



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze cliniche – Patologia e clinica dell'apparato
locomotore e dei tessuti calcificati

CICLO XXXII

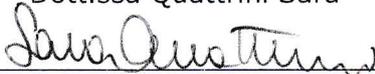
COORDINATORE Prof. Marco Matucci Cerinic

Valutazione dell'aderenza alla Dieta Mediterranea e dell'introito di calcio in relazione alla salute dell'osso in una popolazione di donne in due fasi della vita: perimenopausa e gravidanza.

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

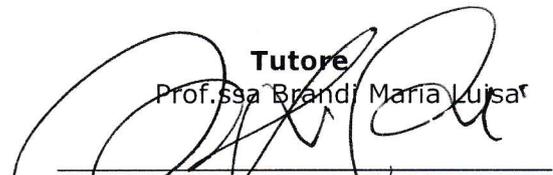
Dottorando

Dott.ssa Quattrini Sara


(firma)

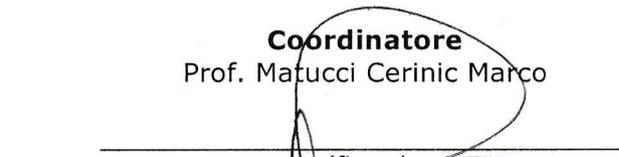
Tutore

Prof.ssa Brandi Maria Luisa


(firma)

Coordinatore

Prof. Matucci Cerinic Marco


(firma)

Anni 2016/2019

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 LA STRUTTURA DELLO SCHELETRO	3
1.1.1 IL TESSUTO OSSEO	3
1.1.2 IL RIMODELLAMENTO OSSEO	4
1.1.3 OSSO CORTICALE ED OSSO TRABECOLARE	6
1.2 L'OSTEOPOROSI	8
1.2.1 DEFINIZIONE, DIAGNOSI ED ASPETTI EPIDEMIOLOGICI	8
1.2.2 I FATTORI DI RISCHIO	10
1.2.3 L'OSTEOPOROSI IN GRAVIDANZA	11
1.2.4 LA PREVENZIONE	13
1.3 IL RUOLO DELL'ALIMENTAZIONE	15
1.3.1 I MACRONUTRIENTI	15
1.3.2 IL CALCIO	17
1.3.3 LA VITAMINA D	21
1.3.4 GLI ALTRI MICRONUTRIENTI	23
1.4 LA DIETA MEDITERRANEA	25
1.4.1 CARATTERISTICHE ED ASPETTI BENEFICI	25
1.4.2 LA DIETA MEDITERRANEA E LA SALUTE DELL'OSSO	26
1.4.3 LA DIETA MEDITERRANEA IN GRAVIDANZA	28
2. SCOPO DELLO STUDIO	29
3. MATERIALI E METODI	30
3.1 DISEGNO DELLO STUDIO ED APPROVAZIONE DEL COMITATO ETICO	30
3.2 LE POPOLAZIONI OGGETTO DI STUDIO	30
3.2.1 DONNE IN PERI-MENOPAUSA	30
3.2.2 DONNE IN GRAVIDANZA	31
3.3 I TEMPI DI ESECUZIONE	32
3.4 GLI STRUMENTI UTILIZZATI PER LA RACCOLTA DATI	33
3.4.1 INFORMAZIONI GENERALI	33
3.4.2 LA VALUTAZIONE NUTRIZIONALE	34
3.4.2.a LO SCORE DI ADERENZA ALLA DIETA MEDITERRANEA	34
3.4.2.b FFQ PER STIMARE L'INTROITO ALIMENTARE DI CALCIO	34
3.5 LE VALUTAZIONI SPECIFICHE NELLE DONNE IN PERI-MENOPAUSA	35
3.6 LE VALUTAZIONI SPECIFICHE NELLE DONNE IN GRAVIDANZA	37
3.7 ANALISI STATISTICA	37
4. RISULTATI	38
4.1 ANALISI DEI DATI NELLA POPOLAZIONE DI DONNE IN PERI-MENOPAUSA	

	39
4.1.1 DATI SOCIO-DEMOGRAFICI, ANTROPOMETRICI E CLINICI	39
4.1.2 LE ABITUDINI ALIMENTARI	42
4.1.3 LE ANALISI DI RELAZIONE TRA LE VARIABILI	45
4.2 ANALISI DEI DATI NELLA POPOLAZIONE DI DONNE IN GRAVIDANZA	49
4.2.1 DATI SOCIO-DEMOGRAFICI, ANTROPOMETRICI E CLINICI	49
4.2.2 LE ABITUDINI ALIMENTARI	52
4.2.3 LE ANALISI DI RELAZIONE TRA LE VARIABILI	58
5. DISCUSSIONE	63
6. CONCLUSIONI	70
7. RINGRAZIAMENTI	71
8. BIBLIOGRAFIA	72
9. APPENDICI	83

1. INTRODUZIONE

1.1 LA STRUTTURA DELLO SCHELETRO

1.1.1 IL TESSUTO OSSEO

L'osso è un tessuto complesso, costituito da una componente cellulare specializzata e da una matrice extracellulare. La matrice extracellulare è formata da un 30% di materiale organico e da un 70% di componenti minerali inorganici [1].

Il materiale organico è costituito principalmente (98%) da collagene di tipo I, ovvero una struttura fibrillare con tre filamenti intrecciati (due filamenti di collagene α -1 ed un filamento di collagene α -2). Il resto del materiale è formato da proteine non collagenosiche, come osteocalcina (OCN), osteonectina, osteopontina (OPN), fibronectina, sialoproteina ossea (BSP), proteina morfogenetica dell'osso (BMP) ed altri fattori di crescita [2].

La componente inorganica della matrice è formata da minerali, rappresentati principalmente da ioni di calcio e fosfato. Tali ioni formano cristalli di idrossiapatite, che si depositano, grazie alla struttura formata dal materiale organico della matrice, e conferiscono la tipica durezza e resistenza del tessuto osseo. A completare la parte inorganica, si trovano anche discrete quantità di bicarbonato, sodio, potassio, citrato, magnesio, carbonato di calcio, fluorato, zinco, bario e stronzio [3].

La componente cellulare è caratterizzata da quattro tipologie di cellule: gli osteoblasti, gli osteociti, gli osteoclasti e le cellule osteoprogenitrici. Gli osteoblasti si formano dalle cellule staminali mesenchimali nello stroma del midollo osseo, grazie all'espressione di specifici geni ed all'attivazione di alcuni fattori proteici e di crescita (come OCN e BSP) [3]. Dal punto di vista morfologico, appaiono come cellule cuboidali caratterizzate da un reticolo endoplasmatico rugoso e di un apparato di Golgi molto esteso, nonché dalla presenza di numerose vescicole secretorie. Tali caratteri morfologici evidenziano la tipica funzionalità di queste cellule: sono responsabili della sintesi della matrice extracellulare e della sua conseguente mineralizzazione [4].

Gli osteociti sono cellule osteoblastiche giunte a maturazione e che, pur rimanendo cellule vitali, entrano in uno stato di quiescenza. In questo caso, il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi risultano poco sviluppati ed il citoplasma presenta diversi prolungamenti, che permettono alla cellula di attingere alle sostanze nutritive attraverso microgallerie, definite *canalicoli ossei*. Infatti, tali cellule si trovano localizzate nella profondità della matrice ossea e mantengono così il contatto con gli altri osteociti, con gli osteoblasti e con il circolo sanguigno. Gli osteociti attingono ai capillari sanguigni presenti nei canali ossei non solo per il loro nutrimento, ma anche per espletare ulteriori funzioni: controllano l'azione degli osteoclasti, poiché possiedono recettori di membrana per l'ormone paratiroideo (PTH) [5].

Gli osteoclasti sono grandi cellule multinucleate e si formano dalla fusione di progenitori mononucleati rappresentati da monociti/macrofagi, attraverso il processo di osteoclastogenesi. Quando vengono attivate, presentano una faccia citoplasmatica in prossimità dell'osso con caratteristiche "inresature" molto mobili, che aderiscono alla superficie dell'osso e creano un microambiente adatto al riassorbimento osseo [4]- [6].

Le cellule osteoprogenitrici sono cellule di origine mesenchimale con proprietà staminali: possono proliferare e differenziare in osteoblasti. Sono localizzate nel periostio e nell'endostio e hanno una tipica forma piatta, con un citoplasma che si estende sulla superficie dell'osso. Alcune di queste cellule hanno prolungamenti nei *canalicoli ossei* e *gap junctions* di collegamento con altre cellule osteoprogenitrici e con gli osteociti. Le loro funzioni non sono state ancora chiarite, ma è stato osservato un loro ruolo nell'impedire un contatto diretto tra matrice e osteoclasti, nelle fasi in cui il riassorbimento osseo non deve attivarsi [3].

1.1.2 IL RIMODELLAMENTO OSSEO

Nonostante appaia inerte, l'osso è un organo molto dinamico e viene continuamente riassorbito dagli osteoclasti e neformato dagli osteoblasti, tramite il processo chiamato rimodellamento osseo. Questo meccanismo è attivo in maniera ciclica durante l'arco di tutta la vita e permette il rinnovamento dello scheletro adulto, che viene così completamente sostituito ogni 10 anni. Durante le fasi di crescita (infanzia ed adolescenza), tale processo è spostato verso la formazione di nuovo osso per favorire lo sviluppo di tutto l'apparato scheletrico. Per tale motivo, si parla di modellamento osseo [4].

Per un fisiologico turnover osseo, è fondamentale la comunicazione diretta tra le tipologie di cellule deputate alla formazione ed al riassorbimento ossei. Le cellule osteoblastiche e quelle osteoclastiche si organizzano, pertanto, in unità specializzate chiamate unità multicellulari di base (BMUs, Basic Multicellular Units) [6]. Il ciclo di rimodellamento consta di sei fasi consecutive: quiescenza, attivazione, riassorbimento, inversione, formazione e mineralizzazione (Figura 1). Le tre principali fasi sono di riassorbimento, durante la quale gli osteoclasti digeriscono il vecchio osso mediante specifici enzimi proteolitici; l'inversione, dove le cellule mononucleate si dispongono sulla superficie dell'osso; la formazione, quando gli osteoblasti depositano nuovo tessuto osseo e si occupano della mineralizzazione della matrice [7].

Il rimodellamento osseo è un processo fondamentale per diversi motivi. Innanzitutto, è necessario per permettere l'adattamento dello scheletro a tutti gli stimoli meccanici a cui è sottoposto. Inoltre, serve per riparare il tessuto osseo lesionato ed i piccoli danneggiamenti nella matrice ossea, sostituendo il vecchio osso in maniera ciclica. Infine, gioca un ruolo nel mantenimento dell'omeostasi del calcio plasmatico [7].

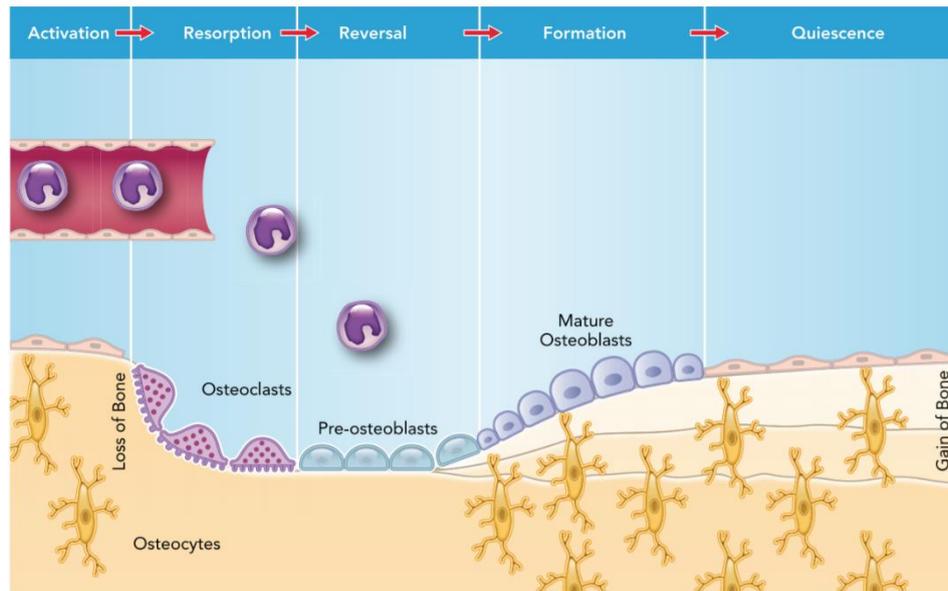


Figura 1. Il processo di rimodellamento osseo, tratto da “Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement” [6].

Uno squilibrio di questo meccanismo può portare da una parte ad un’eccessiva attività osteoclastica, con conseguente perdita di massa ossea ed osteoporosi; dall’altra ad un’aumentata attività osteoblastica, comportando un accumulo di tessuto osseo ed osteopetrosi [3].

Pertanto, l’equilibrio tra formazione ossea e riassorbimento è importante e viene garantito dall’azione di diverse molecole. Molti fattori sistemici e locali sono coinvolti nella regolazione del turnover osseo. Il sistema di espressione e rilascio di tali fattori è molto complesso e ben organizzato (Figura 2). Dal punto di vista sistemico, sono coinvolti diversi ormoni, tra cui la calcitonina (CT), il paratormone (PTH), la vitamina D₃, gli estrogeni, gli ormoni tiroidei ed i glucocorticoidi, ed alcuni fattori di crescita, come IGFs, TGF-β, FGFs, EGF, WNTs, and Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Gli osteoblasti vengono stimolati nella loro proliferazione ed attività dal PTH, dalla vitamina D₃, dagli estrogeni (che attenuano anche l’osteoclastogenesi e promuovono l’apoptosi degli osteoclasti), dagli androgeni [8], dagli ormoni tiroidei e dai fattori di crescita [6]. Vengono invece inibiti dai glucocorticoidi, che promuovono la formazione degli osteoclasti.

Dal punto di vista locale, è stato individuato un vasto numero di citochine e di fattori di crescita che influenzano le funzioni delle cellule ossee [7]. Inoltre, è stato identificato il sistema OPG/RANKL/RANK, in cui l’osteoprotegerina (OPG) ha il ruolo di inibire la differenziazione e l’attività degli osteoclasti, mentre il ligando per RANK (RANKL) promuove la formazione delle cellule osteoclastiche nel momento in cui si lega al suo recettore (RANK) [9]. Nella regolazione di tale sistema intervengono tutti i fattori sistemici precedentemente illustrati [6].

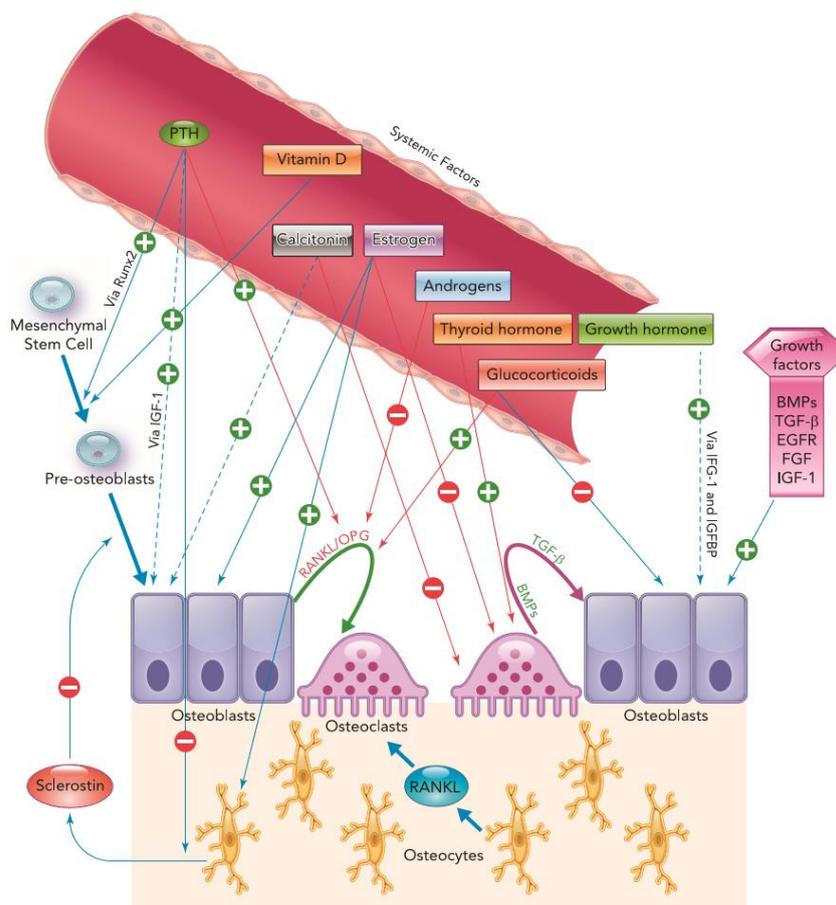


Figura 2. I fattori coinvolti nella regolazione del rimodellamento osseo, tratto da “Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement” [6].

1.1.3 OSSO CORTICALE ED OSSO TRABECOLARE

Lo scheletro umano adulto è costituito da 213 ossa, escluse le ossa sesamoidi. Si distinguono quattro tipologie di ossa: lunghe, corte, piatte ed irregolari.

Dal punto di vista macroscopico, il tessuto osseo si organizza a formare delle strutture di tipo lamellare. Esiste anche un tessuto di tipo non lamellare, chiamato fibroso, ed è tipico del tessuto osseo non maturo. Il tessuto fibroso è formato da fibre di collagene intrecciate in maniera casuale e la quantità di minerali è ridotta rispetto al tessuto lamellare. Tale tessuto è tipico degli embrioni, dei neonati e durante la fase di crescita; nell’adulto, è presente solo nella fase di riabilitazione da una frattura [10].

Il tessuto osseo lamellare può essere compatto, se è composto prevalentemente da lamelle concentriche complete, oppure spugnoso, se invece è composto da lamelle incomplete che formano tanti piccoli frammenti incastonati fra di loro (trabecole ossee). L’osso corticale è un osso compatto, costituisce circa l’80% dello scheletro e si trova nelle diafisi delle ossa lunghe (femore, tibia e radio) e nella superficie esterna delle ossa piatte (cranio, mandibola, scapola). L’osso trabecolare è un osso spugnoso, forma circa il 20% dello scheletro e si localizza prevalentemente nelle epifisi delle ossa lunghe e nella parte interna

delle ossa piatte [11].

Sia l'osso corticale, che l'osso trabecolare sono costituiti da un'unità fondamentale chiamata osteone (Figura 3).

