini sono state ricostruite con il software NRecon (Skyscan; Micro Photonics, Allentown, PA, USA) [intervallo dell'istogramma 0-0,065, correzione dell'indurimento del raggio di 35, livellamento gaussiano (fattore 1), correzione degli artefatti dell'anello di 7]. Per l'analisi qualitativa, le immagini 3-D dei femori dei topi sono state quindi ricostruite dalle sezioni trasversali utilizzando il software CTNa fornito da Skyscan e l'elaborazione è stata eseguita per ottenere misurazioni morfometriche dirette in 3-D. Per l'analisi quantitativa, l'area di interesse è stata segmentata manualmente contrassegnando il volume di interesse (VOI) una regione rotonda attraverso l'osso difettoso di 3 mm di diametro. I dati sono stati calcolati in percentuale per evitare differenze intrinseche tra gli animali. La percentuale di osso riassorbito è stata calcolata sottraendo l'area del difetto rimanente dall'area del difetto totale. Per l'analisi 3-D qualitativa e quantitativa, tutti i dati sono stati esportati in formato DICOM e importati nel

software Amira (Visage Imaging GmbH, Berlino, Germania). Il software ha estratto i numeri volumetrici e densitometrici dalla distribuzione dei valori di grigio dell'immagine segmentata: il VOI come regione circolare attraverso l'osso difettoso, di ~3 mm di diametro. I dati sono stati calcolati nel volume osseo in funzione del tipo di topo e del gruppo biologico.

Analisi statistica

Tutti i dati sono stati espressi come medie e deviazioni standard (media \pm SD). La significatività statistica delle differenze tra gruppi di controllo e di trattamento è stata analizzata con ANOVA ad una via, usando il test di Tukey come procedura post hoc; in tutti i casi, una probabilità di errore (p) minore di 0.05 è stata scelta come criterio per la significatività statistica. I grafici sono stati ottenuti usando GraphPad Prism (versione 5.0 per Windows).

RISULTATI

Effetto del PDRN sulla vitalità cellulare

Il saggio di vitalità MTT ha evidenziato che, in seguito al trattamento con desametasone per 24 ore, la vitalità cellulare degli osteoblasti (Figura 1), delle bone marrow cells (Figura 2) e degli osteociti (Figura 3) si riduceva rispetto alle cellule controllo rispettivamente del 30%, 35% e 20%, dimostrando quindi che questo glucocorticoide è in grado di indurre l'apoptosi delle cellule coinvolte nel processo di formazione di nuova matrice ossea. Al contrario, il trattamento con PDRN alle tre dosi testate, da solo o in associazione con HMWHA o LMWHA, causava un aumento della vitalità cellulare, riportando valori simili a quelli delle cellule controllo.

Il PDRN promuove il differenziamento e la proliferazione degli osteoblasti e delle bone marrow cells.

Al termine dell'esperimento, è stata eseguita l'analisi di espressione genica, tramite real-time-PCR dei geni target del processo di proliferazione e differenziamento degli osteoblasti primari (Figura 4) e delle bone marrow cells (Figura 5); in particolare è stata valutata l'espressione di OPG, osteocalcina, RUNX-2, BMP6, Collagene di tipo I e bone ALP. Dai dati ottenuti in entrambi i tipi cellulari è stato evidenziato che il trattamento per 24h con desametasone alla dose di 1 μ M ha provocato una riduzione statisticamente significativa

dell'espressione dei geni target sopra citati rispetto alle cellule controllo; al contrario, il trattamento con solo il PDRN ha incrementato in maniera significativa l'espressione genica di tutti i target valutati, a tutte le dosi testate ma in particolare alla dose di 1 uM. Gli osteoblasti primari sono stati inoltre trattati con PDRN in combinazione con HMWHA o LMWHA; i risultati mostrano che le combinazioni hanno aumentato l'espressione dei geni target alla sola dose di 1uM, seppur in maniera non statisticamente significativa, mentre non ne ha modificato l'espressione alle altre due dosi testate. Infine, il trattamento con 1uM di PDRN in combinazione con ZM241385 alla dose di 1uM non ha modificato l'espressione dei geni target rispetto alle cellule trattate con desametasone, suggerendo quindi che il PDRN può stimolare il processo di formazione di nuova matrice ossea mediante la stimolazione del recettore adenosinico A2A.

Analoghi risultati sono stati ottenuti dalla valutazione dell'espressione proteica del Collagene di tipo I, della b-ALP, di RUNX-2 e BMP6 mediante Western Blot nelle colture primarie di osteoblasti (Figura 6). In particolare, il trattamento con desametasone riduceva significativamente i livelli delle proteine target rispetto alle cellule non trattate, al contrario le cellule trattate con PDRN mostravano un marcato incremento dell'espressione di queste proteine a tutte le dosi testate ma con particolare efficacia alla dose di 1uM. L'inibizione da parte dello ZM241385 ha invece causato una riduzione dei livelli di espressione delle proteine rispetto alle cellule trattate con PDRN.

Il PDRN riduce le citochine pro-infiammatorie stimulate durante il processo osteoporotico in osteoblasti primari e nelle bone marrow cells

L'espressione delle citochine pro-infiammatorie, TNF α , IL-6 e IL-1 β è stata valutata tramite RTqPCR nelle colture primarie di osteoblasti (Figura 7) e delle bone marrow cells (Figura 8). In seguito al trattamento con desametasone, l'espressione genica di TNF- α , IL-6 e IL-1 β risulta significativamente aumentata rispetto alle cellule controllo; la co-incubazione con il PDRN ha indotto una marcata riduzione dell'espressione delle citochine pro-infiammatorie a tutte le dosi testate, ma con particolare efficacia alla dose di 1 μ M. Nelle cellule trattate con PDRN in associazione con ZM241385 l'espressione dei geni valutati era analoga a quella riscontrata nelle cellule trattate con solo desametasone, a causa dell'inibizione del recettore A2a.

Il PDRN stimola il pathway Wnt/ β -catenin attraverso la stimolazione del recettore A2A, in osteoblasti primari e nelle bone marrow cells

Per dimostrare il coinvolgimento della via di segnale Wnt/ β -catenin, è stata valutata mediante RTqPCR l'espressione genica di Wnt5a, Wnt10b, β -catenina e DKK-1. Negli osteoblasti primari (Figura 9) e nelle bone marrow cells (Figura 10) trattate con desametasone si osserva una riduzione statisticamente significativa dell'espressione genica di Wnt5a, Wnt10b e β -catenina rispetto alle cellule controllo, mentre si evidenzia un incremento significativo dell'espressione genica di DKK-1. Al contrario il trattamento con 1 μ M di PDRN

aumenta in maniera significativa l'espressione delle due proteine Wnt valutate e della β -catenina, riducendo invece marcatamente l'espressione del gene che codifica per DKK-1 rispetto alle cellule trattate con solo desametasone. Nelle colture primarie di osteoblasti invece, il trattamento con PDRN associato ad HMWHA o LMWHA non ha modificato in maniera significativa l'espressione dei geni target. Infine, il trattamento combinato di PDRN alla dose di 1 μ M e di ZM241385 riporta l'espressione genica di Wnt5a, Wnt10b, β -catenina e DKK1 ai valori osservati nelle cellule trattate con solo desametasone.

Sono stati inoltre valutati mediante Western Blot i livelli di espressione delle proteine coinvolte nel pathway Wnt/ β -catenin nelle colture primarie di osteoblasti (Figura 11); i risultati ottenuti mostravano una riduzione dei livelli proteici di Wnt5a, Wnt10b e β -catenina e un aumento statisticamente significativi nelle cellule trattate per 24h con desametasone rispetto alle cellule controllo; al contrario il PDRN alla dose di 1 μ M provocava un incremento dell'espressione di Wnt5a, Wnt10b e β -catenina e una riduzione dei livelli di DKK-1 in maniera statisticamente significativa rispetto alle cellule trattate con solo desametasone. Infine, il trattamento con l'inibitore ZM241385 ha riportato i valori di espressione delle proteine analizzata ai livelli proteici osservati in seguito al trattamento con solo desametasone.

Il PDRN riduce l'espressione dei geni target del riassorbimento osseo in osteoclasti primari

Una volta terminati i trattamenti, è stata valutata mediante RTqPCR l'espressione dei geni che codificano per la catepsina, NFAT e Trap, coinvolti nel processo di riassorbimento osseo (Figura 12). Gli osteoclasti primari trattati con desametasone mostravano un aumento statisticamente significativo dell'espressione genica di catepsina, NFAT e Trap rispetto alle cellule non trattate. Al contrario, il PDRN alla dose di 1 μ M ha ridotto in maniera marcata l'espressione dei geni target del riassorbimento osseo rispetto alle cellule trattate con solo desametasone. Le cellule trattate PDRN e ZM241385 mostravano infine livelli di espressione simili a quelli osservati nelle cellule trattate con desametasone.

I livelli di espressione di catepsina e NFAT sono stati valutati anche mediante western Blot (Figura 13) e i risultati ottenuti sono pressochè analoghi a quelli ottenuti mediante RTqPCR.

Effetti del PDRN sul pathway di Wnt/ β -catenin e sulla proliferazione nella linea cellulare MLO-A5

È stata inoltre valutata tramite RTqPCR l'espressione dei geni coinvolti nel processo di proliferazione cellulare, SOST, e nella via di segnale Wnt/ β -catenin nella linea cellulare di osteociti MLO-A5 (Figura 14). In seguito al trattamento con desametasone, l'espressione dei geni che codificano per Wnt5a e β -catenina

risultava significativamente ridotta rispetto alle cellule controllo; al contrario le cellule trattate con PDRN mostravano una riduzione statisticamente significativa dell'espressione dei geni SOST e DKK-1 rispetto alle cellule trattate con desametasone. Risultati analoghi sono stati ottenuti dalla valutazione dell'espressione proteica di Wnt5a, β -catenina, sclerostina e DKK-1 (Figura 15).

Valutazione della Bone Mineral Density

I risultati sulla densitometria ossea ottenuti mediante microTC mostrano una riduzione della BMD dei femori nei gruppi di topi *wild type* e A2AKO trattati con desametasone ($0,231 \pm 0,07$ e $0,215 \pm 0,013$ rispettivamente) rispetto ai gruppi di animali controllo. ($0,329 \pm 0,015$ e $0,334 \pm 0,021$ rispettivamente) (Figura 16). In particolare la somministrazione giornaliera di desametasone ha ridotto in maniera più marcata la densità minerale ossea nel gruppo di topi A2AKO rispetto al gruppo C57BL/6, dimostrando un coinvolgimento del recettore adenosinico A2A nello sviluppo della condizione osteoporotica.

Valutazione ex vivo mediante microTC

L'analisi eseguita mediante microTC sui femori ha evidenziato un'alterazione significativa di diversi parametri; in particolare, il rapporto medio Bv/Tv (volume osseo/volume del tessuto) risultava alterato nei femori dei topi C57BL/6 (Figura 17) e A2AKO (Figura 18) trattati con desametasone ($43,76 \pm 1,87$ e $33,45 \pm 4,68$ rispettivamente) rispetto ai gruppi controllo ($69,23 \pm 2,34$ e

71 ± 3,45). La stessa alterazione è stata osservata a livello dello spessore trabecolare; nello specifico i topi C57BL/6 del gruppo controllo mostravano uno spessore di 0,157 ± 0,08 contro 0,107 ± 0,009 dei topi C57BL/6 trattati con desametasone, mentre il gruppo controllo A2AKO mostravano uno spessore di 0,160 ± 0,03 contro 0,106 ± 0,01 rispetto al gruppo A2AKO trattato (Figura 19).

DISCUSSIONE

L'osteoporosi è una condizione patologica cronico-progressiva molto diffusa nella popolazione, caratterizzata da alterazione della microarchitettura del tessuto osseo con diminuzione della massa ossea e conseguente suscettibilità alle fratture. La patogenesi della malattia risiede principalmente in un alterato processo di rimodellamento osseo, caratterizzato da uno squilibrio fra l'azione degli osteoblasti e degli osteoclasti; anche gli osteociti all'interno della matrice ossea sono coinvolti nella regolazione del rimodellamento osseo, così come le cellule del rivestimento osseo che coprono la superficie ossea e l'afflusso di sangue capillare (*Kular et al., 2012*).

I farmaci attualmente in uso per il trattamento dell'osteoporosi secondaria hanno come obiettivo principale la riduzione del riassorbimento osseo; sono poche invece le molecole che agiscono sul processo di formazione ossea. Numerosi studi sono infatti focalizzati sulla ricerca di nuove molecole in grado di stimolare le diverse vie di segnale coinvolte nel processo di formazione ossea.

Un ruolo fondamentale nel rimodellamento osseo sembra essere svolto dai recettori adenosinici in generale, ma in particolare dal recettore A2A. *Mediero et al., (2015, 2018)* in diversi studi sperimentali *in vivo*, hanno dimostrato che la stimolazione del recettore A2A, ad opera degli agonisti CGS21608 e Dipiridamole, è in grado di stimolare l'espressione di geni chiave per la formazione ossea, come osteocalcina e osteonectina, e di ridurre la proliferazione degli osteoclasti. Gli effetti della stimolazione dell'A2A risultavano invece inibiti in seguito all'utilizzo di un antagonista A2A o quando

il recettore adenosinico A_{2A} veniva eliminato. Inoltre studi recenti dimostrano che esiste un crosstalk tra l'attivazione del recettore adenosinico A_{2A} e la stimolazione del pathway WNT/ β -catenina (*Shaikh et al., 2016*); in particolare, è probabile che gli effetti causati dalla stimolazione del A_{2A} sul processo di formazione ossea siano mediati dalla via di segnale WNT/ β -catenina.

Anche l'acido ialuronico sembra essere coinvolto nel processo di rigenerazione ossea grazie alla sua capacità di stimolare il differenziamento degli osteoblasti mediante l'espressione della proteina BMP-2. Questa stimolazione sembra avvenire per lo più a livello delle cellule dell'osso della mandibola; infatti l'acido ialuronico, soprattutto grazie alle sue caratteristiche di biocompatibilità, biodegradabilità e non immunogenicità, viene generalmente utilizzato come biomateriale per l'ingegneria tissutale nell'ambito dell'Odontoiatria. Al contrario, non esistono evidenze scientifiche certe riguardanti l'azione dell'acido ialuronico sulle cellule dell'osso in condizioni di osteoporosi.

In seguito a queste considerazioni, abbiamo valutato se il PDRN, da solo o in associazione con acido ialuronico fosse in grado di stimolare il pathway di Wnt/ β -catenina, e di conseguenza, la formazione ossea in un modello in vitro di osteoporosi.