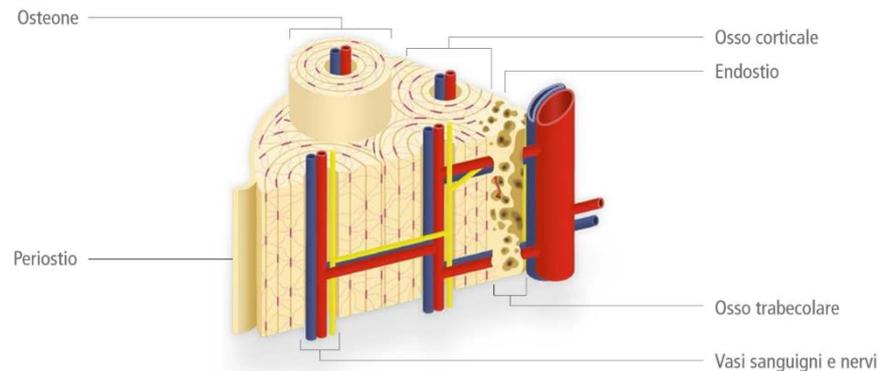


Figura 3. La struttura dell'osso, tratto da "Compendio IOF sull'Osteoporosi" [4].

L'osso corticale è costituito da osteoni cilindrici, chiamati *sistemi di Havers*. L'osteone ha un canale centrale (*canale di Havers*) in cui scorrono i vasi sanguigni ed altri canali (*perforanti*) che si inseriscono in modo perpendicolare rispetto alla superficie ossea, per trasportare il sangue alla cavità midollare interna dell'osso. La superficie esterna dell'osso corticale è il *periostio*, una membrana agganciata all'osso tramite le *fibre collagenosiche di Sharpey* e la cui attività è importante nella riparazione da una frattura, tanto che con l'età le ossa aumentano in diametro. La superficie interna è l'*endostio*, che risulta a contatto con il midollo osseo, l'osso trabecolare ed i vasi sanguigni, ed è soggetto ad un maggiore rimodellamento osseo rispetto al *periostio* [10].

L'osso trabecolare ha un aspetto alveolare ed è costituito da sottili trabecole o spicole, formate da lamelle addensate che si ramificano in una rete tridimensionale e che racchiudono il midollo osseo. Le trabecole sono costituite da strati di lamelle parallele, che non si dispongono concentricamente a formare i *sistemi Haversiani*, in quanto la nutrizione avviene per diffusione attraverso la rete di canalicoli che si aprono direttamente nelle cavità midollari. La distribuzione spaziale delle trabecole dipende dalle sollecitazioni meccaniche a cui viene sottoposto l'osso, pertanto la disposizione delle fibre risulta molto variabile a seconda del sito anatomico, dell'età, del peso e dell'attività del soggetto [11]-[12].

L'osso corticale è denso e compatto e fornisce robustezza allo scheletro, garantendo una buona resistenza alle torsioni ed alle sollecitazioni meccaniche. D'altro canto, l'osso trabecolare è molto poroso e leggero e permette ai muscoli di muovere lo scheletro più agilmente, garantendo una migliore resistenza a pressioni multidirezionali [10]. La combinazione di queste due tipologie di tessuto rende le ossa forti, ma allo stesso tempo leggere e flessibili, abbastanza da assorbire gli stress esogeni senza rompersi.

1.2 L'OSTEOPOROSI

1.2.1 DEFINIZIONE, DIAGNOSI ED ASPETTI EPIDEMIOLOGICI

L'osteoporosi (OP) viene definita come una condizione patologica sistemica a carico dello scheletro, che risulta soggetta a una perdita di massa ossea e alla degenerazione della microarchitettura dell'osso. Tali modificazioni, predispongono ad una maggiore fragilità e ad un aumentato rischio di fratture [13].

Dal punto di vista microscopico, l'osso osteoporotico si presenta con una riduzione evidente della matrice trabecolare, tanto che le cavità ossee formate dalle trabecole tendono ad "allargarsi", e, di conseguenza, diventa più fragile e poroso, più propenso alla rottura (Figura 4).

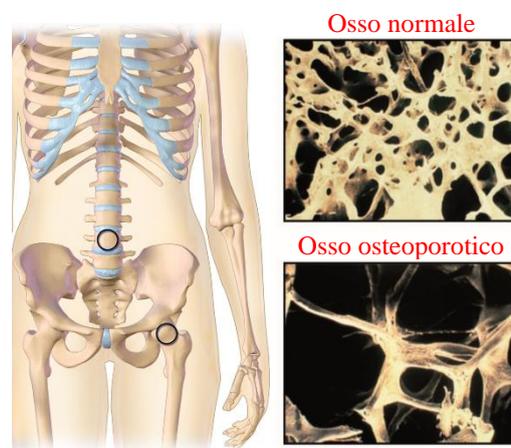


Figura 4. Struttura dell'osso trabecolare normale ed osteoporotico. Tratto da <https://en.wikipedia.org/wiki/Osteoporosis> e modificato.

Si definiscono "primarie" le forme di OP che si riscontrano dopo la menopausa (*post-menopausale*) o con l'avanzare dell'età (*senile*). Le OP "secondarie" sono, invece, causate da numerose patologie e/o dall'assunzione cronica di diversi farmaci. Si riscontrano OP "secondarie" a seguito di malattie endocrine (iperparatiroidismo, ipogonadismo, diabete mellito di tipo 1 o 2, ipertiroidismo, ecc.), ematologiche (talassemia, mieloma multiplo, emofilia, ecc.), reumatiche (lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide, artrite psoriasica, ecc.), renali (Ipercalciuria idiopatica renale, insufficienza renale cronica, ecc.), gastro-intestinali (Epatopatie croniche, Morbo celiaco, Malattie infiammatorie croniche gastro-intestinali, intolleranza al lattosio, insufficienza pancreatica, ecc.), neurologiche (Parkinson, Sclerosi multipla, paraplegia, ecc.), genetiche (Osteogenesi imperfetta, Sindrome di Gaucher, ipofosfatasia, Sindrome di Marfan, ecc.) ed altre (Broncopneumopatia cronica ostruttiva, anoressia nervosa, AIDS/HIV, ecc.). L'assunzione prolungata di alcuni tipi di farmaci, come glucocorticoidi, inibitori dell'aromatasi, inibitori di pompa protonica, SSRI (selective serotonin reuptake inhibitor – inibitori selettivi del reuptake della serotonina), ed altri, contribuisce alla perdita di massa ossea e predispone

all'OP [14].

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), la diagnosi di OP viene effettuata sulla base della valutazione della densità minerale ossea (Bone Mineral Density o BMD), attraverso strumentazione DXA (*Dual X Ray Absorptiometry*, ossia densitometria ossea a raggi X) che permette di identificare anche basse percentuali di perdita di massa ossea, con l'utilizzo di raggi X. I siti di misurazione più valutati sono la colonna lombare (L1-L4) ed il femore prossimale. Tuttavia, nelle persone anziane la colonna lombare può non essere adeguata come sito di misurazione a causa delle deformazioni tipiche dell'età avanzata (scoliosi, deformità vertebrali, calcificazioni extra-scheletriche, ecc.); pertanto, il femore prossimale è il sito usato per la diagnosi. La valutazione a livello della colonna lombare viene usata per monitorare il trattamento farmacologico, poiché è un sito molto sensibile ai cambiamenti indotti dalla terapia [15]-[16].

L'OP viene definita quando si ha una BMD ridotta al di sotto di 2.5 (o più) deviazioni standard rispetto al valore medio stabilito per giovani adulti sani dello stesso sesso (T-score < -2.5 SD). Si parla, invece, di "osteopenia" quando si ha un T-score compreso tra -1.0 e -2.5 e di "osteoporosi conclamata" se si ha un T-score < -2.5 con la contemporanea presenza di una o più fratture da fragilità. Questo tipo di valutazione, tramite T-score, non è valida per bambini ed adolescenti [17].

Il monitoraggio della BMD può essere effettuato anche con altre metodologie, che vengono largamente utilizzate specialmente in ambito di studi clinici ed epidemiologici. Questi includono la valutazione radiologica e i markers ematici del turnover osseo (BTM) [14], [18].

L'OP rappresenta una malattia di rilevanza sociale. La sua incidenza aumenta con l'età sino ad interessare la maggior parte della popolazione oltre l'ottava decade di vita. A livello mondiale, l'OP interessa oltre 200 milioni di individui e in Europa è stato stimato che circa 22 milioni di donne e 5.5 milioni di uomini sono affetti da tale patologia [17]. Si stima che in Italia ci siano oggi circa 3,5 milioni di donne ed 1 milione di uomini affetti da OP. Poiché nei prossimi 20 anni la percentuale della popolazione italiana al di sopra dei 65 anni d'età aumenterà del 25%, ci dovremo attendere un proporzionale incremento dell'incidenza dell'osteoporosi [14].

Il problema dell'OP sta nelle fratture che si verificano come una conseguenza dell'aumentata fragilità ossea. La valutazione più recente della prevalenza di qualsiasi frattura da fragilità risale al 2000, quando risultava essere di 56 milioni circa in tutto il mondo [4]. Successivamente, diverse stime di incidenza delle fratture da fragilità hanno mostrato quadri poco rassicuranti, sottolineando come tale problematica sia in crescendo [19]. Tra la popolazione di età superiore ai 50 anni, una donna su tre e un uomo su cinque

è destinato a subire una frattura da fragilità. Quando si verifica una frattura si avvia un ciclo di disabilità, che pesa notevolmente sia sui soggetti che le subiscono, sia su chi se ne prende cura [20].

Nonostante non sia nota la spesa sanitaria globale attribuibile all'OP, poiché mancano dati sui tassi di frattura per molti paesi in via di sviluppo, i costi sui sistemi sanitari dei paesi sviluppati (come Europa, Stati Uniti, Cina e Giappone) sono ingenti e pesano notevolmente sui bilanci annuali [17].

1.2.2 I FATTORI DI RISCHIO

L'OP è una patologia multifattoriale e la patogenesi della frattura deve tenere conto di numerosi fattori, che influenzano sia la resistenza ossea, sia la frequenza ed il tipo di trauma. Il principale fattore che determina la forza e la resistenza dell'osso è la BMD, ma molti studi internazionali hanno identificato diversi fattori di rischio, indipendenti dalla BMD, e si possono distinguere in non-modificabili e modificabili [21].

I fattori non-modificabili riconosciuti sono l'età, il genere, la predisposizione genetica, la familiarità per fratture da fragilità, la menopausa precoce, i fattori ormonali, l'incidenza di alcune patologie ed alcune terapie farmacologiche croniche (che sono causa di OP "secondarie").

L'età avanzata porta con sé un aumentato rischio di frattura, dovuto non solo alla riduzione della BMD, ma anche ad alterazioni qualitative della struttura ossea, alla maggiore probabilità di caduta e ad una minore capacità di riparazione del tessuto osseo [14]. L'incidenza delle fratture da fragilità non solo aumenta esponenzialmente con l'età, ma il rischio di subire una nuova frattura è doppio per coloro che hanno già subito una frattura da fragilità, rispetto ai coetanei che non ne hanno mai riscontrate [22].

In questo contesto, le donne risultano essere a maggiore rischio di OP e fratture da fragilità, rispetto alla compagine maschile, e la presenza di fratture di femore in famiglia aumenta il rischio di incidenza di fratture osteoporotiche, specialmente quella di femore a sua volta [14]. Per quanto riguarda il genere femminile, una menopausa precoce (prima dei 40 anni) si accompagna ad una riduzione degli ormoni estrogenici in più giovane età, esponendo ad un'anticipata perdita di massa ossea e ad un maggiore rischio di fratture da fragilità [23].

Quando si parla di predisposizione genetica si fa riferimento non solo alla presenza di mutazioni genetiche che predispongono all'OP, ma anche alle determinanti che sono alla base della variabilità interpersonale della massa ossea. Attualmente, sono stati individuati alcuni polimorfismi genetici dei geni che codificano il collagene tipo 1 (COL1A1), il recettore estrogenico (ER) e quello della vitamina D (VDR), e che si pensa possano essere associati ad un maggior rischio osteoporotico. Tuttavia, ognuno di questi polimorfismi spiega solo meno del 30% della varianza della massa ossea ed ancor meno del rischio di

sviluppare osteoporosi; pertanto, non possono essere usati a scopo diagnostico e/o prognostico [14]. Il patrimonio genetico è importante in quanto ogni individuo ha una propria potenzialità di sviluppare massa ossea e può ottimizzare il raggiungimento del picco di massa ossea (Peak Bone Mass, PBM) tramite un corretto stile di vita sin dall'infanzia. Il PBM viene definito come la massima quantità di massa ossea (in termini di densità e qualità nella microarchitettura) e di forza che un individuo può raggiungere nella giovane età adulta (intorno ai 25 anni). Tale punto di massimo sviluppo è geneticamente determinato, può essere stimolato da uno stile di vita adeguato e si mantiene in uno stato di plateau in età adulta, per poi decadere progressivamente con l'avanzare dell'età [24].

I fattori di rischio modificabili sono legati allo stile di vita ed influenzano sia il raggiungimento di un adeguato PBM, sia il mantenimento di una buona BMD in età adulta ed avanzata. Tra questi si annoverano l'alimentazione, in particolare l'apporto dietetico di calcio, l'esposizione al sole, per la produzione endogena di vitamina D, un basso BMI (Body Mass Index, ossia Indice di Massa Corporea), l'abitudine al fumo [25], il consumo eccessivo di bevande alcoliche [26] e l'attività fisica [24]. In particolar modo, il BMI è un indicatore del rapporto tra peso ed altezza (kg/m^2) e si associa ad un aumentato rischio di frattura se risulta essere basso, ovvero in una situazione di sottopeso [27]. Soggetti con un BMI di $20 \text{ kg}/\text{m}^2$ hanno mostrato un rischio di frattura quasi doppio rispetto a coloro con un BMI di $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ [4].

Alcuni recenti studi hanno identificato dei fattori di rischio clinici (Clinical Risk Factors, CRFs) per calcolare il rischio di frattura a lungo termine. L'International Osteoporosis Foundation (IOF) e l'International Society for Clinical Densitometry (ISCD) hanno sviluppato un algoritmo computerizzato per calcolare la probabilità di frattura, in base ai CRFs, negli uomini e nelle donne, e lo hanno chiamato FRAX[®] (Fracture Risk Assessment) [28]. Il FRAX[®] è stato creato per l'utilizzo da parte dei medici in prevenzione primaria e il risultato che si ottiene è la probabilità a 10 anni di incorrere in una frattura maggiore (anca, colonna, omero o polso), sulla base di: età, BMI, presenza di frattura pregressa, storia familiare di frattura d'anca, abitudine al fumo, uso prolungato di glucocorticoidi, presenza di artrite reumatoide, presenza di altre cause di OP secondaria, consumo di bevande alcoliche. La BMD del collo femorale è un fattore che può essere opzionalmente aggiunto per il calcolo del FRAX, al fine di migliorare la precisione del risultato. Tale strumento si è dimostrato molto valido per individuare i pazienti che necessitano di un intervento, al fine di prevenire una frattura da fragilità [29].

1.2.3 L'OSTEOPOROSI IN GRAVIDANZA

La gravidanza non rappresenta di per sé un fattore di rischio per l'OP, ma può facilmente

diventarlo se la donna affronta la gestazione in uno stato nutrizionale non adeguato e se vi sono, o vi sono state, situazioni che hanno pregiudicato il raggiungimento ottimale del PBM.

L'OP dovuta alla gravidanza è una condizione molto rara ed attualmente la prevalenza, le cause e la patogenesi non sono ancora state chiarite. È noto che l'incidenza di OP in donne con età inferiore ai 50 anni è meno del 2%, mentre in coloro con età compresa tra 20 e 40 anni è solo del 1.2% [30].

Nel corso dell'ultimo trimestre di gravidanza si assiste ad un aumento della mobilitazione del calcio dal tessuto osseo e del riassorbimento osseo, che incrementa nel periodo del post-parto e dell'allattamento [31]. Queste modificazioni potrebbero essere deleterie per la BMD e predisporre ad OP e/o a fratture da fragilità, sia a breve che a lungo termine [32], [33]. Tuttavia, la perdita di massa ossea in questo periodo sembra sia transitoria: avere più gravidanze e l'allattamento prolungato e/o ripetuto nel corso della vita sembrano non essere associati ad un aumentato rischio di OP in età avanzata [34], [35].

L'eziopatogenesi dell'OP in gravidanza non è completamente conosciuta, ma sono stati ipotizzati alcuni meccanismi attraverso cui la donna si può predisporre ad un'aumentata perdita di BMD. Innanzitutto, la carenza di calcio e l'ipoestrogenismo possono essere fattori coinvolti in tale riduzione. Durante la gravidanza e l'allattamento il fabbisogno di calcio aumenta, per favorire lo sviluppo fetale e la produzione di latte. L'assorbimento intestinale materno viene duplicato, per far fronte alle incrementate necessità e il tessuto osseo aumenta il riassorbimento per rilasciare ulteriori quantità di calcio, destinate al feto. Con l'allattamento le donne vanno incontro ad una transitoria perdita di BMD, che va dal 3% al 9%. Inoltre, è stato osservato che i marker del turnover osseo aumentano durante la gravidanza, per poi tornare nei range di riferimento entro 12 mesi dal parto. Allo stesso modo, nel corso dell'allattamento, si assiste ad un'inibizione dello sviluppo follicolare, poiché le donne entrano in uno stato ipoestrogenico volto a stimolare ulteriormente il riassorbimento osseo per il rilascio di calcio [36].

In secondo luogo, in gravidanza vengono rilasciati diversi ormoni, come il progesterone, gli estrogeni e la relaxina, che agiscono sul rilassamento dei legamenti. Questo rilassamento può portare a instabilità del cingolo pelvico, abbinata a dolore pelvico, con conseguente limitazione della mobilità e problematiche durante il parto [37].

Un altro fattore che potrebbe contribuire ad aumentare il rischio di OP e fratture in gravidanza è la familiarità: gravide con madri che hanno subito una frattura hanno una maggiore probabilità di incorrere esse stesse in una frattura da fragilità [38].

Linee guida per la prevenzione ed il trattamento dell'OP in gravidanza non sono state precisamente elaborate, ma bisognerebbe creare le condizioni affinché la donna si predisponga in maniera corretta alla gravidanza. In primis, assicurarsi che segua

un'alimentazione adeguata e completa di tutti i nutrienti, necessari alla crescita del feto e al mantenimento di un buono stato di salute. Inoltre, sarebbe opportuno riconoscere i probabili sintomi di una frattura vertebrale, come il dolore forte alla schiena, e garantire una valutazione ed un trattamento tempestivi, ove necessario [36].

1.2.4 LA PREVENZIONE

La prevenzione dell'OP comprende una serie di interventi volti ad impedire o rallentare la comparsa di tale patologia. Si parla di prevenzione primaria quando ci si rivolge alla popolazione generale, senza analizzare il rischio del singolo soggetto, con campagne di sensibilizzazione e di screening, di prevenzione secondaria, che mira al singolo soggetto, per una diagnosi precoce della malattia tramite strumentazioni ed algoritmi specifici, e di prevenzione terziaria per i pazienti che hanno già subito una frattura e hanno pertanto manifestato clinicamente i segni della fragilità scheletrica, per i quali si interviene attraverso un percorso mirato di riabilitazione [39].

Innanzitutto, bisogna ricordare che nell'arco della vita l'osso subisce dei cambiamenti, in termini di qualità e microarchitettura, che dipendono dai fisiologici processi di rimodellamento osseo e che possono essere influenzati da diversi fattori esterni. Come mostrato in Figura 5, durante la pubertà il tessuto osseo è nella fase di accrescimento, per poi arrivare al PBM intorno ai 25 anni di età, sia per i maschi, sia per le femmine. Dopo la fase di plateau nell'età adulta, inizia un periodo di declino che per gli uomini è più graduale, mentre per le donne si velocizza specialmente dopo la menopausa.

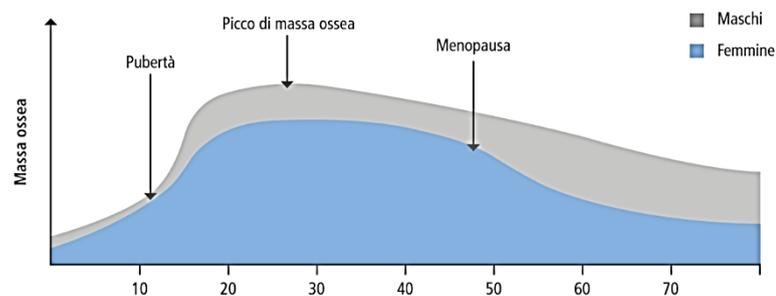


Figura 5. Massa ossea nel corso della vita, tratto da IOF Compendio sull'Osteoporosi [4].

Il PBM è determinato dal patrimonio genetico per un 60-80%, mentre il restante 20-40% è dovuto all'ambiente esterno, ovvero l'alimentazione, l'attività fisica, l'abitudine al fumo e il consumo di alcol [4]. Il raggiungimento ottimale del PBM in giovane età rappresenta uno dei fattori che permette di ritardare lo sviluppo di OP nell'età adulta, in particolar modo dopo la menopausa, e per questo motivo l'OP è stata definita una malattia pediatrica con conseguenze geriatriche [40].

È stato stimato che un aumento del 10% del PBM nei bambini riduce del 50% il rischio di una frattura osteoporotica da adulto.

Gli scopi della prevenzione, ad ogni livello essa sia, sono:

- ottimizzare il PBM;
- mantenere una buona massa ossea nel tempo;
- ritardare il più possibile la perdita di BMD;
- ridurre l'incidenza della prima frattura in pazienti con OP;
- ridurre l'incidenza di ulteriori fratture in soggetti con OP severa complicata da fratture [39].

Per questo motivo, la prevenzione inizia già in utero, con una dieta ed uno stile di vita sani in gravidanza.

L'OMS sottolinea l'importanza di una dieta equilibrata e afferma che il corretto intake dei nutrienti fondamentali in gravidanza si ottiene tramite il consumo di una varietà di alimenti che comprendono verdure, frutta, carne, pesce, legumi, noci, cereali integrali e latticini [41]. Inoltre, un ruolo importante in questo particolare momento nella vita di una donna viene giocato da uno stile di vita salubre, che escluda il fumo e il consumo di bevande alcoliche e che comprenda l'attività fisica aerobica ed esercizi di potenziamento della forza muscolare per mantenere una buona forma fisica, scegliendo sempre movimenti con basso rischio di perdita d'equilibrio e di trauma fetale [42]. Molti studi riconoscono l'importanza dell'alimentazione durante il periodo della gravidanza ed evidenziano che la dieta potrebbe costituire un fattore determinante nel futuro sviluppo di osteoporosi materna e nella corretta formazione ossea nei nascituri [43].

Dopo la nascita, lo scheletro continua l'accrescimento e, poiché l'infanzia e l'adolescenza sono periodi di massimo sviluppo, i fabbisogni dietetici di macro- e micro-nutrienti sono aumentati. Per questo motivo, durante queste fasi della vita è fondamentale seguire un'alimentazione completa in tutti i nutrienti, ma specialmente ottimizzare l'apporto di calcio. Molte sono le evidenze scientifiche che riconoscono il ruolo del calcio come minerale dai significativi effetti positivi per lo sviluppo della BMD [24]. Inoltre, si consiglia di mantenere un adeguato apporto sia di proteine, per evitare la perdita di massa muscolare e favorire la costruzione dell'osteoidi, sia di vitamina D, favorendo l'esposizione al sole e le attività all'aria aperta. Infine, la prevenzione passa anche attraverso lo stile di vita in generale: praticare quotidiano esercizio fisico, combattendo la sedentarietà, ed evitare l'esposizione al fumo passivo [4].

In età adulta ed avanzata, gli obiettivi principali sono di evitare una perdita prematura di BMD e mantenere lo scheletro in salute. Al fine di perseguirli, la prevenzione si basa su un'alimentazione bilanciata ed uno stile di vita salutare, applicando gli stessi consigli che sono validi durante la crescita. I principali nutrienti coinvolti nel mantenimento di una buona massa ossea sono, anche in questo caso, calcio, proteine e vitamina D. Il ruolo di altri micronutrienti, come magnesio, zinco, potassio, vitamina K, vitamina A e le vitamine del gruppo B, è stato studiato ampiamente [44]. Inoltre, l'astensione dal fumo, in questo

caso evitando sia quello passivo che quello attivo, ed un consumo moderato di alcolici, sono accorgimenti comportamentali che rallentano la perdita di massa ossea e mantengono sano lo scheletro. All'interno di uno stile di vita benefico, l'attività fisica gioca un ruolo determinante: numerosi studi hanno confermato che l'esercizio fisico regolare e costante permette non solo di rafforzare i muscoli che sostengono le ossa, ma va ad agire in maniera diretta per il mantenimento della BMD. Sebbene i risultati degli studi siano controversi, è stato osservato che in donne in post-menopausa l'attività fisica con carico è in grado di prevenire l'1% della perdita minerale ossea annuale ed il beneficio maggiore è stato riportato sulla colonna vertebrale e con gli esercizi d'impatto [45], [46]. Inoltre, l'attività fisica permette di migliorare l'equilibrio e la postura, riducendo il rischio di caduta e quindi di frattura [45]. Gli esercizi maggiormente consigliati per avere un effetto sullo scheletro sono quelli di resistenza, quelli in cui la massa muscolare viene rafforzata ad esempio sollevando piccoli pesi, e da carico, quelli in cui le nostre gambe sostengono il peso del corpo, ad esempio camminare, correre, saltare. Queste tipologie di allenamento aumentano la secrezione di ormoni anabolici (GH, IGF-1, estrogeni, PTH), che inducono una risposta adattativa da parte dell'osso [47].

Nella terza età, in particolar modo, la scelta dell'esercizio fisico da praticare deve essere adattata alle capacità del singolo individuo, senza metterlo a rischio di frattura. È sempre bene evitare la sedentarietà, scegliendo anche piccole attività quotidiane, per non andare incontro alla sarcopenia [48].

La prevenzione terziaria si sta sviluppando in maniera più decisa negli ultimi anni, sia per la gestione dell'OP, sia per la prevenzione di future fratture da fragilità. In molti paesi sono stati istituiti due modelli complementari di assistenza: i Servizi Ortogeriatrici (OGS) ed i Fracture Liaison Services (FLS). I servizi OG si focalizzano sul trattamento dei pazienti con frattura femorale, tramite un'equipe di specialisti che provvedono a prevenire una seconda frattura e a trattare la patologia. I FLS sono rivolti ai pazienti già fratturati, per la prevenzione secondaria di frattura ed un trattamento tempestivo dell'OP secondo le linee guida cliniche nazionali [4].

1.3 IL RUOLO DELL'ALIMENTAZIONE

1.3.1 I MACRONUTRIENTI

Tra tutti i macronutrienti, le proteine hanno mostrato di avere un effetto benefico sull'osso. L'esistenza di una correlazione diretta tra l'introito proteico e la BMD è ancora controversa, tuttavia le proteine hanno un ruolo importante per la crescita, lo sviluppo e il mantenimento dello scheletro [49].

L'apporto dietetico di proteine fornisce al corpo una fonte di aminoacidi fondamentale per costruire la matrice ossea. Inoltre, aumentano i livelli ematici dell'IGF-1, che va a

contribuire alla formazione dell'osso, specialmente nella fase della crescita. È stato osservato che nei bambini e negli adolescenti le proteine servono ad ottimizzare il raggiungimento del PBM, purché venga garantito anche un introito adeguato di calcio [50].

In età avanzata, una quantità bilanciata di proteine permette di mantenere una buona BMD e di evitare la perdita di tessuto muscolare, causa di sarcopenia. Inoltre, alcuni studi mostrano anche una riduzione del rischio di frattura, specialmente dell'anca [51].

Il fabbisogno proteico giornaliero, raccomandato dalla Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU), per i bambini è uguale nei maschi e nelle femmine e si attesta nel range tra 1.32 (6-12 mesi) e 0.99 (7-10 anni) grammi per kg di peso corporeo. Per gli adolescenti (11-17 anni), l'assunzione giornaliera raccomandata cambia in base al genere: per i maschi si consigliano circa 0.95 g/kg di peso corporeo, mentre per le femmine si consigliano circa 0.92 g/kg di peso corporeo. Per gli adulti e gli anziani, si raccomanda un'assunzione giornaliera di 0.9 g/kg di peso corporeo [52].

I lipidi dovrebbero contribuire al 20-35% dell'energia apportata con l'alimentazione, a partire dai 4 anni e per tutte le fasce d'età, senza distinzione di genere [52]. Il loro ruolo sulla salute dell'osso non è ancora stato del tutto chiarito, ma sembra che un elevato intake sia associato ad un maggiore rischio di frattura e ad una riduzione della BMD, specialmente a livello vertebrale. Sono stati ipotizzati diversi meccanismi attraverso cui i lipidi vanno ad incidere negativamente sullo scheletro e uno di questi sembra sia dovuto all'iperinsulinemia, generata dall'aumentato assorbimento di grassi e zuccheri a livello intestinale, che potrebbe causare ipercalcemia, un aumento dei livelli di magnesio nelle urine e di conseguenza un bilancio negativo di calcio e magnesio. Un'altra ipotesi prevede che, aumentando l'introito dietetico di grassi, venga ridotto l'assorbimento intestinale di calcio, che viene "intrappolato", ma questo meccanismo sembra dipendere anche dalla tipologia di grassi che vengono assunti (lunghezza della catena, stato di insaturazione ed ossidazione, posizione della molecola di glicerolo). Infine, è stato supposto che un aumento nella quota di lipidi si accompagni ad un maggiore introito di retinolo, che va a stimolare il riassorbimento osseo.

Indipendentemente da quale sia la motivazione, è certo che una dieta sbilanciata nell'apporto lipidico va ad inficiare l'introito di altri nutrienti importanti per la salute dello scheletro, esponendolo al rischio di frattura [49].

La SINU raccomanda un introito energetico giornaliero rappresentato dal 45-60% da carboidrati, consigliando di limitare il consumo di zuccheri semplici ad una quota energetica inferiore al 15% del totale e di assicurare almeno 25 g al giorno di fibra alimentare, preferendo alimenti naturalmente ricchi in fibra quali cereali integrali, legumi, frutta e verdura [52]. Molti studi hanno investigato la relazione tra carboidrati e massa

ossea, focalizzando l'attenzione proprio sulla fibra che risulta limitare l'assorbimento intestinale di calcio. Tuttavia, non è stata trovata una relazione statisticamente significativa tra l'assunzione di fibra e la riduzione della BMD [49]. D'altro canto, di crescente interesse è la relazione tra il metabolismo degli zuccheri e la fragilità ossea. L'OP è stata riconosciuta come una delle complicazioni del Diabete Mellito di tipo 2 (DM2), poiché con questa malattia metabolica i livelli circolanti dei “prodotti finali della glicazione avanzata” (Advanced Glycation End products – AGEs) e di omocisteina aumentano e vanno ad influire direttamente sull'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti, favorendo il riassorbimento osseo piuttosto che la formazione [53].

Alla luce di queste conoscenze, risulta quantomai cruciale la sensibilizzazione della popolazione sui temi di un'alimentazione bilanciata in tutti i suoi componenti.

1.3.1 IL CALCIO

Il calcio rappresenta il principale elemento che costituisce la matrice del tessuto osseo. Il 99% del calcio corporeo si trova, infatti, depositato nello scheletro e nei denti, mentre il restante 1% è presente nel liquido intracellulare ed extracellulare dei tessuti ed è coinvolto in funzioni fondamentali, come la trasmissione cellulare di segnali.

Il ruolo del calcio nell'organismo non è solo quello di mineralizzazione dello scheletro, ma anche di permettere il funzionamento del sistema nervoso, la coagulazione del sangue, l'attivazione enzimatica, la secrezione ghiandolare di ormoni, la contrazione neuromuscolare e la funzionalità vascolare [44].

Dal momento che questo minerale esplica funzioni di notevole importanza, i livelli ematici vengono tenuti costantemente sotto controllo, tramite un meccanismo che coinvolge due ormoni (paratormone e calcitonina), tre apparati (scheletrico, renale e gastrointestinale) e la vitamina D. I recettori sensibili al calcio (CaSR) sono situati sulle ghiandole paratiroidi ed agiscono come sensori estremamente precisi dei livelli di calcio nel sangue. Quando il livello di calcio nel sangue è troppo basso, viene rilasciato il PTH, che ne aumenta i livelli attraverso tre differenti meccanismi: la stimolazione degli osteoclasti che riassorbono l'osso e rilasciano il calcio; l'aumento dell'assorbimento gastrointestinale del calcio, tramite l'attivazione della vitamina D, ed il riassorbimento di calcio dai reni. Al contrario, quando i livelli sono troppo elevati, va ad attivarsi la calcitonina, che riduce l'attività degli osteoclasti e quindi il riassorbimento, e favorisce l'escrezione renale di calcio, inibendone il riassorbimento [54].

Moltissimi studi hanno ormai riconosciuto il ruolo chiave del calcio per la salute delle ossa durante tutto il corso della vita, sia perché contribuisce alla corretta formazione dello scheletro nei bambini e negli adolescenti, sia perché permette il mantenimento della massa ossea in età adulta ed avanzata [24], [55].

Il fabbisogno giornaliero di calcio per la popolazione adulta è di 1000 mg, ma questo può

variare a seconda della fascia d'età, del genere e delle condizioni fisiologiche. Nella Tabella 1 sono riportati i valori di riferimento per la popolazione italiana elaborati dalla SINU [52]. Un aumentato fabbisogno si riscontra negli adolescenti, sia maschi che femmine, poiché si trovano nella fase di sviluppo più rapido e necessitano di maggiori quantità di calcio per permettere una corretta mineralizzazione. Inoltre, dopo i 60 anni di età per gli uomini e, in generale, dopo la menopausa per le donne, si raccomanda un introito giornaliero di 1200 mg, per far fronte alle perdite dovute ad un più rapido processo di riassorbimento osseo. Per la donna, anche la gravidanza rappresenta un periodo molto delicato, in cui i fabbisogni nutrizionali variano notevolmente. Durante il terzo trimestre avviene gran parte dello sviluppo osseo nel feto, processo che richiede un totale di 30 g di calcio e per far fronte a tale richiesta l'assorbimento intestinale di calcio della madre aumenta e un introito troppo basso può essere un fattore di rischio per una bassa massa ossea nei neonati e per una perdita eccessiva nella gestante [44], [56]. Inoltre, è stato recentemente riconosciuto il ruolo del calcio nella prevenzione della pre-eclampsia (PE): la Federazione Internazionale di Ginecologia ed Ostetrica (FIGO) ha riportato tra le raccomandazioni di pratica clinica per la prevenzione della PE l'ottimizzazione dell'introito di calcio, specialmente per quelle donne con un apporto molto basso (≤ 800 mg/die) [57].

Le principali fonti alimentari di calcio sono il latte ed i suoi derivati. Tutto il latte contiene calcio nelle stesse quantità, sia che si tratti di latte intero, parzialmente o totalmente scremato, fresco o a lunga conservazione. I formaggi stagionati contengono maggiori quote di calcio rispetto a quelli freschi, ma hanno anche più lipidi, perciò se ne consiglia un consumo moderato (2-3 volte alla settimana) e con porzioni adeguate: 30-50 grammi per i formaggi stagionati e 70-100 grammi per quelli freschi [58]. Tra i latticini, lo yogurt e la ricotta rappresentano una valida alternativa, che può implementare l'introito alimentare di calcio giornaliero. Oltre ai prodotti lattiero-caseari, anche numerosi tipi di vegetali sono fonte di calcio: alcuni tipi di verdure, come il radicchio verde, i broccoli, il cavolo nero, alcune varietà di frutta secca, come le mandorle, i semi di sesamo, che possono essere consumati come tali o sottoforma di salsa tahina. Per i vegetariani, una valida alternativa può essere il tofu cagliato con calcio, oppure alcune tipologie di fagioli, come gli azuki. Inoltre, il pesce intero in scatola, come le sardine, offre una buona quantità di questo minerale [44]. Infine, un'altra fonte di calcio spesso ignorata è l'acqua: le acque minerali ricche di calcio si definiscono tali perché contengono almeno 150 mg/L di calcio [59].

		Ca (mg)	Vitamina D (μg) ***
LATTANTI	<i>6-12 mesi</i>	260*	10
BAMBINI- ADOLESCENTI			
	<i>1-3 anni</i>	700	15
	<i>4-6 anni</i>	900	15
	<i>7-10 anni</i>	1100	15
Maschi	<i>11-14 anni</i>	1300	15
	<i>15-17 anni</i>	1300	15
Femmine	<i>11-14 anni</i>	1300	15
	<i>15-17 anni</i>	1200	15
ADULTI			
Maschi	<i>18-29 anni</i>	1000	15
	<i>30-59 anni</i>	1000	15
	<i>60-74 anni</i>	1200	15
	<i>≥ 75 anni</i>	1200	20
Femmine**	<i>18-29 anni</i>	1000	15
	<i>30-59 anni</i>	1000	15
	<i>60-74 anni</i>	1200	15
	<i>≥ 75 anni</i>	1200	20
GRAVIDANZA		1200	15
ALLATTAMENTO		1000	15

Tabella 1. Livelli di assunzione di riferimento per la popolazione italiana. Assunzione raccomandata per la popolazione (Population Reference Intake, PRI) di calcio.

*Assunzione adeguata (Adequate Intake, AI).

**Nelle donne in menopausa che non sono in terapia estrogenica la PRI è di 1200 mg.

***La vit. D è espressa come colecalciferolo (1 μg di colecalciferolo = 40 IU vit. D). La PRI considera sia gli apporti alimentari sia la sintesi endogena nella cute.

È stato dimostrato che il calcio presente in tali acque è biodisponibile ed assorbibile tanto quanto quello contenuto nei latticini [60]. Il vantaggio sta nel fatto che l'acqua è un alimento privo di calorie, grassi o altri nutrienti che possono poi andare a sbilanciare

l'apporto nutrizionale giornaliero, ed è naturalmente priva di lattosio, perciò può essere consumata anche da chi ne è intollerante [61]. Nella Tabella 2 vengono riportati i valori di calcio dei diversi alimenti.