Poiché sia la via canonica che la via non canonica di Wnt sembrano essere coinvolte durante l'attivazione di A_{2A}, abbiamo valutato l'espressione di Wnt5a, Wnt10b nelle colture di osteoblasti primari. È stato dimostrato che Wnt10b è un attivatore canonico Wnt/ β -catenina necessario per il mantenimento osseo: infatti, i topi che presentano una upregolazione di Wnt10b nel midollo osseo mantengono intatta la massa ossea durante l'invecchiamento (*Rauner et*

al., 2008) mentre topi knock out per Wnt10b mostrano una perdita ossea dipendente dall'età (*Stevens et al.*, 2010); l'attivazione della via non canonica da parte di Wnt5a influenza positivamente la formazione ossea (*Okamoto et al.*, 2014). Gli effetti positivi del PDRN sulla stimolazione di Wnt5a e Wnt10b erano già stati valutati in uno studio sperimentale *in vivo* (*Pizzino et al.*, 2017); i risultati ottenuti nel modello sperimentale *in vitro* di osteoporosi utilizzato nel nostro studio confermano la capacità del PDRN di stimolare l'espressione di Wnt5a e Wnt10b; in particolare l'espressione delle proteine Wnts è stata valutata in colture primarie di osteoblasti, bone marrow cells e nella linea cellulare osteocitica MLO-A5. In tutte le linee cellulari utilizzate, il PDRN è stato in grado di stimolare la via canonica e non canonica di Wnt; al contrario la combinazione del PDRN con l'acido ialuronico non è risultata efficace nell'indurre questa via di segnale, probabilmente perché l'acido ialuronico agisce attraverso altri pathway, come quello delle proteine BMPs. Lo stesso studio *in vivo* (*Pizzino et al.*, 2017) aveva inoltre preso in esame anche l'espressione della β -catenina, molecola effettrice del pathway di Wnt; infatti, una volta attivata la via canonica, la β -catenina trasloca nel nucleo agendo da fattore di trascrizione e promuovendo l'espressione dei geni coinvolti nel processo di formazione ossea, come RUNX-2, osteocalcina, collagene di tipo I. I risultati ottenuti dallo studio *in vivo* di *Pizzino et al.* indicavano che il PDRN non è stato in grado di aumentare l'espressione genica della β -catenina; al contrario i nostri studi condotti su osteoblasti primari, bone marrow cells e osteociti MLO-A5 hanno dimostrato che il PDRN *in vitro* è in grado di stimolare sia l'espressione genica che l'espressione proteica della β -catenina, come dimostrato dai risultati ottenuti

mediante RTqPCR e WB. Anche nel caso della β -catenina, il PDRN in combinazione con l'acido ialuronico non ha modificato i livelli di espressione del gene che codifica per questa proteina, confermando quindi che probabilmente l'acido ialuronico non è in grado di stimolare la via di segnale Wnt/ β -catenina.

Per confermare i risultati ottenuti, è stata valutata anche l'espressione di due inibitori del pathway, DKK-1 e sclerostina, nelle colture primarie di osteoblasti, bone marrow cells e osteociti; anche in questo caso il PDRN è stato in grado di ridurre l'espressione di queste due proteine, che risultava invece aumentata in seguito a stimolazione con il glucocorticoide.

Il crosstalk tra recettore adenosinico e il pathway di Wnt è stato già dimostrato in diversi studi sperimentali *in vivo e in vitro* (Mediero *et al.*, 2018; Borhani *et al.*, 2019); i risultati di questi studi dimostrano che il CGS21680 è in grado di stimolare la traslocazione della β -catenina nel nucleo in condizioni normali. I nostri risultati dimostrano invece per la prima volta che l'attivazione del recettore A2A è in grado di indurre il pathway di Wnt/ β -catenina in condizioni di osteoporosi secondaria indotta da glucocorticoidi.

Mediero *et al.* (2015) hanno dimostrato che l'attivazione dell'A2Ar stimola la formazione ossea probabilmente attraverso due meccanismi; dimostrati in questo studio *in vivo* in cui il CGS21680 induce l'espressione di osteocalcina, osteonectina, OPG e ALP. I risultati da noi ottenuti *in vitro* confermano che il PDRN aumenta l'espressione di OPG, osteocalcina, RUNX-2, BMP-6, Coll1a1 e bone-ALP, suggerendo quindi che il recettore A2A è in grado di stimolare la

formazione ossea in condizioni normali e in seguito alla somministrazione di glucocorticoidi sia *in vivo* che *in vitro*.

Il secondo meccanismo prevede l'inibizione della differenziazione e della funzione degli osteoclasti sia *in vivo* che *in vitro* (Mediero et al., 2012). Anche i nostri risultati ottenuti su osteoclasti primari in presenza di glucocorticoidi dimostrano che il PDRN è in grado di ridurre l'espressione di NFATc1 e catepsina K, confermando quindi l'effetto dell'A2Ar nell'inibizione del riassorbimento osseo. Un'ulteriore conferma è stata fornita dai risultati ottenuti valutando le citochine pro-infiammatorie TNF- α , IL-6 e IL-1 β , la cui espressione risulta aumentata in seguito ad un alterato processo di rimodellamento osseo, come nel caso dell'osteoporosi. Il PDRN, in seguito a stimolazione con desametasone, ha infatti ridotto i livelli delle citochine pro-infiammatorie sostenendo così i risultati ottenuti da Mediero et al. (2012) che dimostrano il coinvolgimento del recettore A2A nella riduzione dei processi osteolitici.

Il ceppo di topi A2AKO disponibili presso la Facility per animali della New York University School of Medicine (NYUSoM) era inbred, pertanto la disponibilità di animali era limitato dal numero di nascite e dai risultati della genotipizzazione. Per questo motivo, i primi cuccioli disponibili sono stati utilizzati per gli esperimenti sotto commentati e a causa dell'inizio del lockdown a marzo 2020, non potendo più accedere ai laboratori e alla Facility della NYU non è stato possibile proseguire gli esperimenti che prevedevano anche la somministrazione del PDRN, dopo induzione dell'osteoporosi.

Per comprendere meglio gli effetti del recettore A2A sul rimodellamento osseo in condizioni simil-osteoporotiche, abbiamo valutato per la prima volta gli effetti del desametasone in un modello *in vivo* utilizzando topi A2AKO e C57BL/6.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che il desametasone, come già dimostrato precedentemente (*Li et al., 2020*), riduce significativamente la densità minerale ossea, lo spessore trabecolare e il rapporto volume osseo/volume tissutale nei topi C57BL/6, mentre per la prima volta è stato dimostrato che anche nei topi A2AKO il desametasone induce un fenotipo osteoporotico ed in questi ultimi topi le alterazioni risultavano più marcate rispetto ai topi del ceppo *wild-type*, confermando i risultati ottenuti dallo studio *in vitro* da noi condotto e dimostrando quindi il ruolo essenziale svolto dal recettore A2A nel rimodellamento osseo in condizioni di osteoporosi da glucocorticoidi.

Grazie a suoi meccanismi d'azione, alla buona tollerabilità da parte di tutte le tipologie dei pazienti osteoporotici (donne in menopausa, anziani, soggetti in terapia cronica con glucocorticoidi o con chemioterapici, etc) e agli scarsi effetti collaterali riconosciuti, il PDRN potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico in grado di promuovere la formazione ossea in condizioni di osteoporosi secondaria indotta da glucocorticoidi

FIGURE E TABELLE

Tabella 1

Primer F CGGCACCTTCCTATTTCTTCT Primer R TCTGGAAATTA ACTTCAGGCAAAC	β -catenina
Primer F CCATGAAGAAGCCCATTGGAATA Primer R GGCCAAAGCCATTAGGAAGAA	Wnt5a
Primer F CAGAACCACCCGTGAGTTAG Primer R GGGAGGGAGTGATCCAGATA	Wnt10b
Primer F GAGGGGAAATTGAGGAAAGC Primer R GGTGCACACCTGACCTTCTT	DKK1
Primer F GCCGGACCTATACAGGACAA Primer R CACGTAGCCCAACATCACAC	Sclerostina
Primer F AAGCAGGAGGGCAATAAGGT Primer R TGCCAGAGTTTGGCTTTAGG	Osteocalcina
Primer F CTCTTCGGGCTTCCTCTATC Primer R CCAACACCGACAGGATCT	BMP6

Primer F GCCGGGAATGATGAGAACTA Primer R GGACCGTCCACTGTCACCTT	RUNX-2
Primer F AGCCCCCAGTCTGTATCCTT Primer R CTCCCTTTGCAGAACTCAGG	Tnf-a
Primer F TCTCCACTCTTCTAGGTTCCCT Primer R TTGGGTCATTTCCACATGC	Colla1
Primer F ATTGCCCTGAAACTCCAAAACC Primer R CCTCTGGTGGCATCTCGTTATC	bALP
Primer F GCCCATCCTCTGTGACTCAT Primer R AGGCCACAGGTATTTTGTCTG	IL-1b
Primer F AGTTGCCTTCTTGGGACTGA Primer R TCCACGATTTCCAGAGAAC	IL-6
Primer F CTGCCTGGGAAGAAGATCAG Primer R TTGTGAAGCTGTGCAGGAAC	OPG
Primer F GGGTCAGTGTGACCGAAGAT Primer R GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA	NFATc1
Primer F CAGCTTCCCAAGATGTGAT Primer R AGCACCAACGAGAGGAGAAA	Catepsina K

Primer F TCCTGGCTCAAAAAGCAGTT Primer R ACATAGCCCACACCGTTCTC	Trap
Primer F AGCCATGTACGTAGCCATCC Primer R CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	β -actina