ALIMENTO	CONTENUTO DI CALCIO PER 100 g
LATTE (pastorizzato)	120 mg
YOGURT	120 mg
FORMAGGI	
Parmigiano	1159 mg
Pecorino	607 mg
Emmenthal	1145 mg
Gorgonzola	401 mg
Ricotta di pecora	166 mg
Ricotta di vacca	295 mg
Mozzarella	350 mg
GELATO FIOR DI LATTE	85 mg
PESCE E FRUTTI DI MARE	
Sardine	540 mg
Alici o acciughe	148 mg
Calamari	144 mg
Polpo	144 mg
Gamberi	110 mg
UOVA DI GALLINA	48 mg
VERDURE E LEGUMI	
Cavolo cappuccio verde crudo	60 mg
Rape crude	40 mg
Soia secca	257 mg
Cicoria di campo cruda	74 mg
Ceci secchi	142 mg
Fagioli crudi	135 mg
Spinaci crudi	78 mg
Finocchi crudi	45 mg
Broccolo a testa crudi	28 mg
ERBE AROMATICHE E SPEZIE	
Basilico	250 mg
Salvia	600 mg
Origano fresco	310 mg
Rosmarino	370 mg
Cannella	1228 mg
FRUTTA SECCA	
Mandorle dolci secche	240 mg
Noci	131 mg
Fichi secchi	186 mg
ACQUE MINERALI	150-500 mg

Tabella 2. Livelli approssimativi di calcio presente negli alimenti.

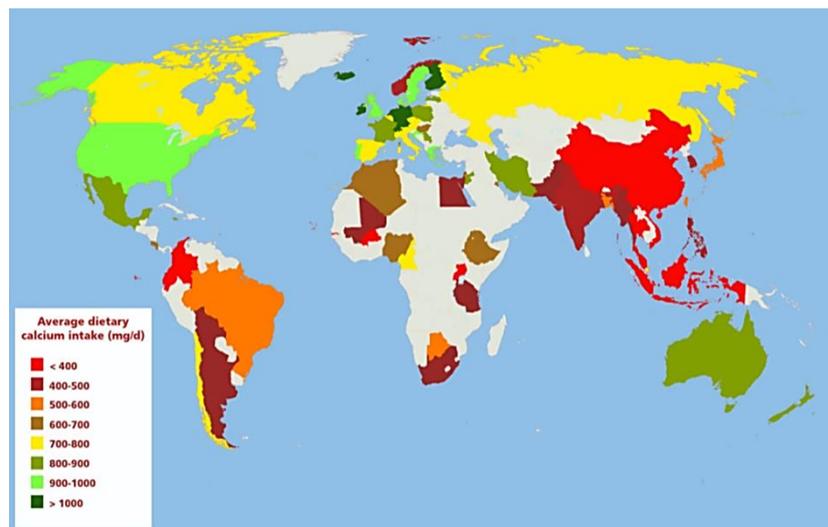


Figura 6. Mappa globale dell'introito medio di calcio nel mondo, tratto da "Global dietary calcium intake among adults: a systematic review" [62].

Nonostante l'apporto dietetico di calcio sia fondamentale per la salute dello scheletro, una recente revisione dell'International Osteoporosis Foundation (IOF) ha mostrato che nei 74 paesi del mondo studiati, l'introito medio di calcio risulta essere compreso tra 175 e 1233 mg/die, con valori anche abbondantemente al di sotto di quanto raccomandato per la popolazione adulta. Solo nel Nord Europa si riscontrano valori medi che superano i 1000 mg giornalieri [62], vedi Figura 6.

In Italia, lo studio INRAN-SCAI 2005-2006, su donne e uomini di età compresa tra 18 e 65 anni, riporta che l'introito medio di calcio nella popolazione maschile è di 799 ± 337 mg/die, mentre nella popolazione femminile è di 730 ± 277 mg/die, entrambi inferiori a quanto previsto per la popolazione adulta [63]. Dal momento che non si raggiungono i livelli di assunzione raccomandata, diventano quanto mai fondamentali le indagini alimentari, volte sia ad inquadrare in tempo reale la situazione della popolazione, sia ad elaborare campagne di sensibilizzazione mirate alle diverse tipologie di soggetti. Il *Food Frequency Questionnaire* (FFQ) elaborato da Montomoli et al. per la valutazione dell'intake di calcio è uno strumento validato ed affidabile al fine di condurre questo tipo di indagini alimentari [64].

1.3.3 LA VITAMINA D

La vitamina D è un nutriente fondamentale per la salute dello scheletro, dimostrando un'azione sinergica con il calcio per lo sviluppo ed il mantenimento di una massa ossea ottimale.

Diversi studi hanno provato che la supplementazione con vitamina D in bambini [65] ed adolescenti [66], con una quota giornaliera tra le 200 e le 400 unità internazionali (UI), favorisce l'aumento del contenuto minerale osseo (Bone Mineral Content, BMC) a livello

vertebrale e femorale. D'altronde, è ormai noto che una carenza di vitamina D è associata alla progressione di alcune patologie croniche, come l'OP, le malattie cardiovascolari, le patologie autoimmuni, il rachitismo e l'osteomalacia [67], [68].

Nella popolazione adulta ed in età avanzata, la vitamina D gioca un ruolo importante per favorire l'assorbimento intestinale di calcio. Anche se non sono stati chiariti i meccanismi con cui le diverse forme di supplementi vadano ad agire, un introito adeguato di vitamina D permette di migliorare la BMD e di ridurre il rischio di frattura da fragilità ossea [69].

Le donne in gravidanza hanno necessità nutrizionali specifiche, anche per quanto riguarda la vitamina D [70]. Lo studio clinico randomizzato MAVIDOS (UK Maternal Vitamin D Osteoporosis Study) ha mostrato che non esisteva alcuna differenza nel BMC tra figli di madri che avevano assunto una supplementazione pari a 1,000 UI al giorno di colecalciferolo (vitamina D₃) rispetto ai figli di madri che avevano assunto un placebo, ciò nonostante un'analisi secondaria relativa alle nascite avvenute nei mesi invernali, ha verificato un aumento di 0.5 deviazioni standard (DS) nella BMC neonatale tra figli di madri supplementate rispetto alle madri trattate con placebo [71]. Pertanto, dai risultati di questo studio si può concludere che è bene valutare la possibilità di un'integrazione specifica, in base alla stagione in cui si affronta il periodo gestazionale.

Secondo quanto riportato dalla SINU, la quantità giornaliera di assunzione raccomandata è di 15 µg (600 UI) per la popolazione adulta, con necessità aumentate dopo i 75 anni d'età (20 µg, ovvero 800 UI), (Tabella 1) [52]. La PRI considera sia gli apporti alimentari, sia la sintesi endogena nella cute.

Infatti, bisogna ricordare che la sintesi avviene principalmente a livello cutaneo, grazie all'esposizione ai raggi solari: i metaboliti del colesterolo (7-deidrocolesterolo), tramite l'energia delle radiazioni UV, vengono convertiti in pre-vitamina D e poi in vitamina D₃ (colecalciferolo). Il colecalciferolo viene poi attivato tramite due ossidrilazioni a livello epatico e a livello renale, fino a diventare 1,25(OH)₂-colecalciferolo (Figura 7) [72].

L'apporto alimentare di vitamina D è pressoché irrisorio, dal momento che la quota contenuta negli alimenti è minima. Le principali fonti sono i pesci grassi (salmone e tonno), il tuorlo d'uovo, il latte e i derivati [49].

Dal momento che l'esposizione al sole costituisce la fonte primaria di vitamina D, uno stile di vita che si svolge sempre più in ambienti chiusi sta determinando un'insufficienza a livello mondiale. Lo studio dello stato di vitamina D viene effettuato tramite valutazione dei livelli ematici di 25(OH)-vitamina D₃. L'IOF ha rivelato che, nonostante siano ancora mancanti i dati di alcune zone del mondo, nella popolazione adulta c'è una diffusa carenza di vitamina D [73].

Questa problematica è particolarmente significativa nelle donne in gravidanza. Nel febbraio del 2015 la Commissione per le raccomandazioni dietetiche (Dietary Guidelines

Advisory Committee, DGAC) ha pubblicato un Report nel quale ha evidenziato che i livelli di assunzione di alcuni nutrienti, tra cui calcio e vitamina D, erano notevolmente al di sotto del fabbisogno medio stimato (Estimated Average Requirement, EAR) e dell'Introito Adeguato (Adequate Intake, AI), previsti dall'Istituto di Medicina (IOM) degli Stati Uniti. In particolare, ha constatato che proprio le carenze di calcio e la vitamina D risultavano un "problema di salute pubblica", mostrando che il 90% delle donne in gravidanza avevano introiti di vitamina D inferiori all'EAR [44].

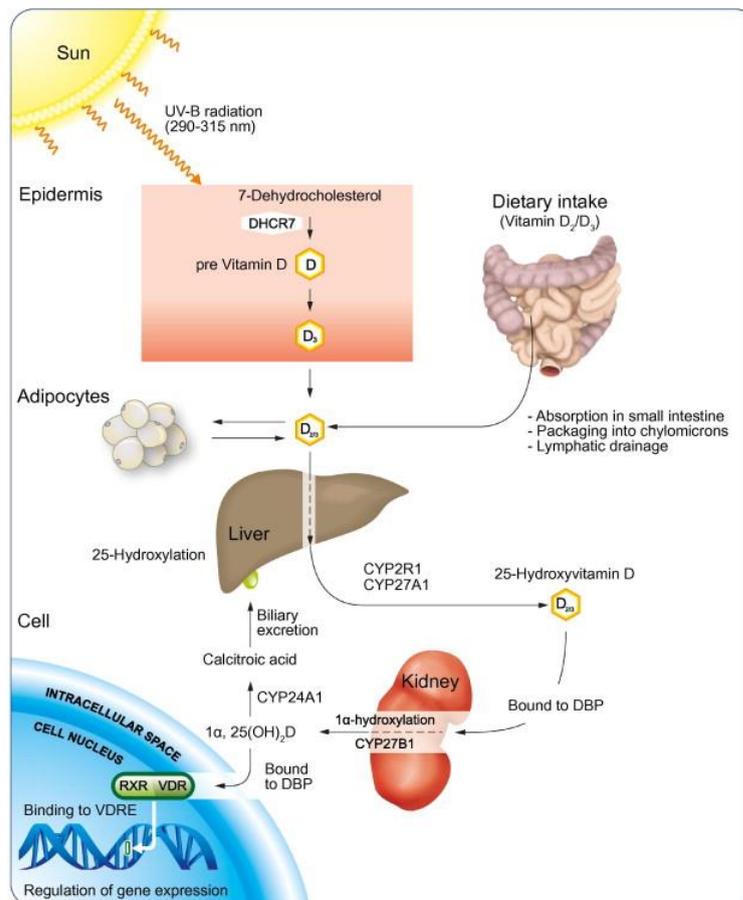


Figura 7. Sintesi della vitamina D, tratto da "D-livering the message: The importance of vitamin D status in chronic liver disease" [72].

Azioni mirate, quali la fortificazione degli alimenti con vitamina D e la somministrazione di supplementi specifici, sono state intraprese al fine di migliorare tale quadro, ma ancora molto c'è da fare per risolvere il problema della carenza globale.

1.3.4 GLI ALTRI MICRONUTRIENTI

Il ruolo degli altri micronutrienti sulla salute dello scheletro è in continua valutazione e diversi studi hanno indagato se e quali potessero essere davvero benefici per l'osso.

Tra i minerali, sono stati presi in considerazione il magnesio, il fosforo, il potassio, lo zinco ed il rame. Il magnesio si associa ad una migliore qualità dell'osso, in quanto è

attivamente coinvolto nel metabolismo del calcio: stimola la proliferazione degli osteoblasti e la costruzione dei cristalli di idrossiapatite. Le principali fonti alimentari di magnesio sono le verdure a foglia verde, i legumi, la frutta secca, i cereali integrali, il pesce ed alcuni tipi di frutta disidratata (come le prugne secche) [24].

Anche il fosforo è un componente essenziale del tessuto osseo e ne permette un corretto accrescimento. Tuttavia, un suo eccesso è deleterio, poiché porta ad una riduzione della forma attiva della vitamina D, riducendo l'apporto di calcio, e stimolando la secrezione di PTH. Inoltre, bisogna ricordare che calcio e fosforo competono vicendevolmente nell'assorbimento intestinale, pertanto l'assorbimento del calcio alimentare può essere ottimizzato o limitato dal concomitante apporto di fosforo alimentare. Per questo motivo, è stato stabilito un rapporto equilibrato di assunzione tra calcio e fosforo alimentare, ovvero $Ca/P = 3:1$ o $2:1$ [74], [52]. Le fonti alimentari di fosforo sono latte e derivati, cereali integrali, uova, alcuni tipi di pesce (spigola, orata), legumi, frutta secca [49].

Il potassio è coinvolto nell'omeostasi del calcio, in quanto ne riduce l'escrezione renale. Lo zinco, invece, gioca un ruolo importante nel rinnovamento e nella mineralizzazione del tessuto osseo. Infatti, quest'ultimo è un cofattore enzimatico per alcune metalloproteasi, come la fosfatasi alcalina, necessaria per la mineralizzazione e la collagenasi, essenziale per lo sviluppo del collagene. Le fonti alimentari di potassio sono i legumi, la frutta disidratata (albicocche, datteri), la frutta secca, le patate, alcune verdure a foglia verde, mentre gli alimenti ricchi in zinco sono la carne (rossa e bianca), i cereali integrali, i legumi, la frutta disidratata (come le prugne secche) [44].

Infine, il rame, come lo zinco, è un co-fattore enzimatico coinvolto nello sviluppo delle macromolecole di collagene ed elastina, per cui una carenza può portare a problematiche alla cartilagine ed alle ossa [49].

Tra le vitamine, è stato studiato l'effetto della vitamina C, di alcune vitamine del gruppo B e della vitamina K. In alcune ricerche, la vitamina C è risultata associarsi positivamente ad un maggior BMC in soggetti maschi adolescenti e ad uno spessore e forza aumentati in ragazze, se associata allo zinco. La vitamina C si trova in alcuni tipi di frutta, come kiwi, fragole, agrumi, e di ortaggi (broccoli, cavoli, pomodori, peperoni) [24].

Le vitamine del gruppo B, come i folati, la B6 e la B12, hanno un ruolo fondamentale per il mantenimento dei livelli ematici di omocisteina. L'omocisteina è un amminoacido che, oltre ad aumentare il rischio cardiovascolare, può interferire con la sintesi del collagene. Pertanto, avere un'alimentazione che comprenda un consumo di verdure a foglia larga, come spinaci, cavolo nero, lievito di birra, germe di grano, fegato ed altre frattaglie e uova, garantisce un apporto costante di queste vitamine del gruppo B [44].

La vitamina K è necessaria per la formazione dell'osteocalcina, la proteina del tessuto osseo, seconda per abbondanza dopo il collagene. Una dieta ricca in vitamina K sembra

associarsi ad un maggiore BMC in bambini e adolescenti [24] e ad un minor rischio di frattura in età avanzata [44]. Pertanto, è importante introdurre alimenti come verdure a foglia verde, come lattuga, spinaci, cavolo, il fegato ed alcuni alimenti fermentati, come i formaggi fermentati e la soia fermentata (natto), e la frutta disidratata, come le prugne secche [44].

Nonostante le attuali ricerche, sono necessari ulteriori studi clinici per determinare l'impatto di questi micronutrienti sulla salute delle ossa.

1.4 LA DIETA MEDITERRANEA

1.4.1 CARATTERISTICHE ED ASPETTI BENEFICI

Il termine “Dieta Mediterranea” è stato ideato nel 1960 da Ancel Keys e da sua moglie Margaret, nel loro libro “How to Eat Well and Stay Well: the Mediterranean Way”. Il biologo e fisiologo statunitense Keys condusse un importante studio epidemiologico, conosciuto come “The Seven Countries Study”, per esaminare la relazione tra la dieta e la salute, specialmente quella cardiovascolare, confrontando la situazione di Italia, Grecia, Stati Uniti, Giappone, Finlandia, Olanda e Jugoslavia. La “dieta mediterranea” individuata da Keys non consisteva in un'alimentazione precisa, piuttosto in uno stile di vita, un modello culturale, caratterizzato dalla convivialità, dalla trasmissione del patrimonio culturale e dal dialogo interculturale [75].

Il tradizionale modello alimentare mediterraneo è caratterizzato da un'elevata assunzione di verdure, legumi, frutta fresca e frutta secca, cereali (che nel passato erano soprattutto integrali), dall'utilizzo dell'olio d'oliva come condimento, da un consumo moderato di pesce (a seconda della vicinanza al mare), da un medio-basso consumo di latticini (specialmente sotto forma di formaggi magri e yogurt), da un basso introito di carne e pollame e da un regolare ma moderato consumo di etanolo (primariamente come vino ai pasti) [76].

La letteratura scientifica ha ormai riconosciuto il ruolo della DM nella prevenzione di molte patologie cronico-degenerative. Ad oggi, solide evidenze mostrano che questo pattern alimentare è particolarmente efficace nel ridurre la mortalità (nel suo complesso), l'incidenza delle patologie cardiovascolari, l'incidenza di tumori (nel suo complesso), le patologie neurodegenerative ed il diabete. Inoltre, l'impatto della DM su altre variabili legate allo stato di salute, quale i livelli di colesterolo e trigliceridi, la presenza di citochine infiammatorie circolanti, la circonferenza della vita, il BMI e l'impatto su altre patologie gastrointestinali e respiratorie, sono in fase di studio e mostrano risultati promettenti con questo stile alimentare, ma non sono ancora significativi per stabilire una causalità [77].

Recenti revisioni sistematiche della letteratura hanno confermato un'associazione inversa tra l'aderenza alla DM e la mortalità, per tutte le cause. In particolare, è stato osservato che

una maggiore aderenza alla DM si correla ad un rischio minore di mortalità, specialmente nelle regioni del bacino mediterraneo [78]. Inoltre, gli effetti benefici di questo pattern alimentare sembrano essere attribuibili ad alcuni nutrienti, quali le vitamine, i minerali, la fibra alimentare e gli antiossidanti, presenti principalmente negli alimenti di origine vegetale (come verdura, frutta e cereali integrali), tipici della tradizionale DM ed all'acido oleico, presente in abbondanza nell'olio d'oliva [79]. Il consumo di questi alimenti risulta essere anche il principale fattore protettivo contro lo sviluppo di tumori. Una metanalisi aggiornata ha mostrato un'importante associazione inversa tra l'aderenza alla DM e sia la mortalità per cancro, sia il rischio di sviluppare diverse tipologie di tumori, specialmente quello al colon-retto. Inoltre, per la prima volta è stata rivelata anche una riduzione del rischio di cancro alla mammella del 6% [80].

Gli effetti benefici della DM sulla salute del sistema cardiovascolare sono stati ampiamente studiati e resi noti [81], [82]. Questo pattern alimentare si è mostrato capace di ridurre il rischio di infarto e patologie cardiovascolari, grazie non solo alla riduzione del tenore infiammatorio [83], ma anche del grasso epatico, che si correla a diversi problemi metabolici [84].