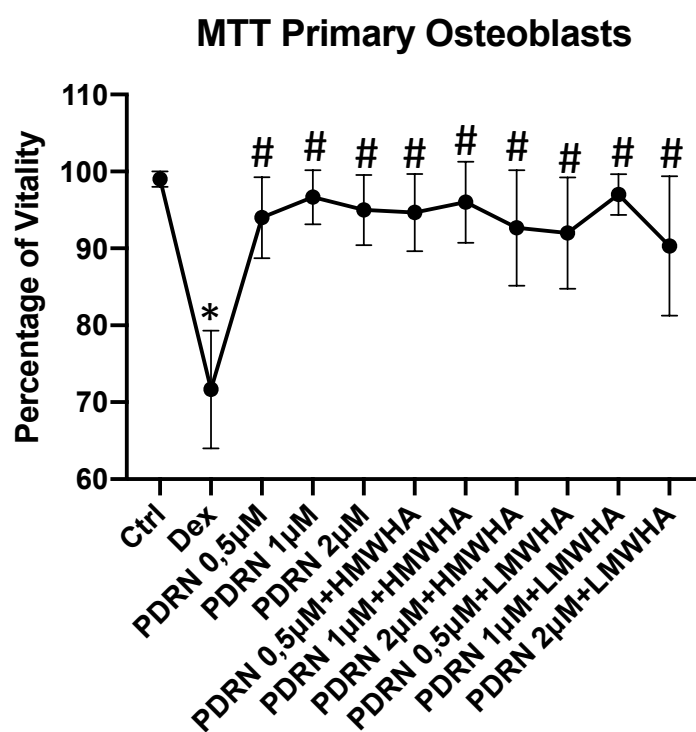


Figura 1

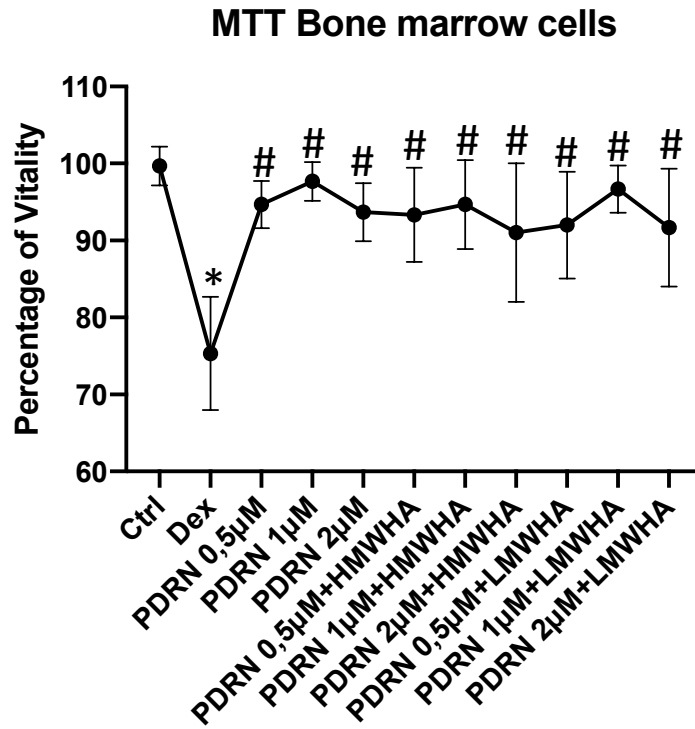


Figura 2

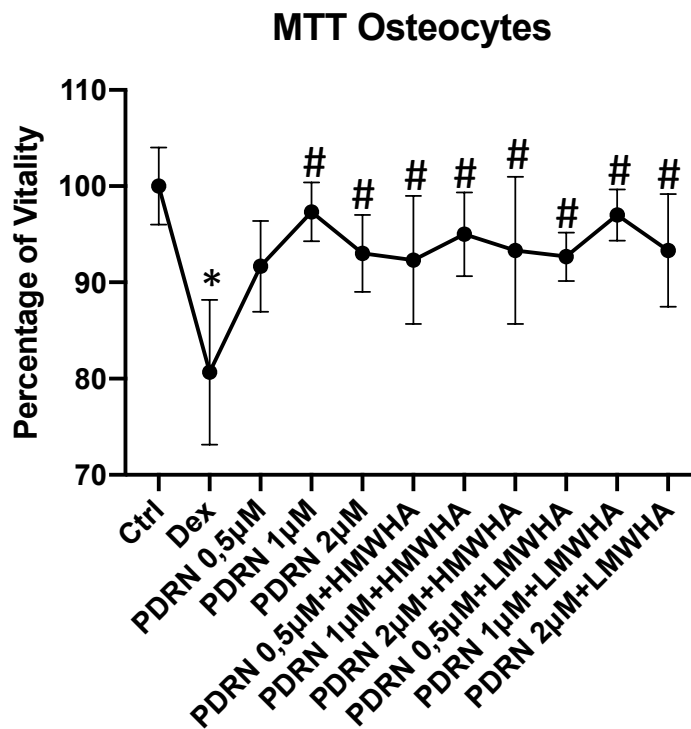
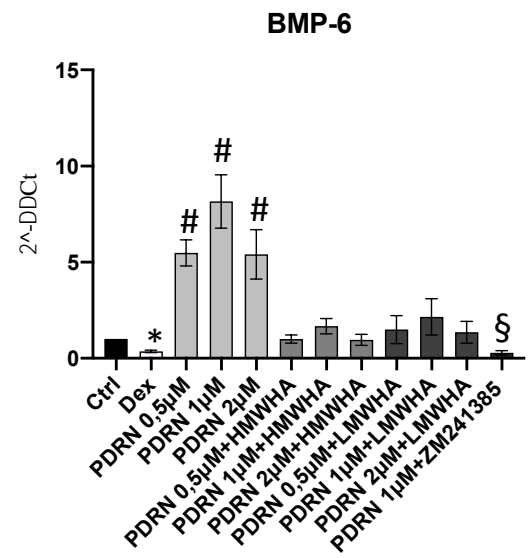
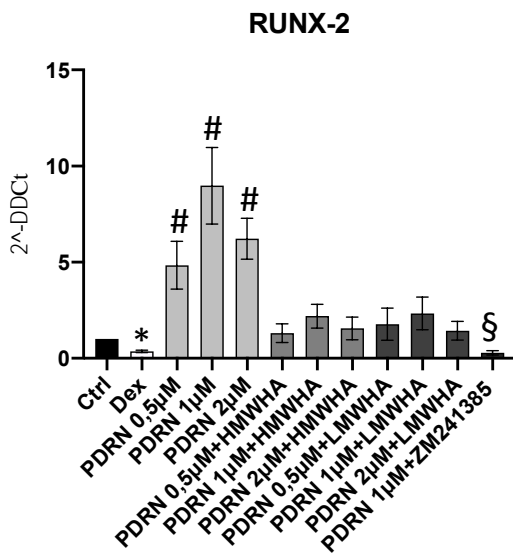
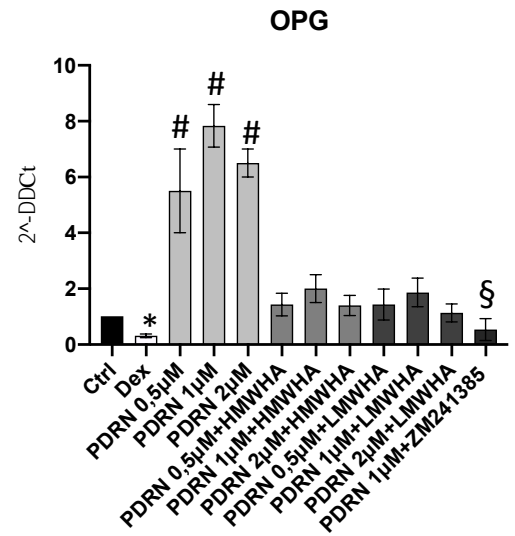
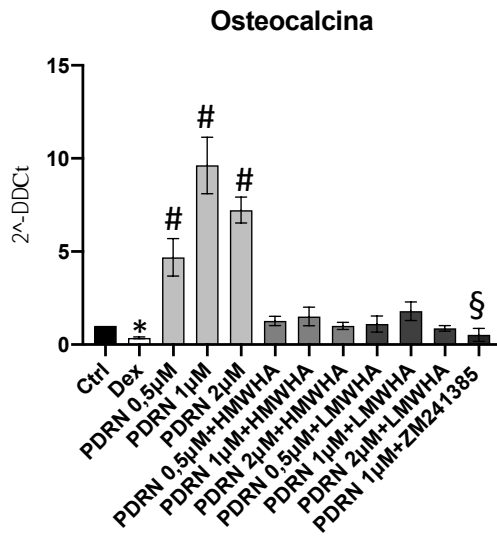


Figura 3



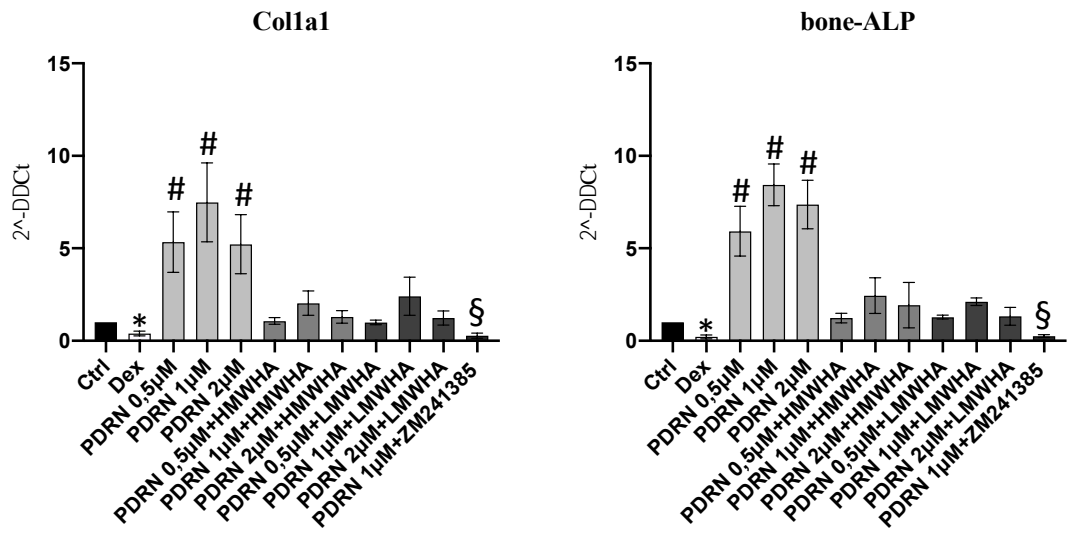
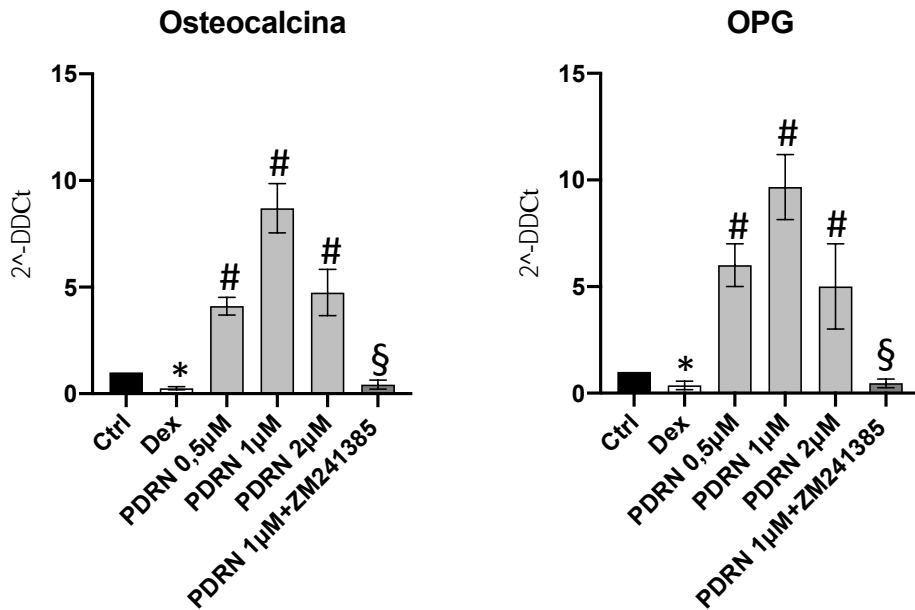


Figura 4

*p<0.0001 vs Ctrl
 #p<0.0001 vs Dex
 §p<0.0001 vs PDRN 1μM



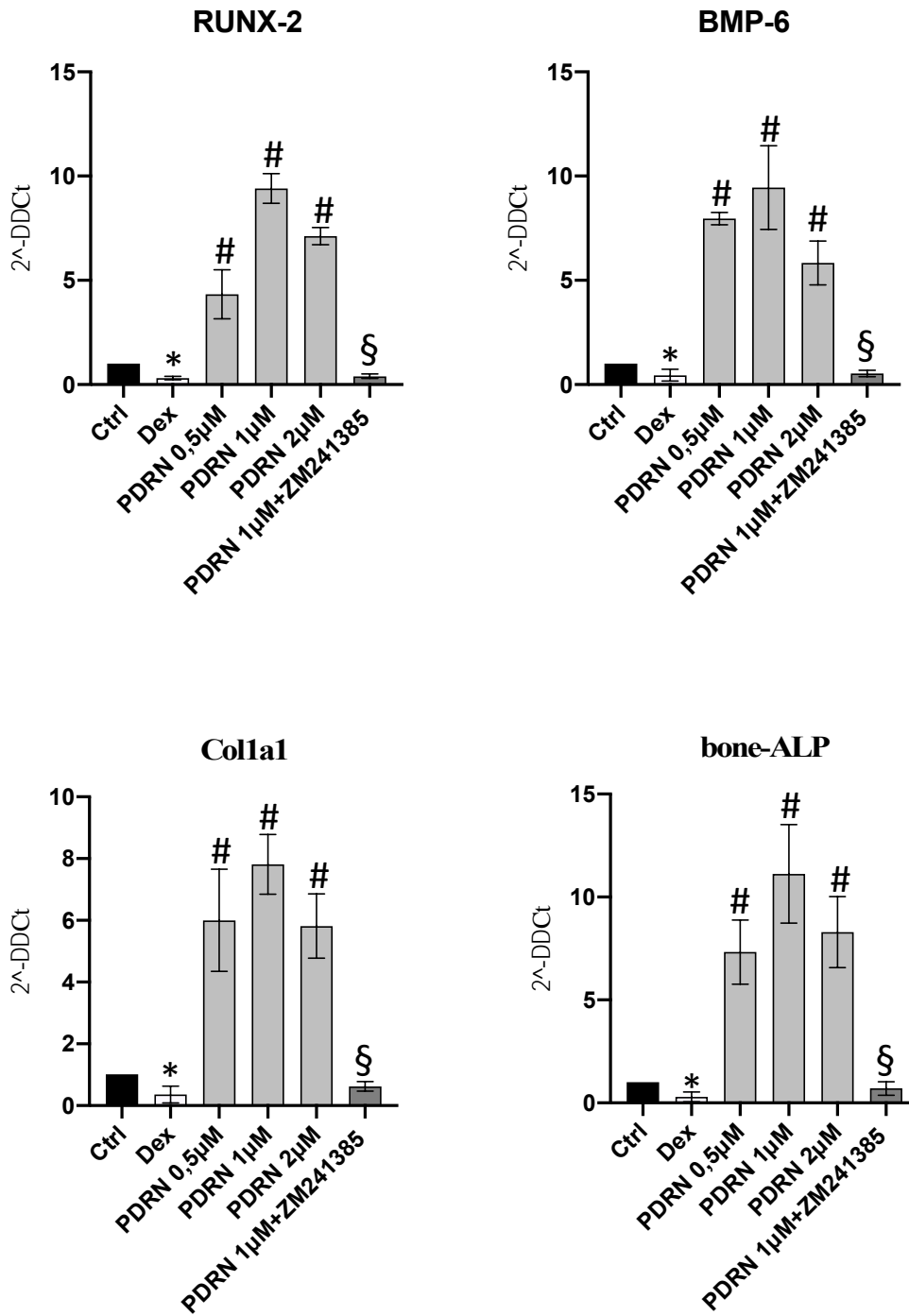


Figura 5

*p<0.0001 vs Ctrl
 #p<0.0001 vs Dex
 §p<0.0001 vs PDRN 1uM

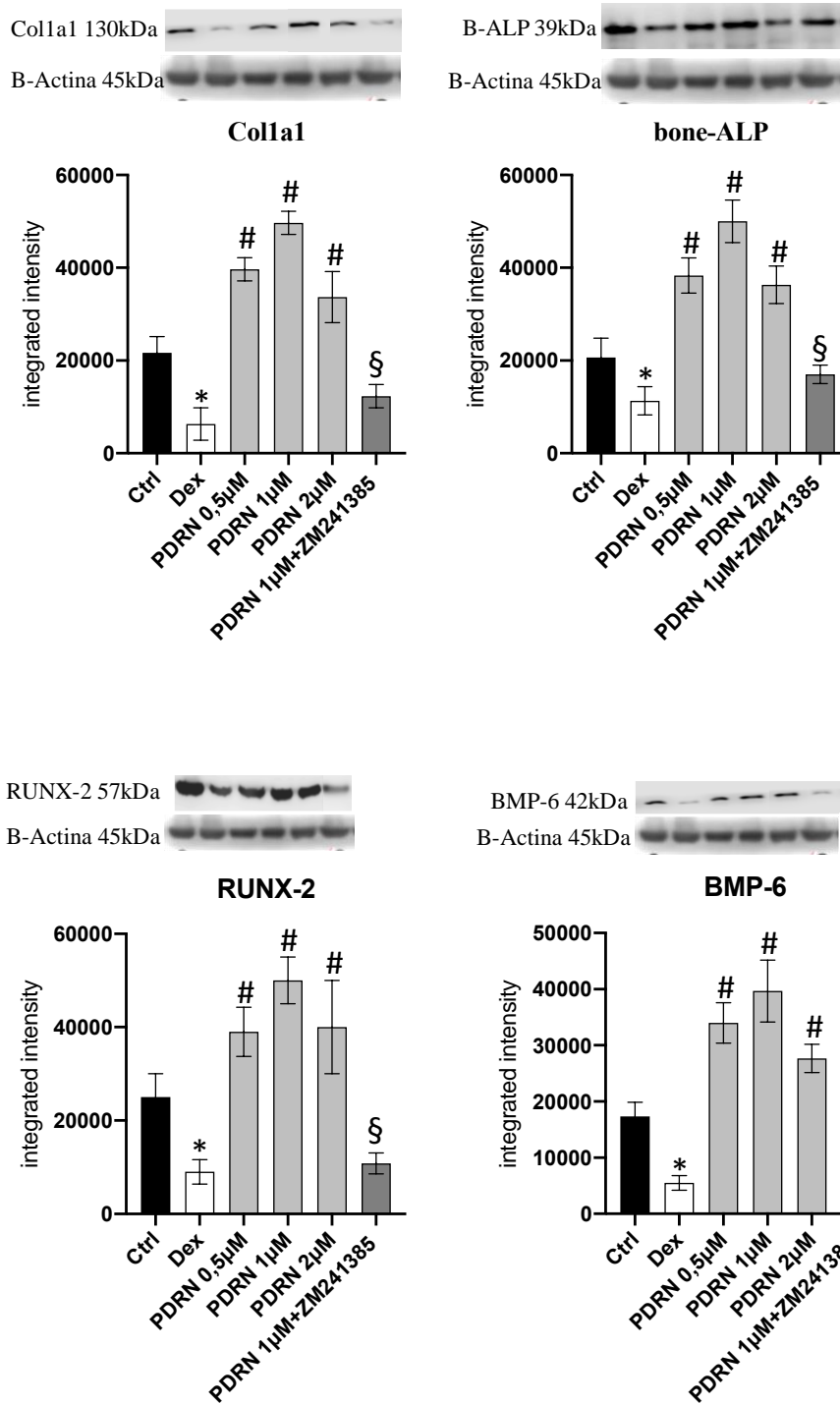


Figura 6

*p<0.0001 vs Ctrl
 #p<0.0001 vs Dex
 §p<0.0001 vs PDRN 1µM

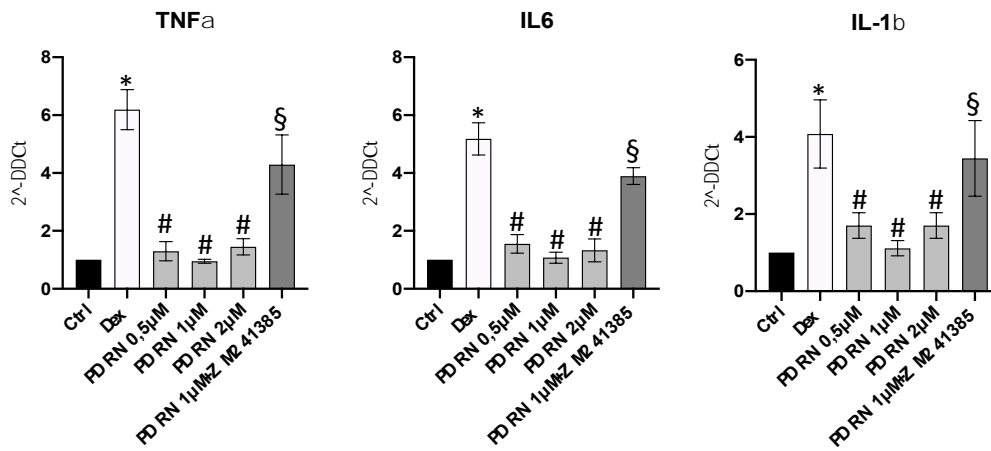


Figura 7

*p<0.0001 vs Ctrl
 #p<0.0001 vs Dex
 §p<0.0001 vs PDRN 1uM

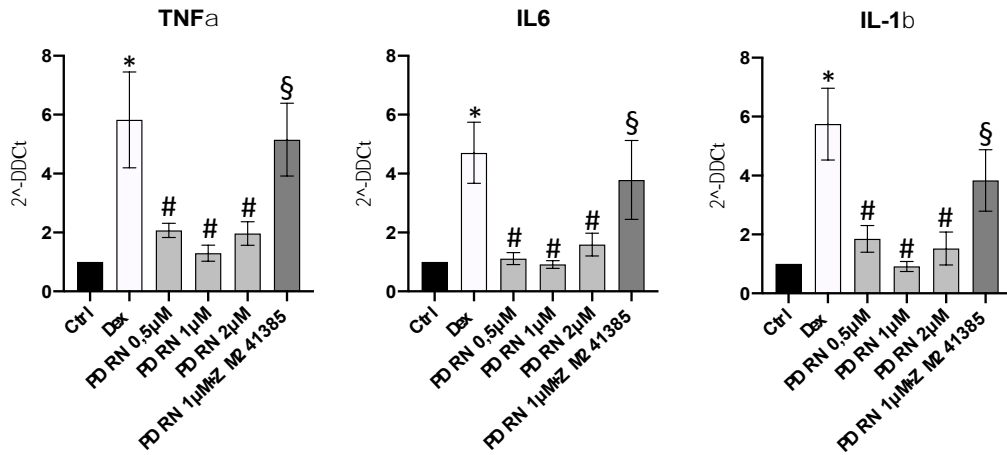


Figura 8

*p<0.0001 vs Ctrl
 #p<0.0001 vs Dex
 §p<0.0001 vs PDRN 1uM

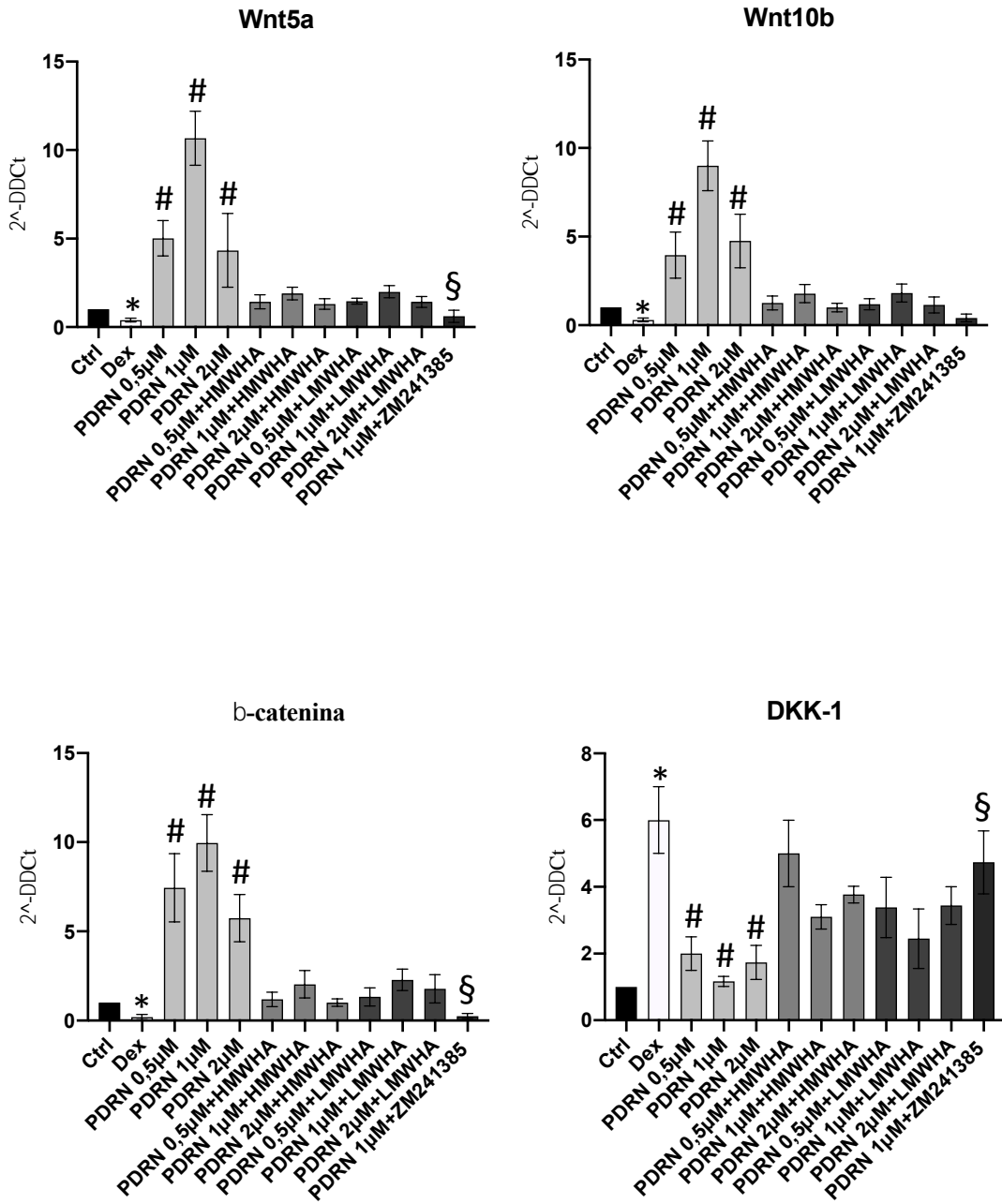


Figura 9

*p<0.0001 vs Ctrl
 #p<0.0001 vs Dex
 §p<0.0001 vs PDRN 1μM

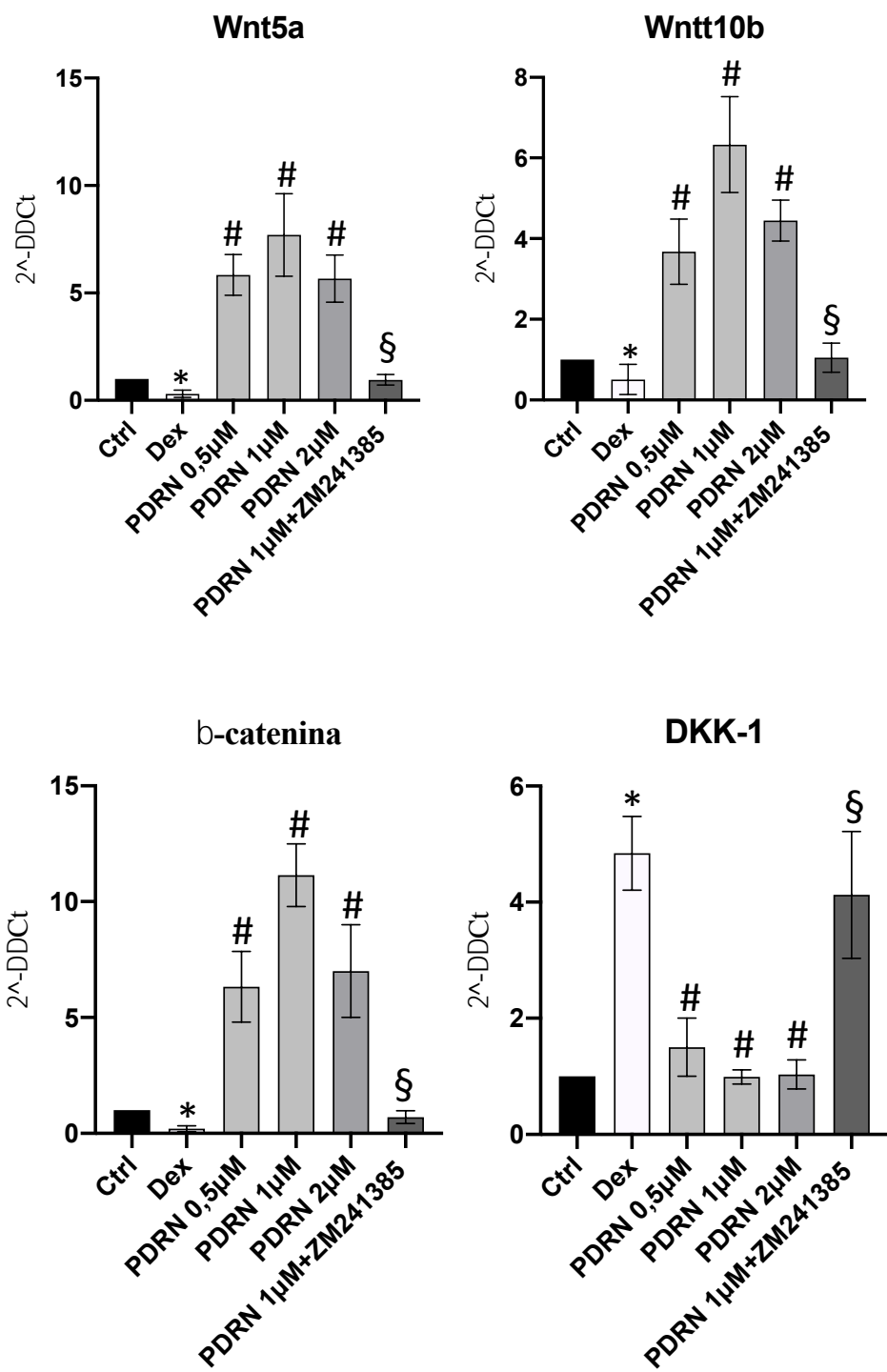


Figura 10

*p<0.0001 vs Ctrl
 #p<0.0001 vs Dex
 §p<0.0001 vs PDRN 1uM

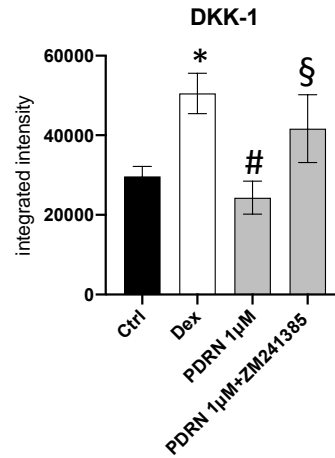
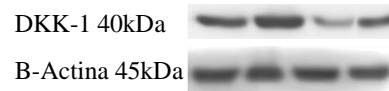
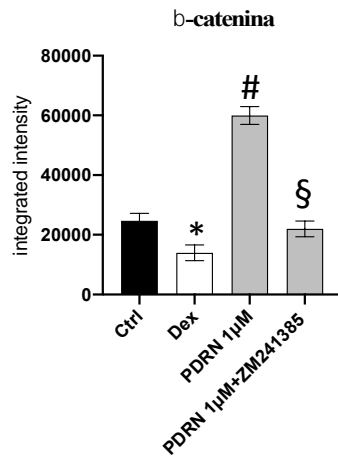
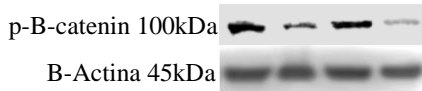
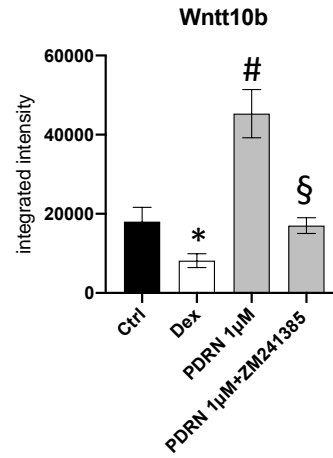
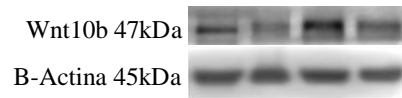
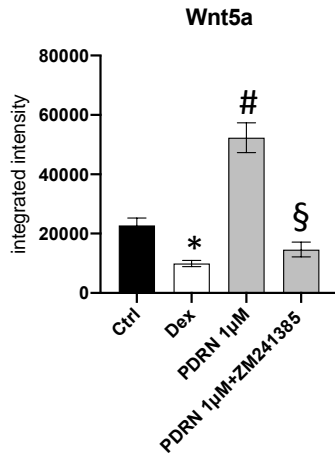
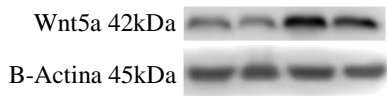