Infine, risulta essere molto interessante il ruolo della DM nella prevenzione delle patologie neurodegenerative. Una maggiore aderenza alla DM durante l'età adulta si associa a migliori performance cognitive nella mezza età [85]. Inoltre, negli anziani si è visto che seguire un pattern alimentare sano di stile mediterraneo permette di preservare la struttura e la funzionalità cerebrali e di rallentare il declino cognitivo [86]. L'effetto della DM viene amplificato se vengono controllati sia il diabete, sia la glicemia: in soggetti adulti con diabete, l'aderenza alla DM ed il controllo glicemico hanno permesso di ottimizzare la funzione cognitiva con solo due anni di trattamento [87].

In letteratura, sono stati presentati diversi indici di misurazione dell'aderenza alla DM, ognuno dei quali ha utilizzato una metodologia propria sia per la scelta degli alimenti da valutare, sia per il calcolo del punteggio di aderenza [77]. Il sistema di valutazione più recente è stato sviluppato da Sofi et al. e prevede una serie di domande su nove principali gruppi alimentari: frutta, verdura, cereali, legumi, pesce e prodotti ittici, carne e derivati, latticini, consumo di alcol, olio d'oliva [88]. Precedentemente, il questionario a 14 domande utilizzato nello studio PREDIMED è stato validato e si è dimostrato utile per l'elaborazione di uno score di aderenza alla DM, da poter essere utilizzato in maniera rapida durante la pratica clinica [89].

1.4.2 LA DIETA MEDITERRANEA E LA SALUTE DELL'OSSO

La maggior parte delle ricerche che indagano la potenziale relazione tra i fattori dietetici e la salute dello scheletro è basata sullo studio di particolari nutrienti, come il calcio e la vitamina D. Nonostante l'importanza dei singoli nutrienti, bisogna ricordare che questi

non vengono assunti isolatamente l'uno dall'altro, ma all'interno di un pattern alimentare che comprende diversi gruppi alimentari, caratterizzati da combinazioni di nutrienti e componenti bioattivi. Per questo motivo, c'è un crescente interesse a studiare l'impatto dei diversi stili dietetici sulla salute delle ossa e, in particolar modo, l'effetto della DM [90], [91].

L'incidenza di OP e delle fratture da fragilità è molto variabile nei paesi dell'Unione Europea, ma è stato osservato che è più bassa nell'area mediterranea [92]. Al fine di chiarire l'associazione tra la DM (e/o alcuni gruppi alimentari tipici di questo modello alimentare) e l'incidenza di fratture (specialmente quelle all'anca), sono stati intrapresi diversi studi osservazionali prospettici di grande rilievo. Il progetto CHANCES [93], l'EPIC [92] e l'EPIC-elderly study [94], il Women's Health Initiative [95] e alcuni studi sulla popolazione svedese [96], [97] riportano che l'incidenza di fratture da fragilità ossea (nei diversi gruppi di popolazione studiati) è più bassa in coloro che si sono dimostrati più aderenti allo stile di vita mediterraneo. Tuttavia, non viene dimostrata una diretta associazione di causa-effetto tra l'aderenza alla DM e la riduzione di incidenza delle fratture.

Di recente, alcune revisioni della letteratura e relative metanalisi hanno confermato che una maggiore aderenza alla DM si associa ad un ridotto rischio di frattura e ad un valore medio di BMD più alto [98], [99]. L'effetto benefico di un pattern alimentare mediterraneo sulla salute dello scheletro risulta più controverso quando si vanno ad analizzare nel complesso gli studi osservazionali. Infatti, la revisione sistematica di Kunustor et al. riporta che sono ancora limitati gli studi osservazionali che supportano l'effetto benefico dell'aderenza allo stile di vita mediterraneo sull'incidenza di fratture all'anca [100].

Nonostante i risultati ancora contrastanti, l'interesse a studiare l'impatto dell'alimentazione e, in particolare, della DM rispetto alla salute dell'osso è molto alto. Studi di coorte di notevole rilevanza hanno indagato a vari livelli il ruolo dei nutrienti e/o dei fattori di rischio legati ad una scorretta alimentazione sulla mineralizzazione ossea, coinvolgendo popolazioni di diverse aree del mondo. Un recente studio longitudinale di coorte di Benetou et al. ha preso in esame 140,775 soggetti adulti da 5 coorti (Europa e Stati Uniti) per valutare il livello di aderenza alla DM e l'incidenza di fratture. Da tale popolazione è emerso che l'incidenza di frattura di femore è risultata più bassa in coloro con medio ed alto livello di aderenza alla DM rispetto a coloro con bassa aderenza [101].

La DM si è, pertanto, dimostrata efficace nel mantenere un buono stato di salute sul sistema muscoloscheletrico in bambini, adolescenti e adulti. Tuttavia, proprio per la grande variabilità dei metodi utilizzati nelle diverse ricerche, risulta difficile stabilire con esattezza i motivi per cui questo stile alimentare possa portare dei benefici per la salute

muscoloscheletrica [102]. Dalle attuali ricerche emerge che il consumo di alcuni gruppi alimentari (e di nutrienti in essi contenuti), come ad esempio frutta, verdura, latticini a basso tenore di grassi, pesce, sia fondamentale per il mantenimento di una buona salute dell'osso [103], [104], [105], [106]. L'utilizzo dell'olio extravergine d'oliva (Extra-Vergin Oli, EVO) e quindi l'introito di fenoli tipici di questo condimento, si è dimostrato benefico per prevenire la perdita di massa ossea. Uno studio *in vitro* di García-Martínez et al. ha rivelato che i fenoli dell'EVO possono modulare la capacità proliferativa e la maturazione cellulare degli osteoblasti, incrementando l'attività della fosfatasi alcalina e depositando ioni calcio nella matrice extracellulare [107]. Pochi studi sono stati, invece, eseguiti sull'uomo e, tra questi, Fernández-Real et al. hanno valutato gli effetti del consumo di olio d'oliva sui livelli circolanti di osteocalcina (OC). Una DM arricchita con EVO per due anni si è associata ad un aumento significativo dell'OC ematica e delle concentrazioni del Propeptide N-terminale del procollagene di tipo 1 (marker di formazione ossea), suggerendo un effetto protettivo sull'osso [108].

I risultati finora ottenuti sono sicuramente preliminari [109], ma mostrano un quadro ben delineato sulle proprietà salutistiche della DM, capace di prevenire e rallentare la progressione delle patologie cronico-degenerative, tra cui l'OP.

1.4.3 LA DIETA MEDITERRANEA IN GRAVIDANZA

Gli stimoli ambientali a cui il feto viene esposto in utero influenzano in maniera determinante il rischio di sviluppare diverse patologie croniche in età adulta. L'alimentazione materna è il primo fattore che può modificare il decorso della vita del nascituro, non solo durante la gravidanza, ma anche per l'infanzia e l'adolescenza [110]. Questo aspetto risulta determinante anche per il corretto sviluppo dello scheletro e per la prevenzione dell'OP. Infatti, seppur gli studi non forniscano dei rapporti causa-effetto, l'introito di nutrienti da parte della madre risulta associarsi alla massa ossea del nascituro, fino all'acquisizione del picco di massa ossea ottimale. Alcuni studi longitudinali di coorte hanno mostrato che un consumo bilanciato dei diversi gruppi alimentari in gravidanza garantisce l'assunzione adeguata di calcio, fosforo, magnesio, proteine ed alcune vitamine (tra cui la D, i folati e la B12), che si associa positivamente ad un maggiore BMC durante l'infanzia e ad una maggiore BMD durante l'adolescenza. Nonostante non vengano delineati chiaramente quali nutrienti vadano ad incidere maggiormente sulla massa ossea, risulta evidente che le scelte alimentari materne hanno un peso permanente su quello che sarà il corretto sviluppo dello scheletro [111], [112], [113].

Come precedentemente descritto, la DM è un pattern alimentare completo e prevede il consumo di tutti i gruppi alimentari, secondo porzioni e frequenze bilanciate [114]. Diversi studi hanno riportato l'effetto benefico di questo stile dietetico sulle variabili della gravidanza, quali il diabete mellito gestazionale (Gestational Diabetes Mellitus, GDM), il

BMI, l'aumento di peso in gravidanza, la pre-eclampsia [115].

Per quanto riguarda il GDM, Assaf-Baluf et al. hanno mostrato che un intervento nutrizionale, basato sulla DM, in una popolazione di donne in gravidanza con GDM ha permesso di normalizzare la glicemia e di raggiungere uno stato simile alle donne senza GDM [116], [117]. A conferma di questi risultati, Izadi et al. hanno esplorato l'effetto non solo della DM, ma anche della dieta DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) sul GDM in una popolazione di 460 gravide, metà delle quali con GDM. Entrambi i modelli alimentari si sono associati ad un rischio minore di GDM [118]. Un'interessante osservazione è stata fatta nello studio di Osorio-Yáñez et al. su una popolazione di 3,414 gravide, delle quali 169 con GDM, nel quale è stato visto che un maggiore introito di calcio nel periodo peri-concezionale, specialmente con latticini magri, si associa ad un rischio minore di GDM [119].

Il BMI pregravidico e/o nel primo trimestre di gravidanza è un parametro legato non solo ad un rischio aumentato di GDM, ma anche ai disordini ipertensivi della gravidanza (hypertensive disorders of pregnancy, HDP). L'Australian Longitudinal Study on Women's Health ha rivelato che il BMI pregravidico è un fattore che influenza l'aderenza alla DM, portando di conseguenza ad una maggiore incidenza di GDM e HDP [120].

È ormai noto che le donne in gravidanza fanno fatica a raggiungere gli introiti raccomandati per i diversi nutrienti [121] e questo riguarda, in particolar modo, l'assunzione di calcio e vitamina D, che rivestono un ruolo cruciale per il corretto sviluppo osseo del feto e del futuro nascituro, oltre a garantire il mantenimento della mineralizzazione ossea materna [43].

Un recente studio di coorte danese ha indagato l'influenza di diversi stili dietetici in donne in gravidanza sulla mineralizzazione ossea e sull'incidenza di frattura all'avambraccio dei nascituri. I risultati non mostrano una correlazione diretta tra gli stili dietetici e l'incidenza di tali fratture, tuttavia è emerso che un'alimentazione caratterizzata da un basso consumo di frutta e verdura e da un elevato introito di grassi, carni processate e patate, risulta associarsi ad una maggiore incidenza di fratture all'avambraccio durante la prima infanzia [122].

A partire dalla letteratura, appare chiaro che sono necessari interventi mirati per favorire una corretta alimentazione in gravidanza, completa in tutti i nutrienti ed ottimale per la prevenzione delle patologie croniche nella prole.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio condotto nei tre anni di dottorato risulta essere importante poiché si pone nell'ampio panorama di ricerca per la prevenzione dell'OP e degli studi mirati a chiarire la relazione tra stili dietetici e salute dell'osso, specialmente in gruppi di popolazione in cui

molte possono essere le variabili coinvolte.

Lo scopo dello studio è stato di indagare quali fossero il livello di aderenza alla Dieta Mediterranea, l'introito alimentare di calcio e le abitudini nutrizionali in toto in una popolazione di donne nel periodo peri-menopausale e in una popolazione di donne in gravidanza, al fine, non solo di inquadrare le scelte alimentari in queste due fasi della vita femminile, ma anche di comprendere se il pattern dietetico risultasse influenzare la salute dello scheletro.

Nello specifico, l'indagine nelle donne in peri-menopausa ha previsto la valutazione del livello di aderenza alla Dieta Mediterranea, dell'introito alimentare di calcio e della composizione corporea in soggetti afferenti alla SOD di Malattie del Metabolismo Minerale ed Osseo per una prima visita endocrinologica, volta a valutare eventuali problematiche del metabolismo osseo.

Per quanto riguarda le donne in gravidanza, l'obiettivo principale è stato di valutare il livello di aderenza alla Dieta Mediterranea e l'introito alimentare di calcio per osservare sia come variassero le abitudini alimentari e l'intake di calcio nel corso della gravidanza, sia se l'acquisizione di corretti stili di vita venissero mantenuti anche dopo il periodo gestazionale.

Punto focale del progetto è stata la sensibilizzazione delle donne circa l'importanza di stili di vita corretti e in particolare di un adeguato apporto in calcio e vitamina D, non solo per garantire al feto un'adeguata mineralizzazione ossea, ma anche per educare la donna in tutte le fasi della propria vita, al fine di interferire positivamente sul rischio di insorgenza di fragilità ossea in età avanzata e, di conseguenza, sul rischio di fratture.

3. MATERIALI E METODI

3.1 DISEGNO DELLO STUDIO ED APPROVAZIONE DEL COMITATO ETICO

Lo studio condotto è stato di tipo osservazionale, prospettico, spontaneo, no profit. Per la popolazione di donne in peri-menopausa lo studio è stato monocentrico, mentre per quelle in gravidanza è stato multicentrico.

Per entrambi, lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Area Vasta Centro, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze (Numeri: 11097_oss. 11538_OSS). Il Comitato Etico ha verificato la conformità alle *Good Clinical Practices* ed alla Dichiarazione di Helsinki, in ogni centro di ricerca.

Tutti i soggetti partecipanti hanno dato il consenso informato alla partecipazione ed il consenso al trattamento dei dati personali (vedi Protocolli ed Allegati).

3.2 LE POPOLAZIONI OGGETTO DI STUDIO

3.2.1 DONNE IN PERI-MENOPAUSA

La popolazione di donne in peri-menopausa era costituita da 200 soggetti di genere

femminile, afferenti alla SOD Malattie del Metabolismo Minerale ed Osseo (CTO, Largo Palagi 1, Firenze), che si sono recati per una “Prima visita” di valutazione del metabolismo osseo, nel periodo compreso tra Settembre 2017 ed Agosto 2018.

All'interno del routinario percorso diagnostico terapeutico, presso la SOD Malattie del Metabolismo Minerale ed Osseo, erano previste ogni settimana circa 10 “Prime visite” per donne e uomini, che necessitassero di una visita endocrinologica per la valutazione di eventuali dismetabolismi a livello osseo. Successivamente, in relazione all'esito della prima visita, il medico specialista prevedeva per ogni soggetto una “Visita di controllo” a cadenza variabile in base alle esigenze di ciascun paziente (generalmente da 1 a 12 mesi dalla prima visita).

I criteri di inclusione per la partecipazione allo studio erano:

- consenso informato alla partecipazione scritto e firmato.
- Donne in diverse fasi della vita, afferenti alla SOD per una “Prima visita” di approfondimento relativa al metabolismo osseo.
- Soggetti di età compresa tra i 30 e gli 80 anni.

I criteri di esclusione sono:

- partecipazione ad altri studi.
- Stato di gravidanza e/o allattamento.

In Figura 8 viene riportato il diagramma relativo alle procedure di reclutamento.

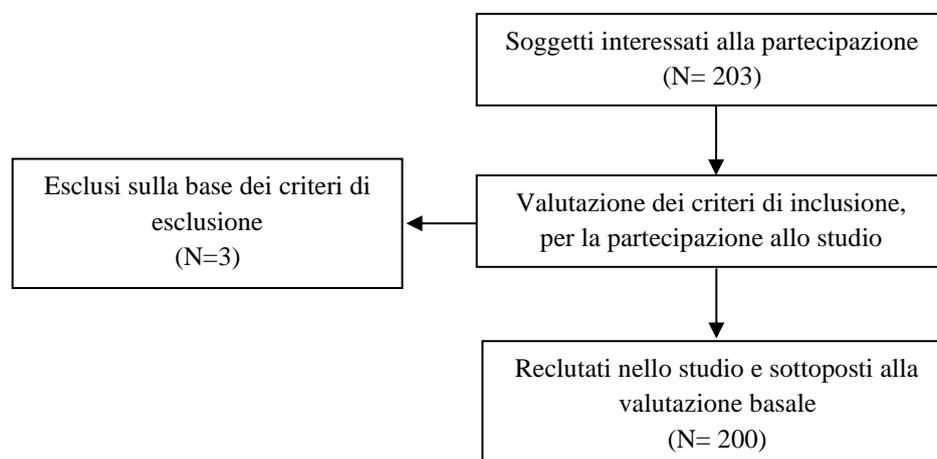


Figura 8. Diagramma di descrizione del disegno dello studio e delle procedure di reclutamento e valutazione basale per la popolazione di donne in peri-menopausa.

3.2.2 DONNE IN GRAVIDANZA

La popolazione di donne in gravidanza era costituita da 279 soggetti di genere femminile, afferenti agli ambulatori di Ginecologia ed Ostetrica delle strutture territoriali dell'USL Toscana Centro, presso il Presidio Ospedaliero Piero Palagi (via Michelangelo 41,

Firenze), e dell'AOU Careggi (Largo Brambilla 3, Firenze).

Nello specifico, erano circa 200 soggetti afferenti alle strutture ambulatoriali dell'USL Toscana Centro, Presidio Ospedaliero Piero Palagi, Firenze, e circa 100 soggetti afferenti alle strutture ambulatoriali dell'AOU, nel periodo da gennaio 2018 a gennaio 2019.

I criteri di inclusione allo studio erano:

- consenso informato alla partecipazione scritto e firmato.
- Soggetti maggiorenni sani in gravidanza fisiologica, alla 10-12° settimana di gestazione.
- Parlare e comprendere correttamente la lingua italiana.
- Soggetti residenti nell'area metropolitana dello studio.

I criteri di esclusione erano:

- Presenza di una delle seguenti condizioni patologiche pre-gravidiche: Diabete, Ipertensione, DCA presente oppure storia pregressa di DCA, Patologie metaboliche e neurologiche (PKU, fibrosi cistica ecc.), Persona non collaborante, Gravi malattie del sistema respiratorio (asma, COPD), Gravi disordini del sistema muscolo-scheletrico (es. grave osteoartrite, paraplegia), Colon Irritabile, Morbo di Crohn e Rettocolite Ulcerosa.
- Partecipazione ad altri studi.

In Figura 9 viene riportato il diagramma relativo alle procedure di reclutamento.

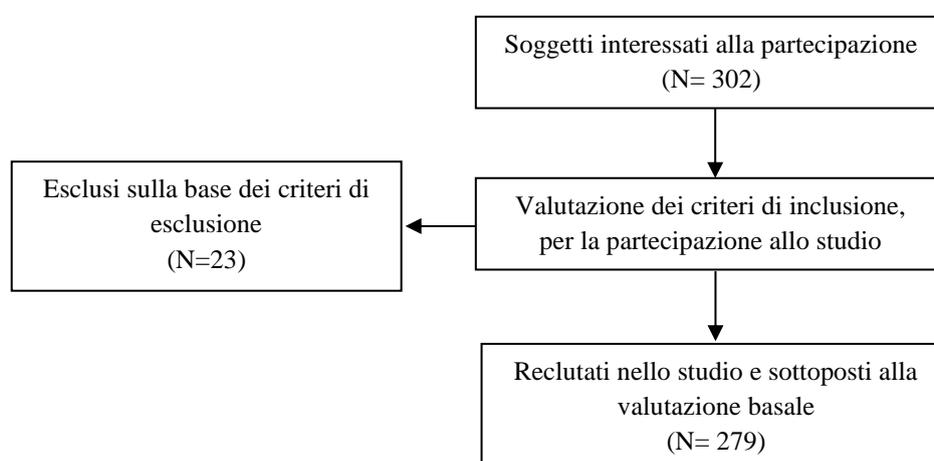


Figura 9. Diagramma di descrizione del disegno dello studio e delle procedure di reclutamento e valutazione basale, per la popolazione di donne in gravidanza.