Figura 11

*p<0.0001 vs Ctrl
 #p<0.0001 vs Dex
 §p<0.0001 vs PDRN 1µM

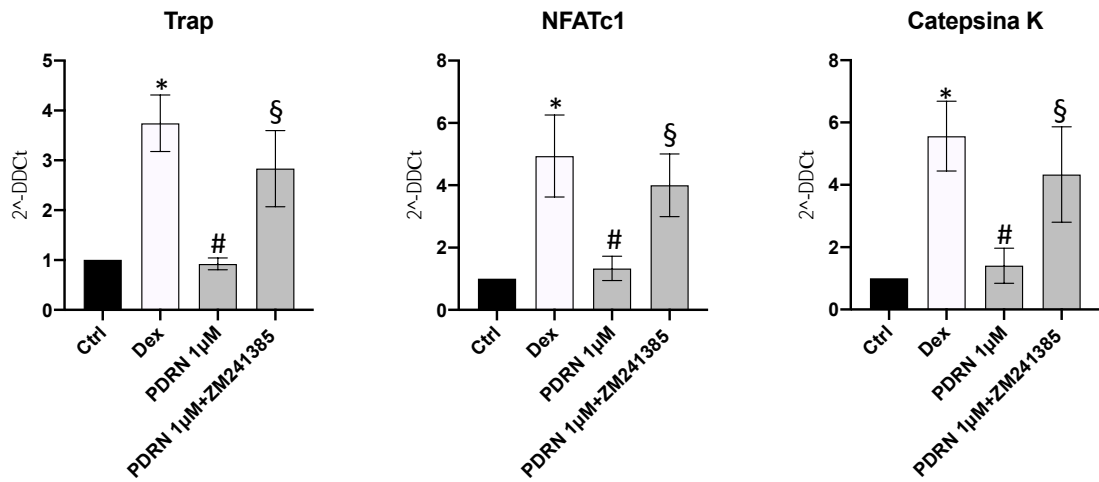


Figura 12

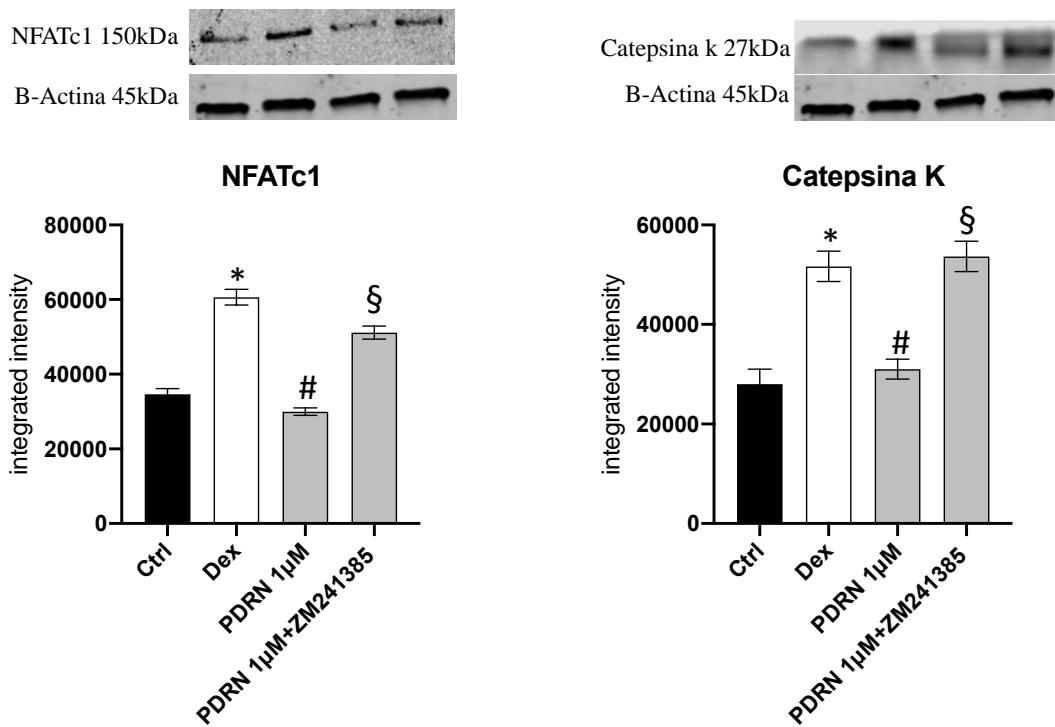


Figura 13

*p<0.0001 vs Ctrl
 #p<0.0001 vs Dex
 §p<0.0001 vs PDRN 1uM

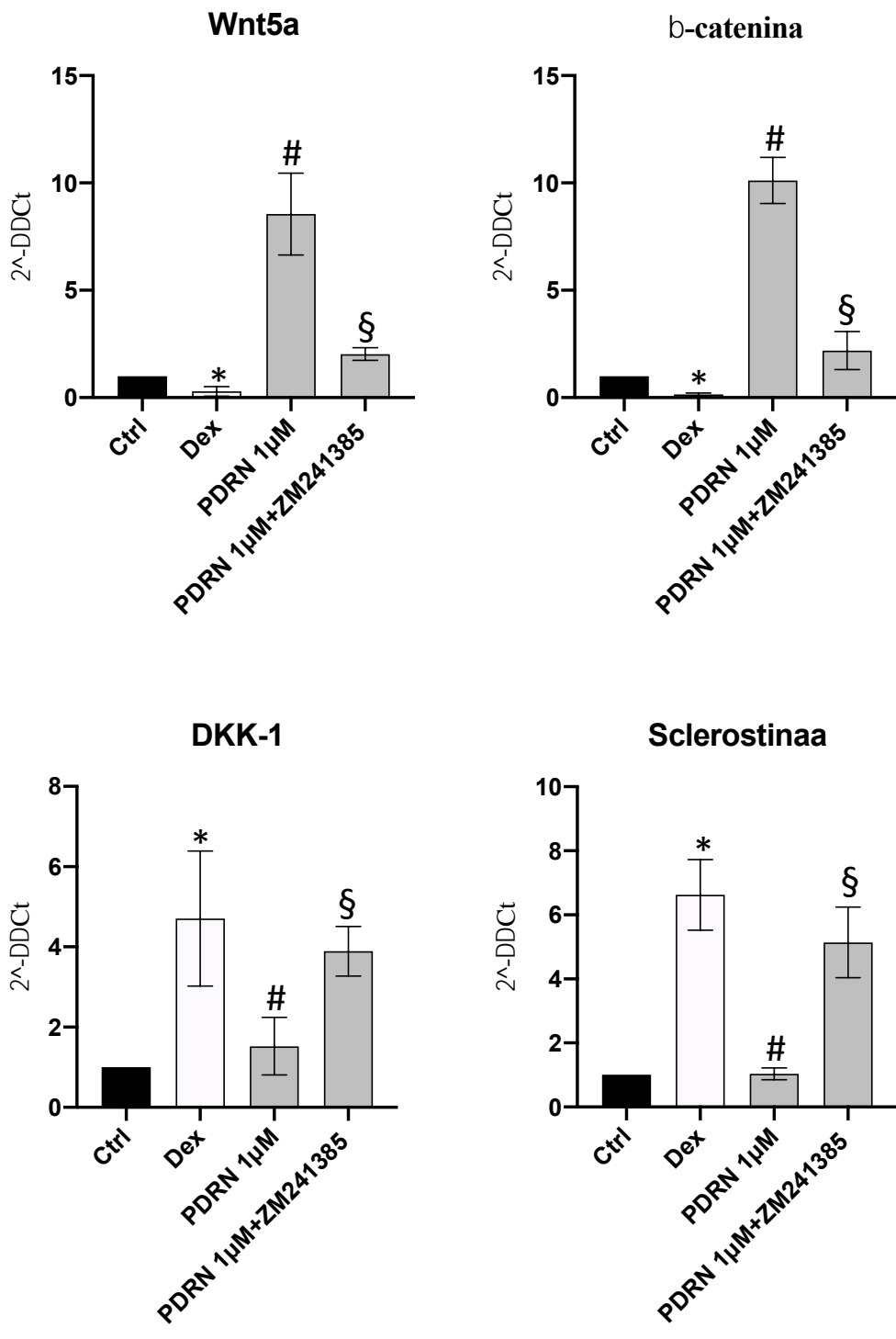


Figura 14

*p<0.0001 vs Ctrl
 #p<0.0001 vs Dex
 §p<0.0001 vs PDRN 1µM

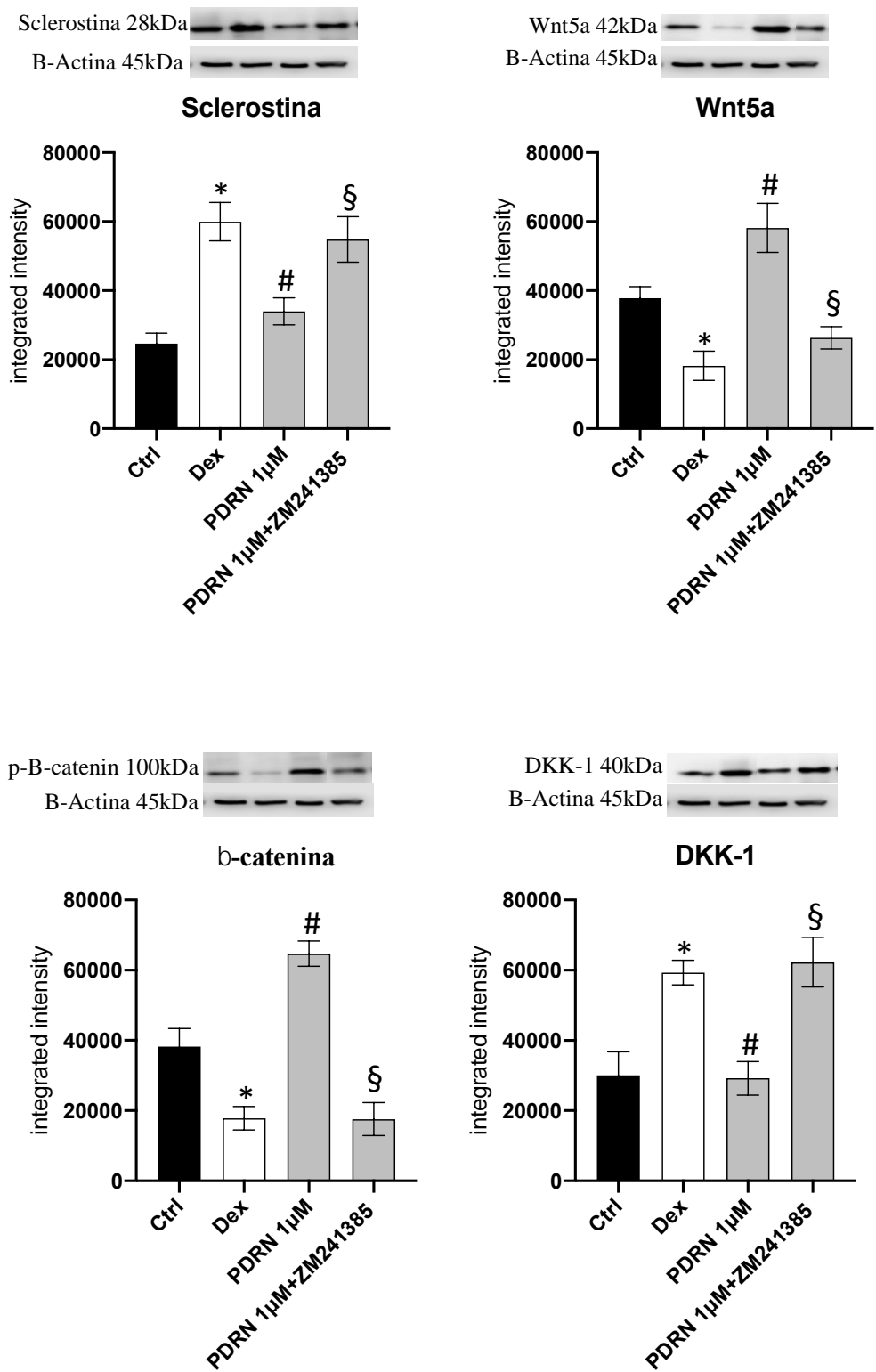


Figura 15

*p<0.0001 vs Ctrl
 #p<0.0001 vs Dex
 §p<0.0001 vs PDRN 1uM

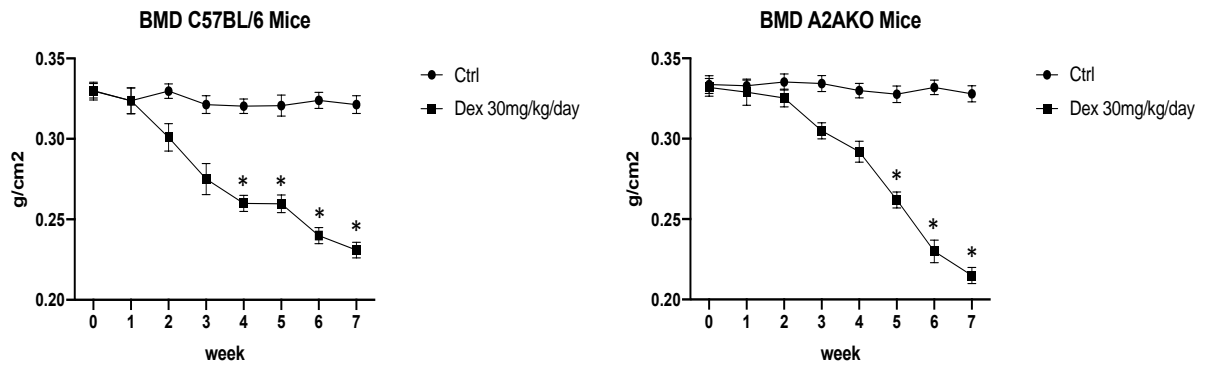


Figura 16

*p<0.0001 vs Ctrl

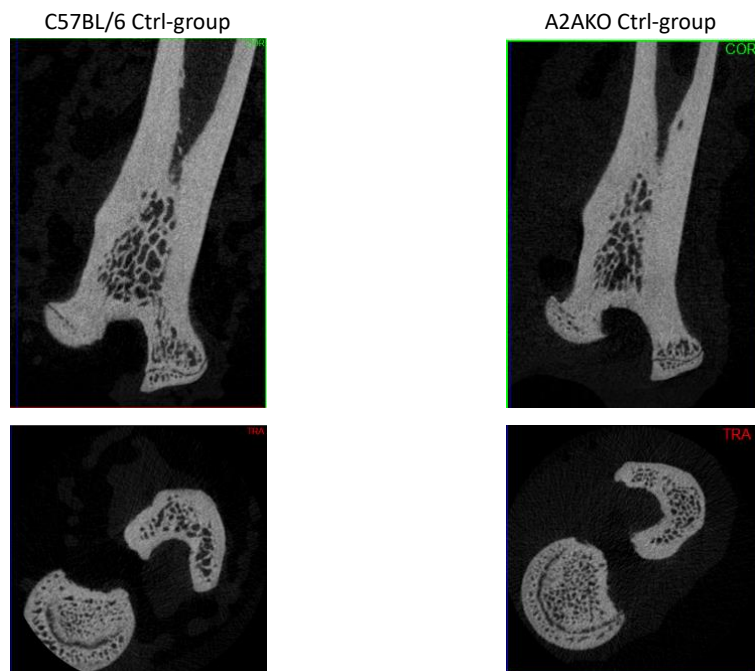


Figura 17

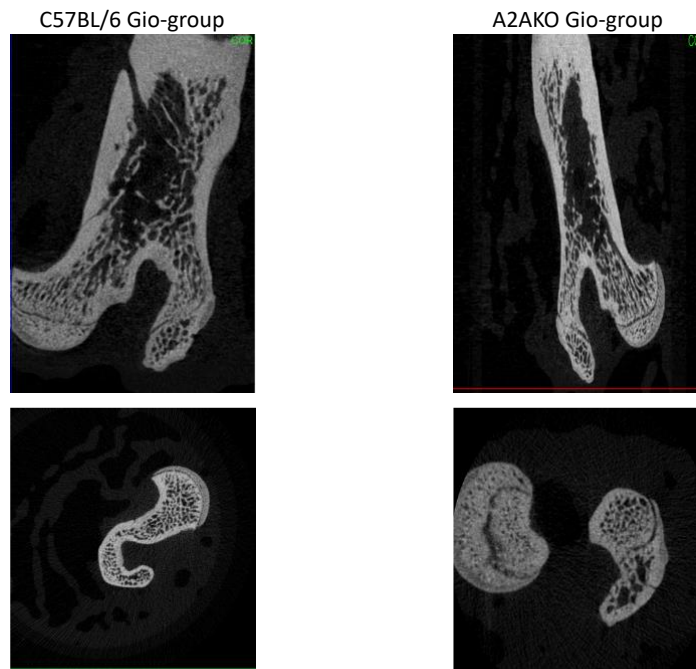


Figura 18

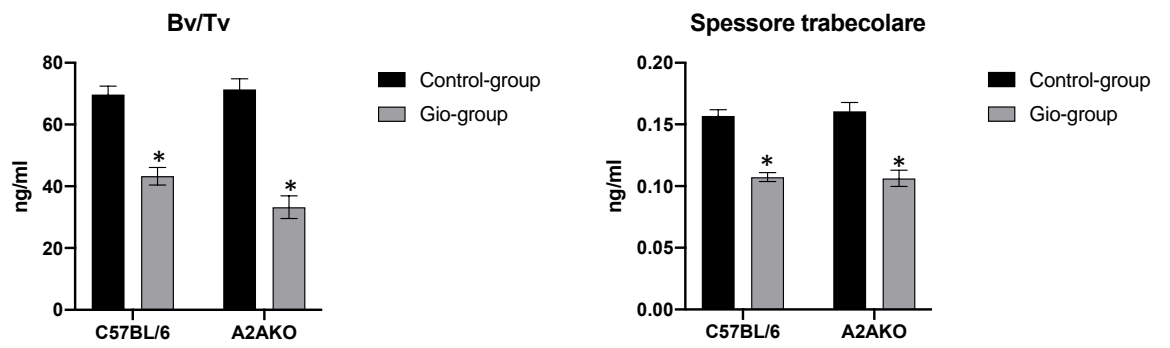


Figura 19

*p<0.0001 vs Ctrl

BIBLIOGRAFIA

- Ahumada A, Slusarski DC, Liu X, Moon RT, Malbon CC, Wang HY. Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP. *Science*. 2002 Dec 6;298(5600):2006-10. doi: 10.1126/science.1073776. PMID: 12471263.

- Altavilla D, Bitto A, Polito F, Marini H, Minutoli L, Di Stefano V, Irrera N, Cattarini G, Squadrito F. Polydeoxyribonucleotide (PDRN): a safe approach to induce therapeutic angiogenesis in peripheral artery occlusive disease and in diabetic foot ulcers. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2009 Oct;7(4):313-21.

- Amiche MA, Abtahi S, Driessen JHM, Vestergaard P, de Vries F, Cadarette SM, Burden AM Impact of cumulative exposure to high-dose oral glucocorticoids on fracture risk in Denmark: a population-based case-control study. *Arch Osteoporos* (2018) 13:30

- Anastasilakis AD, Polyzos SA, Makras P, Aubry-Rozier B, Kaouri S, Lamy O Clinical features of 24 patients with rebound- associated vertebral fractures after denosumab discontinuation: systematic review and additional cases. *J Bone Miner Res* (2017) 32:1291– 1296

- Baek A, Kim M, Kim SH, Cho SR, Kim HJ. Anti-inflammatory Effect of DNA Polymeric Molecules in a Cell Model of Osteoarthritis. *Inflammation*. 2018 Mar;41(2):677-688. doi: 10.1007/s10753-017-0722-2. PMID: 29302765.
- Bai KJ, Spicer AP, Mascarenhas MM, Yu L, Ochoa CD, Garg HG, Quinn DA. The role of hyaluronan synthase 3 in ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jul 1;172(1):92-8. doi: 10.1164/rccm.200405-652OC. Epub 2005 Mar 24. PMID: 15790861; PMCID: PMC2718450.
- Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol*. 2012 Mar;39(3):239-48. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01810.x. Epub 2011 Oct 24. PMID: 22092994.
- Belletti S, Uggeri J, Gatti R, Govoni P, Guizzardi S. Polydeoxyribonucleotide promotes cyclobutane pyrimidine dimer repair in UVB-exposed dermal fibroblasts. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2007 Dec;23(6):242-9.
- Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, Manolagas SC, et al. Chronic elevation of PTH in mice reduces expression of

sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology*. 2005; 146:4577–4583. [PubMed: 16081646]

- Bellido T, Saini V, Divieti Pajevic P. Effects of PTH on osteocyte function. *Bone*. 2012 Sep 24. pii: S8756-3282(12)01245-8. Epub ahead of print. 10.1016/j.bone.2012.09.016
- Bianchini P, Tellini N, Morani AM, Folloni MG. Pharmacological data on polydeoxyribonucleotide of human placenta. *Int J Tissue React*. 1981 Dec;3(3-4):151-4. PMID: 6460689.
- Bitto A, Galeano M, Squadrito F, Minutoli L, Polito F, Dye JF, Clayton EA, Calò M, Venuti FS, Vaccaro M, Altavilla D. Polydeoxyribonucleotide improves angiogenesis and wound healing in experimental thermal injury. *Crit Care Med*. 2008 May;36(5):1594-602. doi: 10.1097/CCM.0b013e318170ab5c. PMID: 18434887.
- Bitto A, Galeano M, Squadrito F, Minutoli L, Polito F, Dye JF, Clayton EA, Calò M, Venuti FS, Vaccaro M, Altavilla D. Polydeoxyribonucleotide improves angiogenesis and wound healing in experimental thermal injury. *Crit Care Med*. 2008 May;36(5):1594-602.

- Bitto A, Oteri G, Pisano M, Polito F, Irrera N, Minutoli L, Squadrito F, Altavilla D. Adenosine receptor stimulation by polynucleotides (PDRN) reduces inflammation in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2013 Jan;40(1):26-32. doi: 10.1111/jcpe.12010. Epub 2012 Oct 3. PMID: 23033941.
- Bitto A, Polito F, Altavilla D, Minutoli L, Migliorato A, Squadrito F. Polydeoxyribonucleotide (PDRN) restores blood flow in an experimental model of peripheral artery occlusive disease. *J Vasc Surg* 2008;48:1292-300
- Bodine PV, Komm BS. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006 Jun;7(1-2):33-9. doi: 10.1007/s11154-006-9002-4. PMID: 16960757.
- Bonewald L. Osteocytes as multifunctional cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006 Oct-Dec;6(4):331-3. PMID: 17185811; PMCID: PMC1796957.
- Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Nov; 1116:281-90. doi: 10.1196/annals.1402.018. Epub 2007 Jul 23. PMID: 17646259.

- Borhani S, Corciulo C, Larranaga-Vera A, Cronstein BN. Adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R) activation triggers Akt signaling and enhances nuclear localization of β -catenin in osteoblasts. *FASEB J.* 2019 Jun;33(6):7555-7562. doi: 10.1096/fj.201900014R. Epub 2019 Mar 13. PMID: 30866652.
- Bowler WB, Buckley KA, Gartland A, Hipskind RA, Bilbe G, Gallagher JA. Extracellular nucleotide signaling: a mechanism for integrating local and systemic responses in the activation of bone remodeling. *Bone.* 2001 May;28(5):507-12. doi: 10.1016/s8756-3282(01)00430-6. PMID: 11344050.
- Boyce BF, Xing L, Chen D. Osteoprotegerin, the bone protector, is a surprising target for beta-catenin signaling. *Cell Metab.* 2005 Dec;2(6):344-5. doi: 10.1016/j.cmet.2005.11.011. PMID: 16330319; PMCID: PMC2647984.
- Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep.* 2007 Sep;5(3):98-104. doi: 10.1007/s11914-007-0024-y. PMID: 17925190.
- Bryan T., MacDonald, Keiko Tamai, and Xi He. M. Kirby Neurobiology Center, Children's Hospital Boston, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA²Department of Genetics, Case Western Reserve