3.3 I TEMPI DI ESECUZIONE

Il progetto si è svolto nel periodo tra Novembre 2016 ed Ottobre 2019 e ha previsto una serie di fasi consecutive, che sono state attuate progressivamente.

La Figura 10, visionabile come documento PDF allegato, mostra il diagramma di Gantt

relativo alle tempistiche di attuazione di ogni attività del progetto. Come si può vedere, una prima fase di circa 10-12 mesi è stata necessaria per l'elaborazione dei protocolli di ricerca, la sottomissione al CE Area Vasta Centro, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze, e l'approvazione degli stessi. In un periodo di circa 12 mesi sono state espletate le procedure di reclutamento e valutazione basale nei tre Centri di ricerca coinvolti nel progetto, mentre il follow-up e la valutazione finale hanno richiesto un periodo di circa 18 mesi.

L'elaborazione dei dati, tramite creazione di database appositi, e l'analisi statistica sono state completate in circa 8 mesi.

L'aspetto interessante riguarda la visita basale, poiché al termine delle procedure di valutazione e raccolta dati, ai soggetti partecipanti sono stati dati consigli nutrizionali, che fanno parte della routinaria *buona pratica clinica* e che prevedono una serie di indicazioni mirate a promuovere buone abitudini alimentari per la salute dell'osso, focalizzandosi su calcio e vitamina D, ed a stimolare l'adesione ad una dieta mediterranea. Tali indicazioni nutrizionali sono state fornite singolarmente attraverso un colloquio di circa 15-20 minuti e con la distribuzione materiale informativo cartaceo, appositamente creato sia per il periodo della peri-menopausa (vedi Allegato n°5 del Protocollo SOD), sia per il periodo della gravidanza (vedi Allegato n°4 del Protocollo Gravidanza).

Durante il follow-up sono stati ripresi i concetti esposti nel corso del primo incontro, al fine di mantenere alta l'attenzione sui temi relativi alla prevenzione per la salute dello scheletro.

Questo tipo di intervento è risultato di facile fruizione e di durata consona, tale da dimostrarsi replicabile anche nella pratica clinica.

3.4 GLI STRUMENTI UTILIZZATI PER LA RACCOLTA DATI

3.4.1 INFORMAZIONI GENERALI

In occasione della valutazione basale al reclutamento sono stati consegnati i moduli per la partecipazione (Informativa paziente, Consenso informato alla partecipazione e Consenso al trattamento dei dati personali) e sono state registrate le informazioni relative a:

- dati socio-demografici (età, nazionalità, residenza, grado di istruzione, stato civile);
- anamnesi clinica (presenza di patologie attuali e/o pregresse, trattamenti farmacologici e/o uso di integratori/supplementi);
- esami ematici effettuati di recente e/o valutazioni strumentali (es. esame DXA per la valutazione della BMD);
- stile di vita (abitudine al fumo, consumo di bevande alcoliche, pratica di attività fisica).

Le informazioni relative all'uso di farmaci e/o integratori, alle analisi ematiche e/o

valutazioni strumentali effettuate ed allo stile di vita, sono state registrate anche in occasione del follow-up.

3.4.2 LA VALUTAZIONE NUTRIZIONALE

L'indagine nutrizionale è stata effettuata attraverso la somministrazione di due specifici questionari, il primo per la valutazione del livello di aderenza alla DM ed il secondo per la stima dell'introito alimentare giornaliero di calcio.

3.4.2a LO SCORE DI ADERENZA ALLA DIETA MEDITERRANEA

Il livello di aderenza alla DM è stato valutato tramite uno score a 14 punti, calcolato a partire da un questionario strutturato per investigare il consumo di alimenti ed abitudini tipiche dello stile mediterraneo (vedi Allegato n°1 del Protocollo SOD). Tale questionario è stato precedentemente validato nello studio PREDIMED e consiste in 14 domande che esplorano il consumo di olio d'oliva, verdura, frutta, legumi, frutta secca, pesce, carne bianca e l'uso del "soffritto" per la preparazione delle pietanze (definito come "salsa fatta con pomodoro e cipolla, porro o aglio e cotta a fuoco lento con olio d'oliva"), considerandoli come tipici della DM. D'altro canto, il consumo di carni rosse e processate, altri grassi oltre l'olio d'oliva (come burro e margarina), bevande zuccherate e/o gassate e dolci industriali e/o prodotti da forno (non fatti in casa), è stato indagato come specchio di abitudini lontane da quelle mediterranee [89].

A seconda del comportamento corretto, ad ogni domanda viene assegnato 1 punto ed il punteggio totale va da 0 a 14. Maggiore è lo score, più alto risulta il livello di aderenza alla DM e, nello specifico:

- punteggio ≤ 5 corrisponde ad una bassa aderenza alla DM;
- punteggio tra 6 e 9 corrisponde a un livello medio di aderenza alla DM;
- punteggio ≥ 10 corrisponde a un livello alto di aderenza alla DM.

Per le donne in gravidanza, è stato utilizzato lo stesso questionario, ma con l'omissione della domanda relativa al consumo settimanale di vino, poiché si è considerato che tale bevanda non debba essere consumata per tutto il periodo gestazionale (vedi Allegato n°1 del Protocollo Gravidanza). Il questionario così strutturato è stato già utilizzato in una popolazione di gestanti [123] e prevede un punteggio da 0 a 13, per il quale si associa un livello di aderenza qui di seguito riportato:

- punteggio < 7 corrisponde ad una bassa aderenza alla DM;
- punteggio ≥ 7 corrisponde a un livello alto di aderenza alla DM.

3.4.2b FFQ PER STIMARE L'INTROITO ALIMENTARE DI CALCIO

Il FFQ per stimare l'introito alimentare di calcio consiste in 15 domande inerenti al consumo di determinati gruppi alimentari, selezionati in base ai dati dell'Istituto nazionale di ricerca per gli alimenti e la nutrizione (INRAN - attualmente Centro di ricerca del

Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura (CREA)) e relativi alla composizione della dieta in Italia, in base alla frequenza di consumo e all'importanza come fonte alimentare di calcio (vedi Allegato n°2 del Protocollo SOD). Alcuni ulteriori sottogruppi alimentari sono stati inseriti per l'elevato contenuto in calcio, come latte e derivati, e sono state prese in considerazione anche le acque ricche in calcio (contenuto in calcio ≥ 150 mg/L). Tale questionario è stato precedentemente validato da Montomoli et al., per essere utilizzato nella popolazione italiana, sia nei maschi che nelle femmine [64].

Per le donne in gravidanza, è stato utilizzato un questionario simile, ma più approfondito (vedi Allegato n°2 del Protocollo Gravidanza). Si tratta di un FFQ costituito da 25 domande, relative al consumo di specifici gruppi alimentari selezionati sulla base della tradizione dietetica mediterranea, delle frequenze di consumo e dell'importanza come fonte alimentare di alcuni nutrienti, specialmente il calcio [124]. In particolare, le domande indagano il consumo di latte e latticini, cereali da colazione, biscotti e merendine/brioche, pasta e riso, pane e derivati, patate, pizza, carne (rossa, bianca e processata), pesce (fresco e conservato), uova, legumi, verdure, frutta fresca e secca, gelato, cioccolato al latte e bianco, acqua minerale ricca di calcio. Per ogni domanda vengono richieste anche la porzione (piccola, media o grande) e la frequenza di consumo (giornaliera, settimanale o mensile).

Il calcolo dell'introito di calcio è stato elaborato attraverso lo sviluppo di uno specifico foglio di lavoro nel software Microsoft Excel 2010. Il contenuto di calcio di ogni alimento è stato estratto dalle "Tabelle di composizione degli alimenti" del Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria (CREA) [125] e dalla "Banca Dati di composizione degli Alimenti per studi epidemiologici in Italia" (BDA) dell'Istituto Europeo Oncologico (IEO) [126].

3.5 LE VALUTAZIONI SPECIFICHE NELLE DONNE IN PERI-MENOPAUSA

In occasione della visita di reclutamento (definita Tempo 0), ai soggetti in peri-menopausa partecipanti allo studio sono state richieste alcune informazioni specifiche relative a:

- stato di menopausa;
- presenza di fratture pregresse;
- terapia mirata con farmaci anti-fratturativi.

Inoltre, per valutare il livello di attività fisica al basale (Tempo 0) ed al follow-up (Tempo 1), è stato somministrato il General practice physical activity questionnaire (GPPAQ) (Allegato n°4 del Protocollo SOD). Il GPPAQ è uno strumento di controllo commissionato dal Department of Health del Regno Unito e sviluppato dalla *School of Hygiene & Tropical Medicine* di Londra come sistema validato di misurazione del livello di attività fisica. È stato sviluppato per l'uso nell'assistenza primaria in modo da:

- essere utilizzato per valutare il livello di attività fisica della popolazione adulta (16-74 anni d'età);
- fornire un Indice semplice del livello di attività fisica (4-level Physical Activity Index, PAI), classificando i soggetti come 'attivi', 'moderatamente attivi', 'moderatamente inattivi' e 'inattivi';
- essere usato da un professionista per stimare quanto un intervento sia utile ad aumentare il livello di PA [127].

Per le analisi dei dati, sono stati utilizzati i criteri stabiliti dalla *School of Hygiene & Tropical Medicine* di Londra. Il calcolo del livello di attività fisica (Physical Activity Index, PAI) è a 4 livelli ed è stato riportato in Tabella 3.

LIVELLO	CONDIZIONI
Inattivo	Lavoro sedentario e "nessuna" attività fisica o bicicletta
Moderatamente inattivo	<ul style="list-style-type: none"> • Lavoro sedentario e "Meno di 1 ora" di attività fisica e/o bicicletta a settimana • Lavoro in piedi e "nessuna" attività fisica o bicicletta a settimana
Moderatamente attivo	<ul style="list-style-type: none"> • Lavoro sedentario e "Da 1 a 2.9 ore" di esercizio fisico e/o bicicletta a settimana • Lavoro in piedi e "Meno di 1 ora" di esercizio fisico e/o bicicletta a settimana • Lavoro che richiede sforzo fisico e "nessuna" attività fisica e/o bicicletta
Attivo	<ul style="list-style-type: none"> • Lavoro sedentario e "3 ore o più" di esercizio fisico e/o bicicletta a settimana • Lavoro in piedi e "Da 1 a 2.9 ore" di esercizio fisico e/o bicicletta a settimana • Lavoro che richiede sforzo fisico e "Meno di 1 ora" di esercizio fisico e/o bicicletta a settimana • Lavoro che richiede un intenso sforzo fisico

Tabella 3. Calcolo del PAI a 4-livelli.

Infine, le donne reclutate sono state sottoposte alle misurazioni antropometriche e di composizione corporea, tramite strumentazione apposita sia al Tempo 0, sia al Tempo 1. Nello specifico, sono stati misurati i seguenti parametri antropometrici:

- peso, tramite bilancia elettronica;
- altezza, tramite stadiometro;
- circonferenza ombelicale, tramite nastro metrico non elastico.

La valutazione della FM, della FFM e della TBW è stata effettuata con

bioimpedenziometro BIA 101 AKERN.

3.6 LE VALUTAZIONI SPECIFICHE NELLE DONNE IN GRAVIDANZA

In occasione della visita di reclutamento (definita Tempo 0), ai soggetti in gravidanza partecipanti allo studio sono state richieste alcune informazioni specifiche relative a:

- epoca gestazionale al momento del reclutamento;
- peso abituale prima della gravidanza;
- peso all'inizio della gravidanza ed altezza.

Dai valori di peso ed altezza auto-riportati è stato poi calcolato il BMI.

Durante il primo follow-up, intorno alla 30-32^o settimana gestazionale (definito Tempo 1), sono stati registrati i dati relativi a:

- peso al momento del follow-up;
- aumento di peso in gravidanza;
- presenza di complicanze della gravidanza (es. GDM, pre-eclampsia, altro);
- valori della curva glicemica (se eseguita).

Dopo il parto (definito Tempo 2), sono state annotate informazioni riguardo a:

- data e tipologia del parto;
- settimana di gravidanza al momento del parto ed eventuale presenza di complicazioni;
- genere del nascituro;
- pratica di allattamento al seno e/o artificiale.

3.7 ANALISI STATISTICA

Le misure effettuate sono state inizialmente analizzate attraverso delle statistiche descrittive: tabelle di frequenza per i dati categoriali (come ad es. nazionalità, abitudine al fumo, stato civile, livello di aderenza alla DM, PAI, terapie farmacologiche, dati clinici relativi alla presenza di patologie), e media e deviazione standard per i dati quantitativi su scale metriche (come ad es. introito di calcio, punteggio dell'aderenza alla DM, anni dalla menopausa, numero di sigarette fumate al giorno, dati antropometrici, valori ematici, dati clinici relativi alla BMD).

Le associazioni tra le variabili sono state valutate attraverso l'indice di correlazione di Pearson (variabili metriche), in particolare per:

- Punteggio di aderenza alla DM ed introito alimentare di calcio;
- Introito alimentare di calcio e BMD nei diversi siti (colonna, femore totale e collo femorale), per le donne in peri-menopausa;
- Punteggio di aderenza alla DM e parametri antropometrici e di composizione corporea, quest'ultimi per le donne in peri-menopausa;
- Punteggio di aderenza alla DM e valori ematici ed urinari, quest'ultimi per le donne in

peri-menopausa;

- Valori di glicemia e parametri antropometrici, per le donne in gravidanza.

L'introito alimentare di calcio è stato comparato al PRI specifico per ogni popolazione, tramite il test t di Student ad un solo campione. Nella popolazione di donne in peri-menopausa, il confronto Tempo 0 e Tempo 1, riguardo ai parametri antropometrici e di composizione corporea, ai valori ematici ed urinari, ai valori della BMD, all'introito alimentare di calcio, al punteggio di aderenza alla DM ed alle frequenze di consumo degli alimenti (del questionario DM), è stato effettuato tramite il test t di Student per campioni appaiati. Nella popolazione di donne in gravidanza, per valutare se ci fosse una differenza significativa tra i livelli di aderenza alla DM riguardo all'introito giornaliero di calcio, alla glicemia ed ai parametri antropometrici, è stato applicato il test t di Student per campioni indipendenti.

L'analisi della varianza ad una via (ANOVA) è stata utilizzata nelle donne in peri-menopausa per valutare l'effetto del livello di aderenza alla DM e l'effetto del PAI sull'introito di calcio, sui parametri antropometrici e di composizione corporea, sui valori ematici ed urinari e sulla BMD. Nelle donne in gravidanza, l'effetto delle valutazioni nel tempo sul punteggio di aderenza alla DM, sull'introito alimentare di calcio, sui parametri antropometrici, sui valori ematici e sulle frequenze di consumo degli alimenti (del questionario DM), è stato analizzato attraverso l'ANOVA per misure ripetute. Per quanto riguarda i confronti multipli, la significatività è stata corretta con il metodo di Bonferroni.

Il confronto tra Tempo 0 e Tempo 1 (e/o Tempo 2) riguardo alla variazione nelle percentuali di risposta al FFQ è stato condotto tramite test di McNemar.

Infine, nella popolazione di donne in gravidanza, per quanto riguarda le statistiche inferenziali è stato utilizzato un approccio basato sui modelli misti. Sono stati considerati come effetti random le singole pazienti, il centro di reclutamento, la nazionalità, il grado di istruzione e lo stato civile, mentre sono state considerate come variabili indipendenti (effetti fissi) l'aderenza alla dieta mediterranea e l'introito alimentare di calcio misurati nelle visite successive alla prima.

La significatività statistica è stata considerata per $p < 0.05$. Le analisi statistiche sono state eseguite con il programma SPSS, versione 20 (SPSS, Chicago, Illinois).

4. RISULTATI

Le due popolazioni oggetto di studio sono state valutate in maniera indipendente l'una dall'altra ed i risultati relativi a ciascuna di esse sono qui di seguito riportati. La valutazione al momento del reclutamento viene definita Tempo 0 e le valutazioni di

follow-up sono definite Tempo 1 e Tempo 2 (quest'ultima solo per le donne in gravidanza).

4.1 ANALISI DEI DATI NELLA POPOLAZIONE DI DONNE IN PERI-MENOPAUSA

4.1.1 DATI SOCIO-DEMOGRAFICI, ANTROPOMETRICI E CLINICI

Sono state reclutate 200 donne in peri-menopausa, delle quali 172 sono state rivalutate al Tempo 1, ovvero l'86% dei soggetti reclutati.

Le caratteristiche socio-demografiche, antropometriche e di stile di vita dei soggetti partecipanti, al Tempo 0 ed al Tempo 1, sono state riportate in Tabella 4. Al Tempo 0, l'età media era di 61.60 ± 8.77 , il peso medio era di 60.88 ± 10.78 ed il BMI era di 23.46 ± 3.79 , quindi trattasi di soggetti prevalentemente normopeso.

La maggior parte delle donne risultavano essere di nazionalità italiana (98%), sposate e/o conviventi (66.8%) e con un diploma superiore (47.7%). Inoltre, il GPPAQ ha mostrato che il 59% di loro era inattiva e/o moderatamente inattiva.

Dalla valutazione anamnestica basale, è risultato che il 93.5% delle partecipanti era in menopausa, il 17.5% aveva avuto fratture da fragilità ossea e il 73.5% faceva integrazione di vitamina D. Le altre informazioni relative all'assunzione di farmaci e integratori sono riportate in Figura 11.

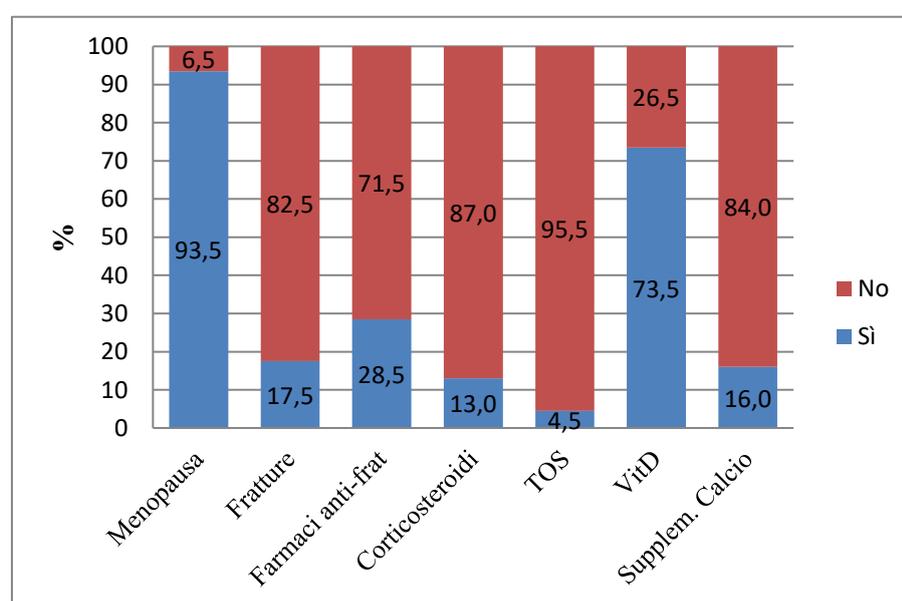


Figura 11. Valutazione anamnestica al Tempo 0 delle donne in peri-menopausa, relativa allo stato di menopausa ed all'assunzione di farmaci ed integratori (N=200). Farmaci anti-frat: farmaci anti-fratturativi. TOS: Terapia Ormonale Sostitutiva. VitD: Vitamina D.