University, Cleveland, OH 44106, USA Wnt/ β -Catenin Signaling:
Components, Mechanisms, and Diseases

- Buffoli B, Favero G, Borsani E, Boninsegna R, Sancassani G, Labanca M, Rezzani R, Nocini PF, Albanese M, Rodella LF. Sodium-DNA for Bone Tissue Regeneration: An Experimental Study in Rat Calvaria. *Biomed Res Int.* 2017; 7320953. doi: 10.1155/2017/7320953. Epub 2017 Sep 10. PMID: 29082254; PMCID: PMC5610838.
- Bultink IE, Baden M, Lems WF. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update on current pharmacotherapy and future directions. *Expert Opin Pharmacother.* 2013 Feb;14(2):185-97. doi: 10.1517/14656566.2013.761975. Epub 2013 Jan 14. PMID: 23317448.
- C. Swanson, M. Lorentzon, H.H. Conaway, U.H. Lerner, Glucocorticoid regulation of osteoclast differentiation and expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappaB in mouse calvarial bones. *Endocrinology* (2006); 147(7), 3613–3622
- Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys.* 2014 Nov 1;561:3-12. doi: 10.1016/j.abb.2014.05.003. Epub 2014 May 14. PMID: 24832390.

- Chappard D, Legrand E, Basle MF, Fromont P, Racineux JL, Rebel A, Audran M. Altered trabecular architecture induced by corticosteroids: a bone histomorphometric study. *J Bone Miner Res.* 1996 May;11(5):676-85. doi: 10.1002/jbmr.5650110516. PMID: 9157783.
- Chen H, Senda T, Kubo KY. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med Mol Morphol.* 2015 Jun;48(2):61-8. doi: 10.1007/s00795-015-0099-y. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25791218.
- Chen Y, Alman BA. Wnt pathway, an essential role in bone regeneration. *J Cell Biochem.* 2009 Feb 15;106(3):353-62. doi: 10.1002/jcb.22020. PMID: 19127541.
- Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V, Lyons KM. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):84-8. doi: 10.1038/83810. PMID: 11138004.
- Dechert TA, Ducale AE, Ward SI, Yager DR. Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound Repair Regen.* 2006 May-Jun;14(3):252-8. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00119.x>

- Dovo A, Perazzolo L, Saba L, Termine A, Capobianco M, Bertolotto A, Angeli A. High-dose glucocorticoids increase serum levels of soluble IL-6 receptor alpha and its ratio to soluble gp130: an additional mechanism for early increased bone resorption. *Eur J Endocrinol* (2006); 154:745–751
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747-54. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80257-3. PMID: 9182762.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747-54. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80257-3. PMID: 9182762.
- Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E. Multiple signaling pathways converge on the *Cbfa1/Runx2* transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res*. 2003;44 Suppl 1(Suppl 1):109-16. PMID: 12952183; PMCID: PMC3564252.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update.

Pharmacol Rev. 2011 Mar;63(1):1-34. doi: 10.1124/pr.110.003285.
Epub 2011 Feb 8. PMID: 21303899; PMCID: PMC3061413.

- Galeano M, Bitto A, Altavilla D, Minutoli L, Polito F, Calò M, Lo Cascio P, Stagno d'Alcontres F, Squadrito F. Polydeoxyribonucleotide stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Wound Repair Regen.* 2008 Mar-Apr;16(2):208-17.

- Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem.* 2005 Sep 30;280(39):33132-40. doi: 10.1074/jbc.M500608200. Epub 2005 Jul 25. PMID: 16043491.

- Gennero L, Denysenko T, Calisti GF, Vercelli A, Vercelli CM, Amedeo S, Mioletti S, Parino E, Montanaro M, Melcarne A, Juenemann C, De Vivo E, Longo A, Cavallo G, De Siena R. Protective effects of polydeoxyribonucleotides on cartilage degradation in experimental cultures. *Cell Biochem Funct.* 2013 Apr;31(3):214-27. doi: 10.1002/cbf.2875. Epub 2012 Sep 24. PMID: 23001693.

- Gharibi B, Abraham AA, Ham J, Evans BA. Adenosine receptor subtype expression and activation influence the differentiation of mesenchymal

stem cells to osteoblasts and adipocytes. *J Bone Miner Res.* 2011 Sep;26(9):2112-24. doi: 10.1002/jbmr.424. PMID: 21590734.

- Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 2005 May;8(5):751-64. doi: 10.1016/j.devcel.2005.02.017. PMID: 15866165.
- Grasser WA, Orlic I, Borovecki F, Riccardi KA, Simic P, Vukicevic S, Paralkar VM. BMP-6 exerts its osteoinductive effect through activation of IGF-I and EGF pathways. *Int Orthop.* 2007 Dec;31(6):759-65. doi: 10.1007/s00264-007-0407-9. Epub 2007 Jul 19. PMID: 17634942; PMCID: PMC2266664.
- Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011 Jan 17;3. doi: 10.3402/jom.v3i0.5304. PMID: 21547019; PMCID: PMC3087239.
- Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science.* 1994 Oct 21;266(5184):443-8. doi: 10.1126/science.7939685. PMID: 7939685.

- Guizzardi S, Galli C, Govoni P, Boratto R, Cattarini G, Martini D, Belletti S, Scandroglio R. Polydeoxyribonucleotide (PDRN) promotes human osteoblast proliferation: a new proposal for bone tissue repair. *Life Sci.* 2003 Aug 29;73(15):1973-83. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00547-2. PMID: 12899922.
- Guizzardi, S., Martini, D., Bacchelli, B., Valdatta, L., Thione, A., Scamoni, S., et al. (2007). Effects of heat deproteinate bone and polynucleotides on bone regeneration: an experimental study on rat. *Micron* 38, 722–728. doi: 10.1016/j.micron.2007.05.003
- Hancox NM., Boothroyd B. Electron microscopy of the early stages of osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1965 May-Jun;40:153-61. PMID: 14304706.
- Harada H, Takahashi M. CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J Biol Chem.* 2007 Feb 23;282(8):5597-607. doi: 10.1074/jbc.M608358200. Epub 2006 Dec 14. PMID: 17170110.
- Harrison CA, Al-Musawi SL, Walton KL. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF- β superfamily ligands. *Growth Factors.* 2011 Oct;29(5):174-86. doi: 10.3109/08977194.2011.608666. Epub 2011 Aug 24. PMID: 21864080.