Le caratteristiche socio-demografiche al Tempo 1 sono sovrapponibili con quelle del Tempo 0. Tra tutti i valori antropometrici, dall'analisi effettuata con Student's t-test per campioni appaiati è risultato che il BMI era maggiore e la circonferenza ombelicale era minore al Tempo 1 rispetto al Tempo 0, entrambi in maniera statisticamente significativa (rispettivamente $p < 0.001$ e $p = 0.038$).

Anche la valutazione relativa allo stile di vita è risultata sovrapponibile tra Tempo 0 e Tempo 1 ed il GPPAQ ha mostrato che il 62.3% delle donne era inattiva e/o moderatamente inattiva.

Caratteristiche	Tempo 0 (N=200)	Tempo 1 (N=172)
Età (media ±DS)	61.60 (±8.77)	61.72 (±8.25)
Nazionalità (%)	Italiana: 98% Europea: 0.5% Extra-Europea: 1.5%	Italiana: 98.3% Extra-Europea: 1.7%
Stato civile (%)	Nubile: 13.1%* Sposata/Convivente: 66.8% Separata/Divorziata: 13.1% Vedova: 7%	Nubile: 14%** Sposata/Convivente: 66.1% Separata/Divorziata: 12.9% Vedova: 7%
Grado di istruzione (%)	Nulla: 1%* Licenza elementare: 13.6% Licenza media: 21.6% Diploma superiore: 47.7% Laurea: 15.6% Post-laurea: 0.5%	Nulla: 1.2%** Licenza elementare: 12.9% Licenza media: 19.9% Diploma superiore: 49.1% Laurea: 16.4% Post-laurea: 0.6%
Abitudine al fumo (%)	Sì: 12.1%* No: 87.9%	Sì: 12.3%** No: 87.7%
PAI (%)	Inattivo: 42.5% Moderatamente inattivo: 16.5% Moderatamente attivo: 19.5% Attivo: 21.5%	Inattivo: 48.2%*** Moderatamente inattivo: 14.1% Moderatamente attivo: 15.9% Attivo: 21.8%
Peso, kg (media±DS)	60.88 (±10.78)	60.3 (±10.38)***
Altezza, m (media±DS)	1.61 (±0.07)	1.59 (±0.07)***
BMI, kg/m² (media±DS)	23.46 (±3.79)	23.73 (±3.95)***
Circonferenza ombelicale, cm (media±DS)	92.13 (±11.40)*	91.24 (±11.07) [#]

Tabella 4. Caratteristiche socio-demografiche, antropometriche e di stile di vita delle donne in perimenopausa, al Tempo 0 ed al Tempo 1. PAI: Physical Activity Index; BMI: Body Mass Index.

*N=199; **N= 171; ***N=170; [#]N=168.

In Tabella 5 sono riportati i valori degli esami ematici ed urinari, i valori della MOC ed i dati della composizione corporea nei due tempi di valutazione. Dall'analisi con Student's

t-test per campioni appaiati è risultato che la FM in valore percentuale ed in kg era più bassa al Tempo 0 rispetto al Tempo 1 (rispettivamente $p<0.001$; $p=0.003$). Mentre, la FFM in valore percentuale ed in kg e la TBW in valore percentuale ed in litri erano più elevati al Tempo 0 rispetto al Tempo 1 (rispettivamente $p<0.001$ e $p=0.001$ per i valori di FFM; $p<0.001$ e $p=0.001$ per i valori di TBW).

Valori	Tempo 0 (media \pm DS)	N	Tempo 1 (media \pm DS)	N
Calcemia (mg/dL)	9.4 (\pm 0.4)	108	9.4 (\pm 0.6)	142
Fosforemia (mg/dL)	3.6 (\pm 0.5)	66	3.6 (\pm 3.6)	96
PTH (pg/mL)	40.6 (\pm 22.2)	75	43.4 (\pm 24.5)	124
25OHvitD (ng/mL)	36.7 (\pm 16.5)	111	35.9 (\pm 19.3)	136
Fosfatasi Alcalina Ossea (μ g/L)	16.2 (\pm 12.5)	50	13.9 (\pm 9.7)	128
Calciuria (mg/dL)	16.6 (\pm 34.8)	55	13.3 (\pm 24.8)	91
Calciuria 24h (mg/24h)	195.5 (\pm 113.2)*	73	134.5 (\pm 121.0)*	172
Fosfaturia (mg/dL)	56.3 (\pm 82.7)	40	51.5 (\pm 96.7)	76
Fosfaturia 24h (mg/24h)	678.9 (\pm 316.3)	51	649.1 (\pm 275.2)	101
BMD L1L4 (g/cm ²)	0.792 (\pm 0.131)	155	0.816 (\pm 0.141)	75
T-score_L1L4	-2.5 (\pm 1.1)	157	-2.3 (\pm 1.1)	76
Z-score_L1L4	-1.1 (\pm 1.1)	151	-0.9 (\pm 1.1)	74
BMD femore TOT (g/cm ²)	0.736 (\pm 0.106)	149	0.747 (\pm 0.091)	75
T-score femore TOT	-1.7 (\pm 0.8)	153	-1.7 (\pm 0.8)	77
Z-score femore TOT	-0.32 (\pm 0.7)	149	-0.8 (\pm 0.8)	72
BMD collo femore (g/cm ²)	0.638 (\pm 0.099)	154	0.639 (\pm 0.107)	76
T-score collo femore	-2.1 (\pm 0.8)	157	-2.2 (\pm 0.7)	77
Z-score collo femore	-0.8 (\pm 0.7)	151	-0.9 (\pm 0.8)	76
FM (%)	26.7 (\pm 7.0)*	184	27.2 (\pm 6.7)*	154
FM (kg)	16.9 (\pm 7.2)**	184	16.9 (\pm 7.0)**	154
FFM (%)	72.9 (\pm 7.4)*	184	72.8 (\pm 6.7)*	154
FFM (kg)	44.1 (\pm 5.4)***	184	43.2 (\pm 4.1)***	154
TBW (%)	53.7 (\pm 4.9)*	184	53.3 (\pm 5.0)*	154
TBW (L)	32.1 (\pm 3.2)***	184	31.7 (\pm 3.1)***	154

Tabella 5. Valori degli esami ematici ed urinari, valori della BMD (tramite tecnologia DEXA) e dati della composizione corporea delle donne in peri-menopausa, al Tempo 0 ed al Tempo 1. PTH: paratormone. BMD: Bone Mineral Density. FM: Fat Mass. FFM: Fat Free Mass. TBW: Total Body Water. * $p<0.001$; ** $p=0.003$; *** $p=0.001$.

Inoltre, per quanto riguarda i valori ematici ed urinari, è emerso che solo la calciuria nelle 24 ore era significativamente minore al Tempo 1 rispetto al Tempo 0 ($p<0.001$). Tramite Student's t-test a campione unico, i valori ematici di 25OH-vitamina D sono stati

confrontati con il valore minimo di sufficienza (30 ng/mL) ed è emerso che, sia al Tempo 0, sia al Tempo 1, i valori medi di vitamina D ematica erano significativamente maggiori rispetto al valore minimo di sufficienza (rispettivamente $p < 0.001$ e $p = 0.001$).

4.1.2 LE ABITUDINI ALIMENTARI

Il questionario di valutazione dell'aderenza alla DM ha mostrato che sia al Tempo 0, sia al Tempo 1, la maggior parte delle donne aveva un livello medio di aderenza alla DM (Figura 12). Il punteggio medio al Tempo 0 era di 6.98 (± 1.74) ed al Tempo 1 di 7.53 (± 1.68). Lo Student's t-test per campioni appaiati ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra i due punteggi ($p < 0.001$), quindi il punteggio di aderenza alla DM è aumentato dal Tempo 0 al Tempo 1.

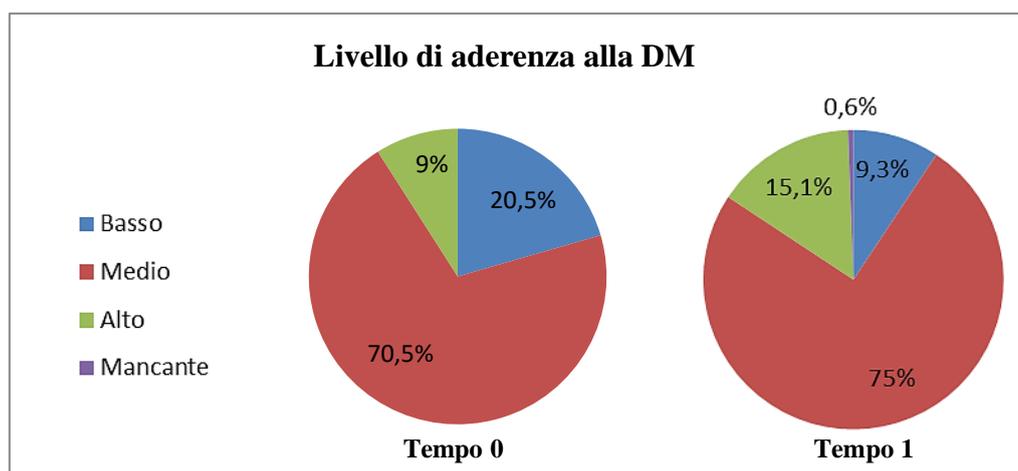


Figura 12. Livello di aderenza alla Dieta Mediterranea (DM) nelle donne in peri-menopausa, al Tempo 0 (N=200) ed al Tempo 1 (N=171).

Le risposte al questionario DM sono mostrate in Figura 13. Il consumo giornaliero di verdure ($p = 0.003$) e quello settimanale di frutta secca ($p = 0.037$) sono aumentati dal Tempo 0 al Tempo 1, mentre il consumo giornaliero di carne rossa e/o affettati ($p = 0.004$) è diminuito, in maniera statisticamente significativa (Student's t-test per campioni appaiati). Anche il consumo settimanale di pietanze preparate con il soffritto (definito nello studio PREDIMED come "salsa fatta con pomodoro e cipolla, porro o aglio e cotta a fuoco lento con olio d'oliva") è aumentato in maniera significativa ($p = 0.002$).

L'apporto giornaliero di calcio stimato con il FFQ è risultato al Tempo 0 di 866.2 ± 301.9 mg ed al Tempo 1 di 907.8 ± 304.8 mg. In entrambi i casi, inferiore al PRI per le donne in menopausa, ovvero 1200 mg (Figura 14), in maniera statisticamente significativa ($p < 0.001$). Seppure l'introito di calcio fosse superiore al Tempo 1 rispetto che al Tempo 0, i due valori non sono risultati significativamente diversi ($p = 0.133$).

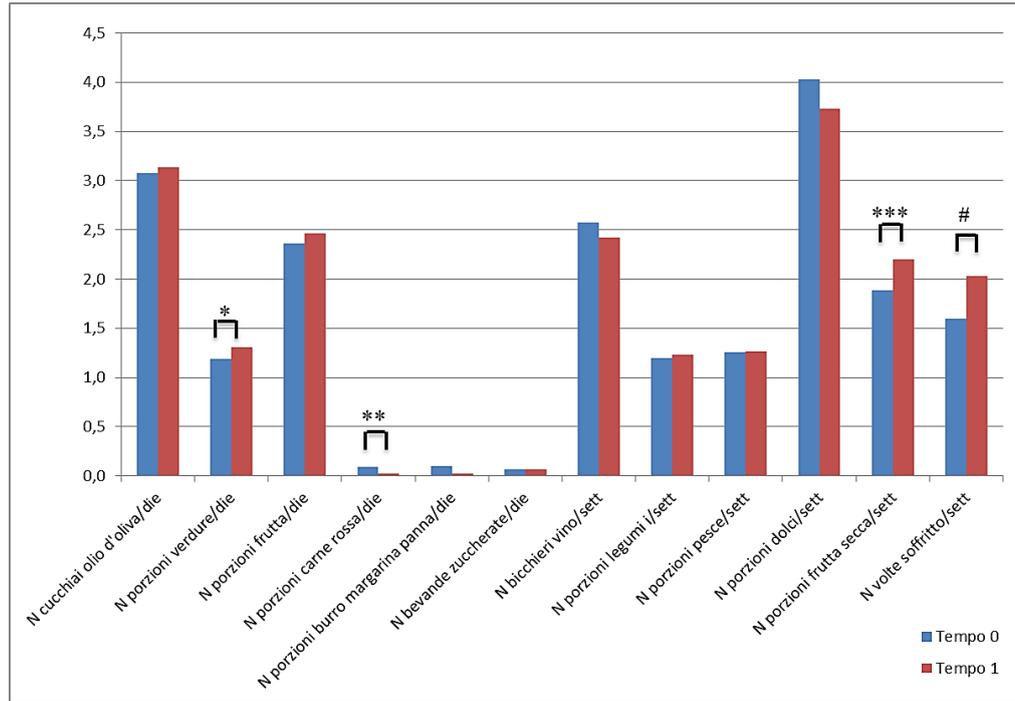


Figura 13. Frequenza di consumo degli alimenti, in base al questionario di aderenza alla DM, nelle donne in peri-menopausa, al Tempo 0 ed al Tempo 1. * $p=0.003$; ** $p=0.004$; *** $p=0.037$. # $p=0.002$.

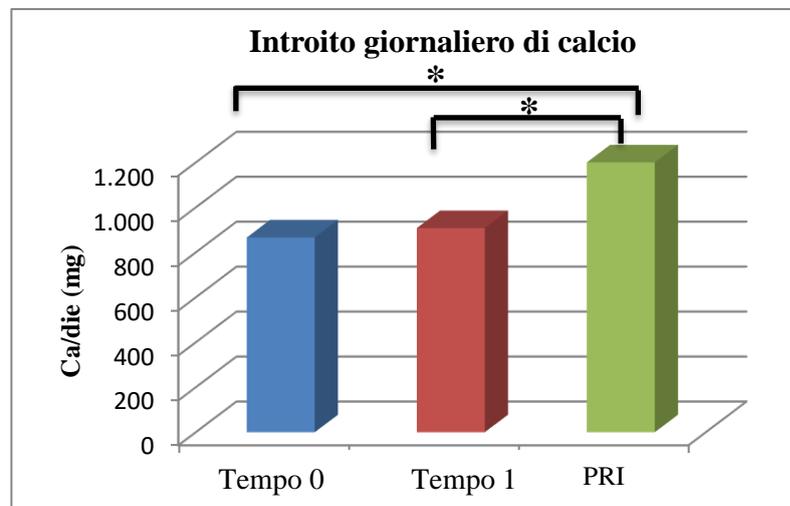


Figura 14. Introito giornaliero di calcio rispetto al PRI nelle donne in peri-menopausa, al Tempo 0 ed al Tempo 1. * $p<0.001$. PRI: Population Reference Intake.

Le frequenze di risposta al FFQ sono state riportate nelle Figure 15, 16 e 17. Tramite test di McNemar è stato valutato se le risposte alle domande fossero cambiate in maniera statisticamente significativa tra Tempo 0 e Tempo 1. Da quest'analisi è risultato che le percentuali di risposta alle domande relative alla ricotta ed all'acqua ricca di calcio sono cambiate in maniera statisticamente significativa: al Tempo 0 il 56.5% dei soggetti ha risposto di consumare ricotta ed al Tempo 1 è sceso al 46.8% ($p=0.016$), mentre al Tempo

0 il 14% ha dichiarato di consumare acqua minerale ricca di calcio e al Tempo 1 è salito al 38% ($p < 0.001$).

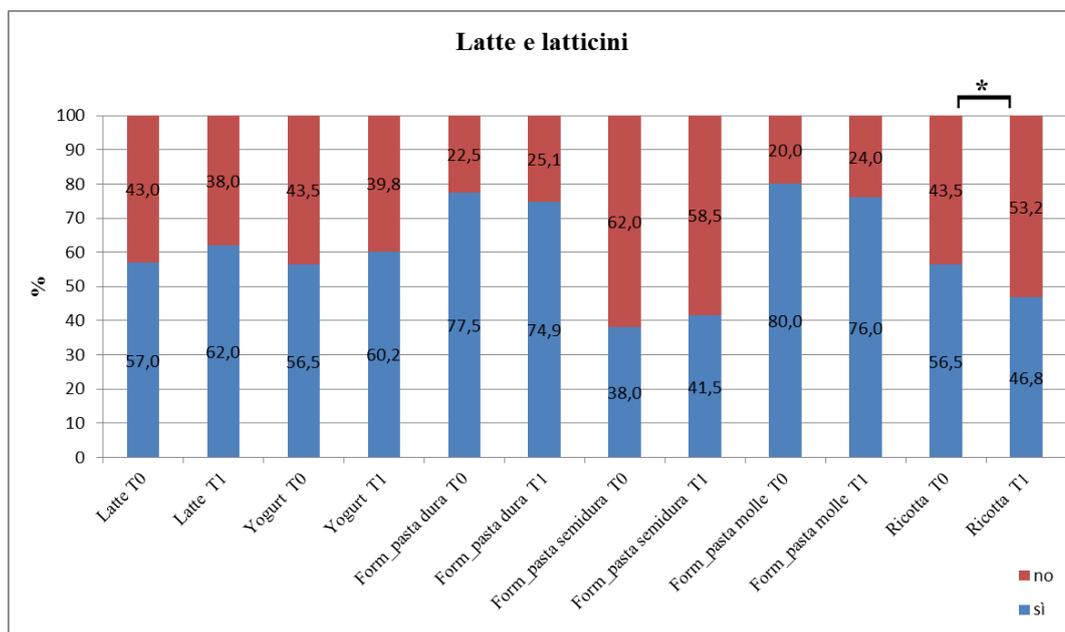


Figura 15. Frequenze di risposta (%) al FFQ per quanto riguarda latte e latticini nelle donne in peri-menopausa, al Tempo 0 (T0) ed al Tempo 1 (T1). * $p=0.016$.