- Hayashi K, Yamaguchi T, Yano S, Kanazawa I, Yamauchi M, Yamamoto M, Sugimoto T. BMP/Wnt antagonists are up- regulated by dexamethasone in osteoblasts and reversed by alendronate and PTH: potential therapeutic targets for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* (2009); 379:261–266
- He W, Mazumder A, Wilder T, Cronstein BN. Adenosine regulates bone metabolism via A1, A2A, and A2B receptors in bone marrow cells from normal humans and patients with multiple myeloma. *FASEB J*. 2013 Sep;27(9):3446-54. doi: 10.1096/fj.13-231233. Epub 2013 May 16. PMID: 23682121; PMCID: PMC3752544.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997 Dec 4;390(6659):465-71. doi: 10.1038/37284. PMID: 9393997.
- Heldin CH, Moustakas A. Role of Smads in TGFβ signaling. *Cell Tissue Res*. 2012 Jan;347(1):21-36. doi: 10.1007/s00441-011-1190-x. Epub 2011 Jun 4. PMID: 21643690.
- Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, Nakamura K, Seiki M, Tanaka S. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-

kappaB ligand. *J Biol Chem*. 2006 Dec 1;281(48):36846-55. doi: 10.1074/jbc.M606656200. Epub 2006 Oct 3. PMID: 17018528.

- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2000 Jan;15(1):2-12. doi: 10.1359/jbmr.2000.15.1.2. PMID: 10646108.
- Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Mar;44(3):469-74. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.013. Epub 2011 Dec 31. PMID: 22226817.
- Hu R, Sharma SM, Bronisz A, Srinivasan R, Sankar U, Ostrowski MC. Eos, MITF, and PU.1 recruit corepressors to osteoclast-specific genes in committed myeloid progenitors. *Mol Cell Biol*. 2007 Jun;27(11):4018-27. doi: 10.1128/MCB.01839-06. Epub 2007 Apr 2. PMID: 17403896; PMCID: PMC1900027.
- Hughes DE, Salter DM, Simpson R. CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res*. 1994 Jan;9(1):39-44. doi: 10.1002/jbmr.5650090106. PMID: 7512306.

- Jacobson KA. Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(193):1-24. doi: 10.1007/978-3-540-89615-9_1. PMID: 19639277; PMCID: PMC3415694.
- Kahler RA, Westendorf JJ. Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. *J Biol Chem.* 2003 Apr 4;278(14):11937-44. doi: 10.1074/jbc.M211443200. Epub 2003 Jan 27. PMID: 12551949.
- Kamioka H, Honjo T, Takano-Yamamoto T. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone.* 2001 Feb;28(2):145-9. doi: 10.1016/s8756-3282(00)00421-x. PMID: 11182371.
- Kara FM, Doty SB, Boskey A, Goldring S, Zaidi M, Fredholm BB, Cronstein BN. Adenosine A(1) receptors regulate bone resorption in mice: adenosine A(1) receptor blockade or deletion increases bone density and prevents ovariectomy-induced bone loss in adenosine A(1) receptor-knockout mice. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb;62(2):534-41. doi: 10.1002/art.27219. PMID: 20112380; PMCID: PMC2853194.
- Karmakar S, Kay J, Gravallesse EM. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheum Dis*

Clin North Am. 2010 May;36(2):385-404. doi:
10.1016/j.rdc.2010.03.003. PMID: 20510240; PMCID: PMC2905601.

- Karsenty G. Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. Semin Cell Dev Biol. 2000 Oct;11(5):343-6. doi:
10.1006/scdb.2000.0188. PMID: 11105898.
- Keller H, Kneissel M. SOST is a target gene for PTH in bone. Bone. 2005 Aug;37(2):148-58. doi: 10.1016/j.bone.2005.03.018. PMID:
15946907.
- Khosla S, Monroe DG. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Jan 2;8(1):a031211. doi:
10.1101/cshperspect.a031211. PMID: 28710257; PMCID:
PMC5749141.
- Kim J, Kim IS, Cho TH, Lee KB, Hwang SJ, Tae G et al. Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. Biomaterials. 2007 Apr;28(10):1830-7. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.050>

- Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium*. 2005 Sep-Oct;38(3-4):439-46. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.022. PMID: 16099039.

- Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci*. 2008 Jan 1; 13:898-903. doi: 10.2741/2730. PMID: 17981598.

- Komori T. Roles of Runx2 in Skeletal Development. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 962:83-93. doi: 10.1007/978-981-10-3233-2_6. PMID: 28299652.

- Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet*. 2000 Jul;16(7):279-83. doi: 10.1016/s0168-9525(00)02028-x. PMID: 10858654.

- Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem*. 2012 Aug;45(12):863-73. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.03.021. Epub 2012 Mar 23. PMID: 22465238.

- Lane JM, Russell L, Khan SN. Osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Mar;(372):139-50. doi: 10.1097/00003086-200003000-00016. PMID: 10738423.

- Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res.* 2008; 23:860–869. [PubMed: 18269310]
- Li XS, Zhang JR, Meng SY, Li Y, Wang RT. Mean platelet volume is negatively associated with bone mineral density in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab.* 2012 Nov;30(6):660-5. doi: 10.1007/s00774-012-0362-4. Epub 2012 Jun 9. PMID: 22684618.
- Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Hassan MQ, Gaur T, Lengner CJ, Young DW. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006 Jun;7(1-2):1-16. doi: 10.1007/s11154-006-9001-5. PMID: 17051438.
- Lian JB, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ, Montecino M, Javed A, Gutierrez S, Shen J, Zaidi SK, Drissi H. Runx2/Cbfa1 functions: diverse regulation of gene transcription by chromatin remodeling and co-regulatory protein interactions. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:141-8. PMID: 12952188.
- Lien WH, Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Dev.* 2014 Jul

15;28(14):1517-32. doi: 10.1101/gad.244772.114. PMID: 25030692;
PMCID: PMC4102759.

- Linden J. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Mol Pharmacol.* 2005 May;67(5):1385-7. doi: 10.1124/mol.105.011783. Epub 2005 Feb 9. PMID: 15703375.
- Liu G, Vijayakumar S, Grumolato L, Arroyave R, Qiao H, Akiri G, Aaronson SA. Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells. *J Cell Biol.* 2009 Apr 6;185(1):67-75. doi: 10.1083/jcb.200810137. PMID: 19349579; PMCID: PMC2700509.
- Liu M, Kurimoto P, Zhang J, Niu QT, Stolina M, Dechow PC, Feng JQ, Hesterman J, Silva MD, Ominsky MS, Richards WG, Ke H, Kostenuik PJ. Sclerostin and DKK1 Inhibition Preserves and Augments Alveolar Bone Volume and Architecture in Rats with Alveolar Bone Loss. *J Dent Res.* 2018 Aug;97(9):1031-1038. doi: 10.1177/0022034518766874. Epub 2018 Apr 4. PMID: 29617179.
- Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013 Jun;19(3):254-63. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0527. Epub 2012 Dec 28. PMID: 23150948; PMCID: PMC3627420.

- Liza J. Raggatt and Nicola C. Partridge. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling Published, JBC Papers in Press 2010, DOI 10.1074/jbc.R109.041087
- Luchin A, Purdom G, Murphy K, Clark MY, Angel N, Cassady AI, Hume DA, Ostrowski MC. The microphthalmia transcription factor regulates expression of the tartrate-resistant acid phosphatase gene during terminal differentiation of osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2000 Mar;15(3):451-60. doi: 10.1359/jbmr.2000.15.3.451. PMID: 10750559.
- Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, Vargo-Gogola TC, Begtrup JL, Peterson TE, Fingleton B, Shirai T, Matrisian LM, Futakuchi M. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell.* 2005 May;7(5):485-96. doi: 10.1016/j.ccr.2005.04.013. PMID: 15894268.
- Ma L, Wang HY. Mitogen-activated protein kinase p38 regulates the Wnt/cyclic GMP/Ca²⁺ non-canonical pathway. *J Biol Chem.* 2007 Sep 28;282(39):28980-90. doi: 10.1074/jbc.M702840200. Epub 2007 Aug 7. PMID: 17684012.
- Makvandi, P.; Ali, G.W.; Sala, F.D.; Abdel-Fattah, W.I.; Borzacchiello, A. Hyaluronic acid/corn silk extract based injectable nanocomposite: A

biomimetic antibacterial scaffold for bone tissue regeneration. *Mat. Sci. Eng. C* 2020, 107, 110195

- McIlwain HH. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Preventive Medicine* 2003; 36 243–249

- Mediero A, Cronstein BN. Adenosine and bone metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2013 Jun;24(6):290-300. doi: 10.1016/j.tem.2013.02.001. Epub 2013 Mar 14. PMID: 23499155; PMCID: PMC3669669.

- Mediero A, Frenkel SR, Wilder T, He W, Mazumder A, Cronstein BN. Adenosine A_{2A} receptor activation prevents wear particle-induced osteolysis. *Sci Transl Med.* 2012 May 23;4(135):135ra65. doi: 10.1126/scitranslmed.3003393. PMID: 22623741; PMCID: PMC3386559.

- Mediero A, Kara FM, Wilder T, Cronstein BN. Adenosine A_{2A} receptor ligation inhibits osteoclast formation. *Am J Pathol.* 2012 Feb;180(2):775-86. doi: 10.1016/j.ajpath. 2011.10.017. Epub 2011 Nov 30. PMID: 22138579; PMCID: PMC3349861.

- Mediero A, Perez-Aso M, Cronstein BN. Activation of adenosine A_{2A} receptor reduces osteoclast formation via PKA- and ERK1/2-mediated

suppression of NF κ B nuclear translocation. *Br J Pharmacol.* 2013 Jul;169(6):1372-88. doi: 10.1111/bph.12227. PMID: 23647065; PMCID: PMC3831714.

- Mediero A, Wilder T, Perez-Aso M, Cronstein BN. Direct or indirect stimulation of adenosine A_{2A} receptors enhances bone regeneration as well as bone morphogenetic protein-2. *FASEB J.* 2015 Apr;29(4):1577-90. doi: 10.1096/fj.14-265066. Epub 2015 Jan 8. PMID: 25573752; PMCID: PMC4396602.

- Mediero A, Wilder T, Shah L, Cronstein BN. Adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R) stimulation modulates expression of semaphorins 4D and 3A, regulators of bone homeostasis. *FASEB J.* 2018 Jul;32(7):3487-3501. doi: 10.1096/fj.201700217R. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29394106; PMCID: PMC5998975.

- Mendes RM, Silva GA, Lima MF, Calliari MV, Almeida AP, Alves JB et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol.* 2008 Dec;53(12):1155-62. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.07.001>

- Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 2006 Apr;4(4):e115. doi: 10.1371/journal.pbio.0040115. Epub 2006 Apr 4. PMID: 16602827; PMCID: PMC1420652.

- Mudano A, Allison J, Hill J, Rothermel T, Saag K. Variations in glucocorticoid induced osteoporosis prevention in a managed care cohort. *J Rheumatol.* 2001 Jun;28(6):1298-305. PMID: 11409123.

- Murphy LL, Hughes CC. Endothelial cells stimulate T cell NFAT nuclear translocation in the presence of cyclosporin A: involvement of the wnt/glycogen synthase kinase-3 beta pathway. *J Immunol.* 2002 Oct 1;169(7):3717-25. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.3717. PMID: 12244165.

- Nagy V, Penninger JM. The RANKL-RANK Story. *Gerontology.* 2015;61(6):534-42. doi: 10.1159/000371845. Epub 2015 Feb 14. PMID: 25720990.

- Nakamura T, Nakamura T, Matsumoto K. The functions and possible significance of Kremen as the gatekeeper of Wnt signalling in development and pathology. *J Cell Mol Med.* 2008 Apr;12(2):391-408. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00201.x. Epub 2007 Dec 14. PMID: 18088386; PMCID: PMC3822531.

- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-hora M, Feng JQ, Bonewald LF, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011; 17:1231–1234. [PubMed: 21909105]
- O'Brien CA, Plotkin LI, Galli C, Goellner J, Gortazar AR, Allen MR, Robling AG, et al. Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PLoS ONE.* 2008; 3:e2942. [PubMed: 18698360]
- Ohnaka K, Tanabe M, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Apr 1;329(1):177-81. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.01.117. PMID: 15721290.
- Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC, Mundlos S, Shibuya H, Takada S, Minami Y. The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells.* 2003 Jul;8(7):645-54. doi: 10.1046/j.1365-2443.2003.00662.x. PMID: 12839624.
- Okamoto M, Udagawa N, Uehara S, Maeda K, Yamashita T, Nakamichi Y, Kato H, Saito N, Minami Y, Takahashi N, Kobayashi Y.

Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ β -catenin signaling during osteoblastogenesis. *Sci Rep.* 2014 Mar 27;4:4493. doi: 10.1038/srep04493. PMID: 24670389; PMCID: PMC3967152.

- Ou L, Fang L, Tang H, Qiao H, Zhang X, Wang Z. Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor 1 regulates the differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Mol Med Rep.* 2016 Jan;13(1):720-30. doi: 10.3892/mmr.2015.4586. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26648540; PMCID: PMC4686056.
- Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol.* 2002 Sep 15;169(6):3353-62. doi: 10.4049/jimmunol.169.6.3353. PMID: 12218157.
- Pasquinelli G, Orrico C, Foroni L, Bonafè F, Carboni M, Guarnieri C et al. Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair. *J Anat.* 2008 Nov;213(5):520-30. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00974.x>

- Patschan D, Loddenkemper K, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone*. 2001 Dec;29(6):498-505. doi: 10.1016/s8756-3282(01)00610-x. PMID: 11728918.
- Pizzino G, Irrera N, Galfo F, Oteri G, Atteritano M, Pallio G, Mannino F, D'Amore A, Pellegrino E, Aliquò F, Anastasi GP, Cutroneo G, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Adenosine Receptor Stimulation Improves Glucocorticoid-Induced Osteoporosis in a Rat Model. *Front Pharmacol*. 2017 Sep 5;8:558. doi: 10.3389/fphar.2017.00558. PMID: 28928654; PMCID: PMC5591884.
- Prince CW. Roles of hyaluronan in bone resorption. *BMC Musculoskelet Disord*. 2004 Apr;5(1):12. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-5-12>
- Qing H, Ardeshirpour L, Pajevic PD, Dusevich V, Jahn K, Kato S, Wysolmerski J, et al. Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res*. 2012; 27:1018–1029. [PubMed: 22308018]
- Raposio E, Guida C, Coradeghini R, Scanarotti C, Parodi A, Baldelli I, Fiocca R, Santi PL. In vitro polydeoxyribonucleotide effects on human pre-adipocytes. *Cell Prolif*. 2008 Oct;41(5):739-54. doi: 10.1111/j.1365-2184.2008.00547.x. Epub 2008 Jul 31. PMID: 18673371; PMCID: PMC6496018.

- Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Age-dependent Wnt gene expression in bone and during the course of osteoblast differentiation. *Age (Dordr)*. 2008 Dec;30(4):273-82. doi: 10.1007/s11357-008-9069-9. Epub 2008 Sep 2. PMID: 19424851; PMCID: PMC2585653.

- Reid IR. Glucocorticoid osteoporosis--mechanisms and management. *Eur J Endocrinol*. 1997 Sep;137(3):209-17. doi: 10.1530/eje.0.1370209. PMID: 9330580.

- Reinhold MI, Naski MC. Direct interactions of Runx2 and canonical Wnt signaling induce FGF18. *J Biol Chem*. 2007 Feb 9;282(6):3653-63. doi: 10.1074/jbc.M608995200. Epub 2006 Dec 11. PMID: 17158875.

- Rhee Y, Allen MR, Condon K, Lezcano V, Ronda AC, Galli C, Olivos N, et al. PTH receptor signaling in osteocytes governs periosteal bone formation and intra-cortical remodeling. *J Bone Miner Res*. 2011; 26:1035–1046. [PubMed: 21140374]

- Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, Kharode Y, Sauter L, Babij P, Brown EL, Hill AA, Akhter MP, Johnson ML, Recker RR, Komm BS, Bex FJ. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem*. 2006 Oct 20;281(42):31720-8. doi: 10.1074/jbc.M602308200. Epub 2006 Aug 14. PMID: 16908522.

- Rossini M, Gatti D, Adami S. Involvement of WNT/ β -catenin signaling in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2013 Aug;93(2):121-32. doi: 10.1007/s00223-013-9749-z. Epub 2013 Jun 11. PMID: 23748710.

- Rutkowski JL. Combined use of glucocorticoids and bisphosphonates may increase severity of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Implantol.* 2011 Oct;37(5):505. doi: 10.1563/1548-1336-37.5.505. PMID: 22004057.

- Sato AY, Cregor M, Delgado-Calle J, Condon KW, Allen MR, Peacock M, Plotkin LI, Bellido T. Protection From Glucocorticoid-Induced Osteoporosis by Anti-Catabolic Signaling in the Absence of Sost/Sclerostin. *J Bone Miner Res.* 2016 Oct;31(10):1791-1802. doi: 10.1002/jbmr.2869. Epub 2016 Jun 5. PMID: 27163932.

- Sato AY, Richardson D, Cregor M, Davis HM, Au ED, McAndrews K, Zimmers TA, Organ JM, Peacock M, Plotkin LI, Bellido T. Glucocorticoids induce bone and muscle atrophy by tissue-specific mechanisms upstream of E3 ubiquitin ligases. *Endocrinology* (2017); 158:664–677

- Sauermann U, Meyermann R, Schluesener HJ. Cloning of a novel TGF-beta related cytokine, the vgr, from rat brain: cloning of and comparison

to homologous human cytokines. *J Neurosci Res.* 1992 Sep;33(1):142-7.
doi: 10.1002/jnr.490330118. PMID: 1453478.

- Schambony A, Wedlich D. Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell.* 2007 May;12(5):779-92. doi: 10.1016/j.devcel.2007.02.016. PMID: 17488628.
- Schett G, Teitelbaum SL. Osteoclasts and Arthritis. *J Bone Miner Res.* 2009 Jul;24(7):1142-1146. doi: 10.1359/jbmr.090533. PMID: 19558316.
- Shaikh G., Zhang J., Perez-Aso M., Mediero A., Cronstein B. Adenosine A2A receptor promotes collagen type III synthesis via β -catenin activation in human dermal fibroblasts. *Br. J. Pharmacol.* (2016); 173, 3279–3291
- Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kühl M, Moon RT. Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol.* 2003 May 26;161(4):769-77. doi: 10.1083/jcb.200211094. PMID: 12771126; PMCID: PMC2199364.

- Shen B, Bhargav D, Wei A, Williams LA, Tao H, Ma DD, Diwan AD. BMP-13 emerges as a potential inhibitor of bone formation. *Int J Biol Sci.* 2009;5(2):192-200. doi: 10.7150/ijbs.5.192. Epub 2009 Feb 13. PMID: 19240811; PMCID: PMC2646266.
- Sini P, Denti A, Cattarini G, Daglio M, Tira ME, Balduini C. Effect of polydeoxyribonucleotides on human fibroblasts in primary culture. *Cell Biochem Funct.* 1999 Jun;17(2):107-14. doi: 10.1002/(SICI)1099-0844(199906)17:2<107::AID-CBF815>3.0.CO;2-#. PMID: 10377956.
- Squadrito F, Bitto A, Irrera N, Pizzino G, Pallio G, Minutoli L, Altavilla D. Pharmacological Activity and Clinical Use of PDRN. *Front Pharmacol.* 2017 Apr 26;8:224. doi: 10.3389/fphar.2017.00224. PMID: 28491036; PMCID: PMC5405115.
- Squadrito, F., Bitto, A., Altavilla, D., Arcoraci, V., De Caridi, G., De Feo, M. E., et al. The effect of PDRN, an adenosine receptor A2A agonist, on the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a clinical trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2014); 99, 746–753. doi: 10.1210/jc.2013-3569
- Stefano Guizzardi, Jacopo Uggeri, Silvana Belletti, Giulia Cattarini. Hyaluronate Increases Polynucleotides Effect on Human Cultured

Fibroblasts. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sci...* > Vol.3 No.1,
March 2013. DOI: 10.4236/jcdsa.2013.31019

- Stevens JR, Miranda-Carboni GA, Singer MA, Brugger SM, Lyons KM, Lane TF. Wnt10b deficiency results in age-dependent loss of bone mass and progressive reduction of mesenchymal progenitor cells. *J Bone Miner Res.* 2010 Oct;25(10):2138-47. doi: 10.1002/jbmr.118. PMID: 20499361; PMCID: PMC3153316.

- Suzuki K, Anada T, Miyazaki T, Miyatake N, Honda Y, Kishimoto KN et al. Effect of addition of hyaluronic acids on the osteoconductivity and biodegradability of synthetic octacalcium phosphate. *Acta Biomater.* 2014 Jan;10(1):53143. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.005>

- Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, Uehara S, Kobayashi Y. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011 Jan 1;16:21-30. doi: 10.2741/3673. PMID: 21196156.

- Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, Uehara S, Kobayashi Y. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Front*

Biosci (Landmark Ed). 2011 Jan 1;16:21-30. doi: 10.2741/3673. PMID: 21196156.

- Thellung S, Florio T, Maragliano A, Cattarini G, Schettini G. Polydeoxyribonucleotides enhance the proliferation of human skin fibroblasts: involvement of A2 purinergic receptor subtypes. *Life Sci.* 1999;64(18):1661-74. doi: 10.1016/s0024-3205(99)00104-6. PMID: 10328526.
- Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum SL. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature.* 1997 Mar 6;386(6620):81-4. doi: 10.1038/386081a0. PMID: 9052784.
- Tonello, G.; Daglio, M.; Zaccarelli, N.; Sottofattori, E.; Mazzei, M.; Balbi, A. Characterization and quantitation of the active polynucleotide fraction (PDRN) from human placenta, a tissue re- pair stimulating agent. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, 14, 1555
- Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 1971 Nov-Dec;50(6):1392-406. doi: 10.1177/00220345710500060601. PMID: 4943222.

- Van Lierop AH, van der Eerden AW, Hamdy NA, Hermus AR, den Heijer M, Papapoulos SE. Circulating sclerostin levels are decreased in patients with endogenous hypercortisolism and increase after treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Oct;97(10):E1953-7. doi: 10.1210/jc.2012-2218. Epub 2012 Jul 27. PMID: 22844062; PMCID: PMC3462943.
- Wada T, Nakashima T, Oliveira-dos-Santos AJ, Gasser J, Hara H, Schett G, Penninger JM. The molecular scaffold Gab2 is a crucial component of RANK signaling and osteoclastogenesis. *Nat Med.* 2005 Apr;11(4):394-9. doi: 10.1038/nm1203. Epub 2005 Mar 6. PMID: 15750601.
- Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, Shi LL. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* 2014 Sep;1(1):87-105.
- Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaja M, Hanafusa H, Choi Y. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell.* 1999 Dec;4(6):1041-9. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80232-4. PMID: 10635328.

- Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* (1996); 16:4128–4136.

- Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Goto M., Mochizuki S. I., Tsuda E., Morinaga T., Udagawa N., Takahashi N., Suda T., Higashio K. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone* (1999); 25, 109–113

- Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008 Jul-Sep;8(3):204-16. PMID: 18799853.

LEGENDA DELLE FIGURE

Figura 1. Il grafico mostra la percentuale di vitalità cellulare a 24h negli osteoblasti primari prelevati da topi *wild-type* C57BL/6. I valori sono espressi come media e deviazione standard. *p<0.0001 vs CTRL; #p<0.0001 vs Dex

Figura 2. Il grafico mostra la percentuale di vitalità cellulare a 24h nelle colture primarie di bone marrow cells prelevate da topi *wild-type* C57BL/6. I valori sono espressi come media e deviazione standard. *p<0.0001 vs CTRL; #p<0.0001 vs Dex

Figura 3. Il grafico mostra la percentuale di vitalità cellulare a 24h nella linea cellulare MLO-A5. I valori sono espressi come media e deviazione standard. *p<0.0001 vs CTRL; #p<0.0001 vs Dex

Figura 4. I grafici rappresentano i risultati dell'espressione dell'mRNA di OPG, osteocalcina, RUNX-2, BMP-6, Col1a1 e b-ALP nelle colture primarie di osteoblasti prelevati da topi *wild-type* C57BL/6. I valori sono stati espressi come media e deviazione standard. *p<0.0001 vs CTRL; #p<0.0001 vs Dex; §p<0.0001vs PDRN 1uM.

Figura 5. I grafici rappresentano i risultati dell'espressione dell'mRNA di OPG, osteocalcina, RUNX-2, BMP-6, Col1a1 e b-ALP nelle colture primarie di bone marrow cells prelevate da topi *wild-type* C57BL/6. I valori sono stati espressi

come media e deviazione standard. *p<0.0001 vs CTRL; #p<0.0001 vs Dex; §p<0.0001vs PDRN 1uM.

Figura 6. I grafici rappresentano i risultati dell'espressione proteica di RUNX-2, BMP-6, Col1a1 e b-ALP nelle colture primarie di osteoblasti prelevate da topi *wild-type* C57BL/6. I valori sono stati espressi come media e deviazione standard. *p<0.0001 vs CTRL; #p<0.0001 vs Dex; §p<0.0001vs PDRN 1uM.

Figura 7. I grafici rappresentano i risultati dell'espressione dell'mRNA di TNF- α , IL-6 E IL-1 nelle colture primarie di osteoblasti prelevati da topi *wild-type* C57BL/6. I valori sono stati espressi come media e deviazione standard. *p<0.0001 vs CTRL; #p<0.0001 vs Dex; §p<0.0001vs PDRN 1uM.

Figura 8. I grafici rappresentano i risultati dell'espressione dell'mRNA di TNF- α , IL-6 E IL-1 nelle colture primarie di bone marrow cells prelevate da topi *wild-type* C57BL/6. I valori sono stati espressi come media e deviazione standard. *p<0.0001 vs CTRL; #p<0.0001 vs Dex; §p<0.0001vs PDRN 1uM.

Figura 9. I grafici rappresentano i risultati dell'espressione dell'mRNA di Wnt5a, Wnt10b, β -catenina e DKK-1 nelle colture primarie di osteoblasti prelevati da topi *wild-type* C57BL/6. I valori sono stati espressi come media e deviazione standard. *p<0.0001 vs CTRL; #p<0.0001 vs Dex; §p<0.0001vs PDRN 1uM.

Figura 10. I grafici rappresentano i risultati dell'espressione dell'mRNA di Wnt5a, Wnt10b, β -catenina e DKK-1 nelle colture primarie di bone marrow cells prelevate da topi *wild-type* C57BL/6. I valori sono stati espressi come media e deviazione standard. * $p < 0.0001$ vs CTRL; # $p < 0.0001$ vs Dex; § $p < 0.0001$ vs PDRN 1 μ M.

Figura 11. I grafici rappresentano i risultati dell'espressione proteica di Wnt5a, Wnt10b, β -catenina e DKK-1 nelle colture primarie di osteoblasti prelevati da topi *wild-type* C57BL/6. I valori sono stati espressi come media e deviazione standard. * $p < 0.0001$ vs CTRL; # $p < 0.0001$ vs Dex; § $p < 0.0001$ vs PDRN 1 μ M.

Figura 12. I grafici rappresentano i risultati dell'espressione dell'mRNA di Trap, NFATc1 e catepsina k nelle colture primarie di osteoclasti prelevati da topi *wild-type* C57BL/6. I valori sono stati espressi come media e deviazione standard. * $p < 0.0001$ vs CTRL; # $p < 0.0001$ vs Dex; § $p < 0.0001$ vs PDRN 1 μ M.

Figura 13. I grafici rappresentano i risultati dell'espressione proteica di NFATc1 e catepsina k nelle colture primarie di osteoclasti prelevati da topi *wild-type* C57BL/6. I valori sono stati espressi come media e deviazione standard. * $p < 0.0001$ vs CTRL; # $p < 0.0001$ vs Dex; § $p < 0.0001$ vs PDRN 1 μ M.

Figura 14. I grafici rappresentano i risultati dell'espressione dell'mRNA di Wnt5a, β -catenina, DKK-1 e sclerostina nelle colture di osteociti derivanti dalla

linea cellulare MLO-A5. I valori sono stati espressi come media e deviazione standard. *p<0.0001 vs CTRL; #p<0.0001 vs Dex; §p<0.0001 vs PDRN 1uM.

Figura 15. I grafici rappresentano i risultati dell'espressione proteica di Wnt5a, β -catenina, DKK-1 e sclerostina nelle colture di osteociti derivanti dalla linea cellulare MLO-A5. I valori sono stati espressi come media e deviazione standard. *p<0.0001 vs CTRL; #p<0.0001 vs Dex; §p<0.0001 vs PDRN 1uM.

Figura 16. I grafici rappresentano i risultati della *Bone Mineral Density* ottenuti mediante analisi microTC dai vari gruppi sperimentali: gruppo Ctrl C57BL/6 vs gruppo trattato C57BL/6; gruppo Ctrl A2AKO vs gruppo trattato A2AKO. BMD al collo del femore espressa in g/cm² nei diversi gruppi. I valori sono stati espressi come media e deviazione standard. *p<0.0001 vs CTRL.

Figura 17. Immagini radiografiche ottenute mediante microTC dai gruppi di studio: C57BL/6 Ctrl-group e A2AKO Ctrl-group. I dati sono espressi come media e SD.

Figura 18. Immagini radiografiche ottenute mediante microTC dai gruppi di studio: C57BL/6 Gio-group e A2AKO Gio-group. I dati sono espressi come media e SD.

Figura 19. I grafici rappresentano i risultati dello spessore trabecolare e del rapporto tra volume osseo e tessuto osseo ottenuti mediante analisi radiografica microTC. I dati sono espressi come media e SD.