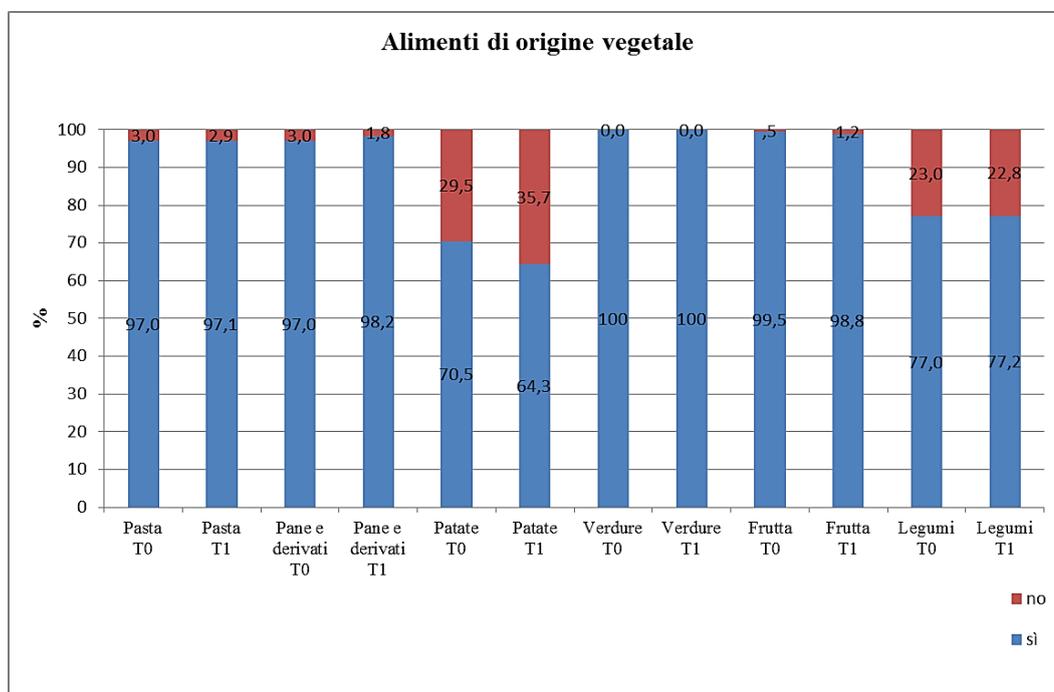


Figura 16. Frequenze di risposta (%) al FFQ per quanto riguarda gli alimenti di origine vegetale nelle donne in peri-menopausa, al Tempo 0 (T0) ed al Tempo 1 (T1).

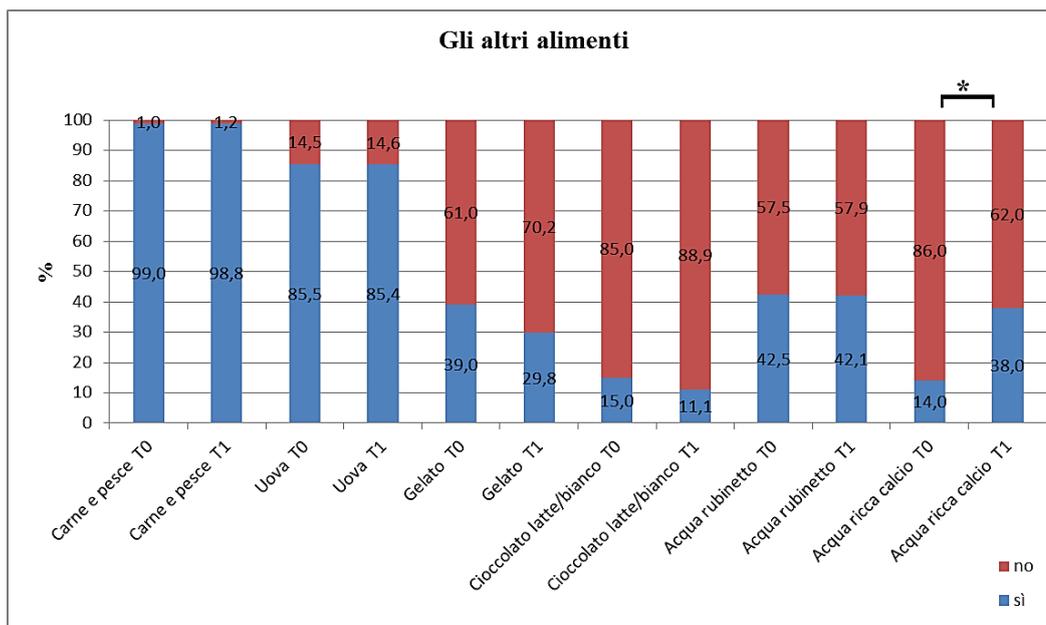


Figura 17. Frequenze di risposta (%) al FFQ per quanto riguarda gli altri alimenti nelle donne in perimenopausa, al Tempo 0 (T0) ed al Tempo 1 (T1). * $p < 0.001$.

4.1.3 LE ANALISI DI RELAZIONE TRA LE VARIABILI

Tramite il test di correlazione di Pearson, l'introito giornaliero di calcio è stato messo in relazione alla BMD nei tre siti, analizzati attraverso la tecnologia DEXA, ovvero vertebrale L1L4, femorale totale e collo femorale. In linea con i dati in letteratura, è emerso che, al Tempo 0, l'introito giornaliero di calcio era correlato significativamente con la BMD al collo femorale ($p=0.047$), con un coefficiente di correlazione di Pearson di 0.16. Per quanto riguarda gli altri siti e la valutazione al Tempo 1, non sono state riscontrate correlazioni statisticamente significative.

L'introito giornaliero di calcio è stato messo in relazione anche al punteggio del questionario di aderenza alla DM, per valutare se all'aumentare del punteggio, corrispondesse anche un maggiore introito di calcio. Al Tempo 0 non è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa, mentre al Tempo 1 il coefficiente di correlazione di Pearson è risultato di 0.149 e, seppure non si sia stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa ($p=0.053$), è stata osservata una tendenza: un punteggio più alto si associava a valori di introito di calcio maggiori (Figura 18).

L'ANOVA è stata eseguita per valutare l'effetto del livello di aderenza alla DM sull'introito giornaliero di calcio. Sia al Tempo 0, sia al Tempo 1 non è stata osservata una differenza statisticamente significativa di introito di calcio nei tre livelli di aderenza alla DM (Tempo 0, $p=0.751$; Tempo 1, $p=0.154$). Tuttavia, al Tempo 0 è stata osservata una tendenza: all'aumentare del livello di aderenza alla DM corrispondeva un introito di calcio più elevato (Figura 19).

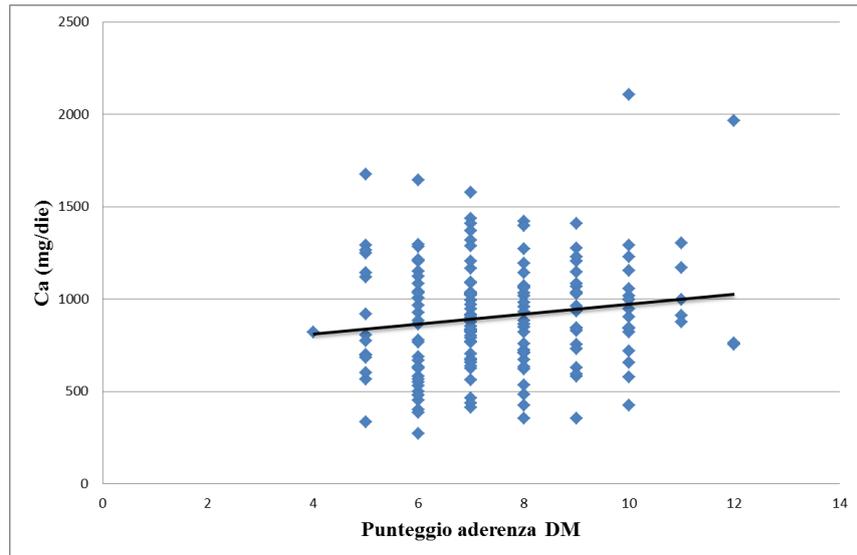


Figura 18. Correlazione di Pearson tra introito giornaliero di calcio e punteggio di aderenza Dieta Mediterranea (DM), nelle donne in peri-menopausa al Tempo 1. $p=0.053$, coefficiente=0.149.

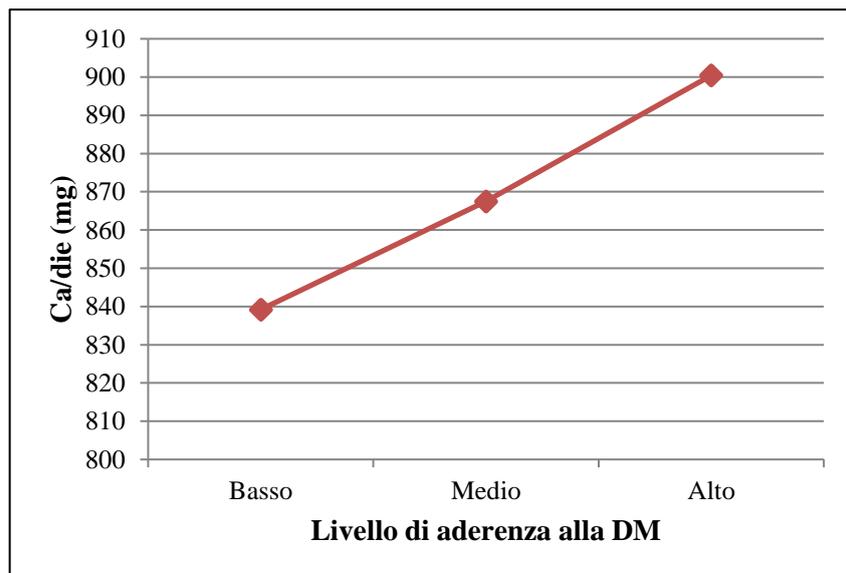


Figura 19. ANOVA per valutare l'introito di calcio nei tre livelli di aderenza alla Dieta Mediterranea (DM), nelle donne in peri-menopausa al Tempo 0. Livello Basso N=41; Livello medio N= 141; Livello alto N= 18.

Per quanto riguarda il punteggio di aderenza alla DM, è stato eseguito il test di correlazione di Pearson per valutare la relazione con i parametri antropometrici, i valori di composizione corporea, i valori ematici ed urinari e la BMD nei tre siti di valutazione con tecnologia DEXA. In Tabella 6 sono riportati i coefficienti di correlazione al Tempo 0 ed al Tempo 1, che sono risultati statisticamente significativi. Come si evince dai risultati, solo al Tempo 0, all'aumentare del punteggio di aderenza alla DM si abbassavano i valori di BMI, circonferenza ombelicale e FM, mentre aumentava la TBW. Inoltre, ad un punteggio più alto di aderenza alla DM corrispondevano valori di fosfaturia nelle 24 ore

più elevati.

	Punteggio aderenza DM Tempo 0	p
BMI	-0.173	0.014
Circonferenza ombelicale (cm)	-0.190	0.007
FM (%)	-0.149	0.043
FFM (%)	0.186	0.011
TBW (%)	0.147	0.047
Fosfaturia (mg/24h)	0.308	0.028

Tabella 6. Correlazione di Pearson tra punteggio di aderenza alla DM e valori antropometrici, di composizione corporea ed urinari, nelle donne in peri-menopausa al Tempo 0. BMI: Body Mass Index. FM: Fat Mass. FFM: Fat Free Mass. TBW: Total Body Water. DM: Dieta Mediterranea.

L'ANOVA è stata eseguita per valutare l'effetto del livello di aderenza alla DM sui parametri antropometrici, sui valori di composizione corporea, sui valori ematici ed urinari e sulla BMD nei tre siti di valutazione della MOC, sia al Tempo 0, sia al Tempo 1. Al Tempo 0, una differenza significativa tra i gruppi era presente solo per il parametro della fosfaturia nelle 24 ore [F(2,48)= 6.302, p=0.004]. I post-hoc con correzione di Bonferroni hanno indicato che il valore medio di fosfaturia nelle 24 ore differiva in maniera statisticamente significativa tra il livello alto ed il livello basso (p=0.010) e tra il livello alto ed il livello medio (p=0.005) di aderenza alla DM, ovvero a livelli più alti di aderenza alla DM, risultavano valori maggiori di fosfaturia nelle 24 ore. Al Tempo 1, una differenza significativa tra i gruppi era presente solo per il parametro T-score vertebrale L1L4 [F(2,73)= 4.767, p=0.011]. I confronti multipli corretti con Bonferroni hanno indicato che il valore medio di T-score vertebrale L1L4 differiva in maniera statisticamente significativa tra il livello medio ed il livello basso (p=0.039), ovvero al livello medio di aderenza alla DM corrispondeva un valore più basso di T-score vertebrale rispetto al livello basso di aderenza alla DM (-1.6±0.7 vs. -2.6±0.9).

Infine, è stato valutato il ruolo dell'attività fisica su tutte le variabili misurate. L'ANOVA è stata effettuata per valutare l'effetto del Physical Activity Index (PAI) sul punteggio di aderenza alla DM, sull'introito giornaliero di calcio, sui parametri antropometrici, sui valori di composizione corporea, sui valori ematici ed urinari e sulla BMD nei tre siti di valutazione della MOC, sia al Tempo 0, sia al Tempo 1. Al Tempo 0, una differenza significativa tra i gruppi era presente per i parametri:

- punteggio di aderenza alla DM [F(3,196)= 6.678, p<0.001];
- introito giornaliero di calcio [F(3,196)= 4.399, p=0.005];
- BMD Femore TOT [F(3,145)= 4.828, p=0.003];
- BMD Femore collo [F(3,149)= 4.092, p=0.008].

I post-hoc corretti con Bonferroni hanno indicato che:

- il valore medio di punteggio di aderenza alla DM differiva in maniera statisticamente significativa tra “Inattivo” ed “Attivo” (p<0.001) e tra “Moderatamente inattivo” ed

“Attivo” ($p=0.024$), ovvero ad un livello di attività fisica più alto corrispondeva un punteggio di aderenza alla DM maggiore.

- Il valore medio di introito giornaliero di calcio differiva in maniera statisticamente significativa tra “Inattivo” e “Moderatamente inattivo” ($p=0.015$), ovvero un livello di attività fisica leggermente più elevato della sedentarietà, si associava ad un maggiore introito di calcio giornaliero. È stata riscontrata una tendenza, non statisticamente significativa ($p=0.058$), di differenza tra i livelli “Inattivo” ed “Attivo” (781.0 ± 254.9 vs. 925.0 ± 317.5).
- Il valore medio di BMD femore TOT differiva in maniera statisticamente significativa tra “Inattivo” e “Moderatamente inattivo” ($p=0.002$), tra “Moderatamente inattivo” e “Moderatamente attivo” ($p=0.018$) e tra “Moderatamente inattivo” ed “Attivo” ($p=0.051$), ovvero al PAI “Moderatamente inattivo” corrispondeva il valore più alto di BMD femore TOT (0.814 ± 0.127).
- Il valore medio di BMD femore collo differiva in maniera statisticamente significativa tra “Inattivo” e “Moderatamente inattivo” ($p=0.004$), ovvero un livello di attività fisica leggermente più elevato della sedentarietà, si associa ad una maggiore BMD al collo femorale (0.622 ± 0.086 vs. 0.711 ± 0.126).

Al Tempo 1, una differenza significativa tra i gruppi era presente per i parametri:

- circonferenza ombelicale [$F(3,162)= 4.281, p=0.006$];
- FM (%), [$F(3,148)= 4.716, p=0.004$];
- FFM (%), [$F(3,148)= 4.716, p=0.004$];
- TBW (%), [$F(3,148)= 3.569, p=0.016$];
- 25OHvitaminaD ematica [$F(3,130)= 3.276, p=0.023$].

I post-hoc con correzione di Bonferroni hanno indicato che:

- il valore medio di circonferenza ombelicale differiva in maniera statisticamente significativa tra “Inattivo” ed “Attivo” ($p=0.004$), ovvero coloro che erano “Inattive” avevano una circonferenza ombelicale maggiore delle “Attive” (29.5 ± 6.3 vs. 23.7 ± 6.4).
- Il valore medio di FM (%) differiva in maniera statisticamente significativa tra “Moderatamente inattivo” ed “Attivo” ($p=0.010$), ovvero coloro che erano “Moderatamente inattive” avevano una FM maggiore delle “Attive” (93.4 ± 11.2 vs. 85.9 ± 10.3).
- Il valore medio di FFM (%) differiva in maniera statisticamente significativa tra “Inattivo” ed “Attivo” ($p=0.006$) e tra “Moderatamente inattivo” ed “Attivo” ($p=0.010$), ovvero coloro che erano “Attive” avevano una FFM maggiore rispetto a quelle “Inattive” e “Moderatamente inattive”.
- Il valore medio di TBW (%) differiva in maniera statisticamente significativa tra

“Inattivo” ed “Attivo” ($p=0.036$) e tra “Moderatamente inattivo” ed “Attivo” ($p=0.032$), ovvero coloro che erano “Attive” avevano una TBW maggiore rispetto a quelle “Inattive” e “Moderatamente inattive”.

- Il valore medio di 25OHvitaminaD ematica differiva in maniera statisticamente significativa tra “Inattivo” ed “Attivo” ($p=0.018$), ovvero coloro che erano “Attive” avevano livelli di 25OHvitaminaD ematica maggiori rispetto a quelle “Inattive” (44.6 ± 28.1 vs. 31.8 ± 14.0).

4.2 ANALISI DEI DATI NELLA POPOLAZIONE DI DONNE IN GRAVIDANZA

4.2.1 DATI SOCIO-DEMOGRAFICI, ANTROPOMETRICI E CLINICI

Sono state reclutate 279 donne in gravidanza, delle quali 245 (87.8% dei soggetti reclutati) sono state rivalutate a fine gravidanza, intorno alla 30-32° settimana gestazionale, e 184 (65.9% dei soggetti reclutati) sono state rivalutate a circa 3 mesi dal parto.

Le caratteristiche socio-demografiche, antropometriche e di stile di vita dei soggetti partecipanti nei tre tempi di valutazione sono state riportate in Tabella 7.

Al Tempo 0, l'età media era di 34 ± 5.3 , il peso medio era di 60.7 ± 10.6 ed il BMI era di 22.3 ± 3.6 , quindi prevalentemente normopeso. La maggior parte dei soggetti risultavano essere di nazionalità italiana (90.3%), sposate e/o conviventi (90.7%) e laureate (53.4%).

L'effetto delle valutazioni nel tempo sul peso, sul BMI e sulla glicemia è stato valutato attraverso un'ANOVA per misure ripetute. È emerso un effetto significativo delle valutazioni nel tempo sul peso [$F(2,356)= 606.38$, $p<0.001$] e sul BMI [$F(2,356)= 602.34$, $p<0.001$]. I post-hoc con correzione di Bonferroni hanno mostrato che le misurazioni del peso e del BMI al Tempo 1 erano significativamente maggiori rispetto al Tempo 0 e rispetto al Tempo 2 ($p<0.001$) ed anche al Tempo 2 le due variabili risultavano più elevate rispetto al basale ($p<0.001$). Per quanto riguarda la glicemia, non è emerso un effetto significativo nei tre momenti di valutazione, ma bisogna tenere presente che al Tempo 2 erano disponibili i valori di glicemia di solo 16 soggetti. Applicando lo Student's t-test per campioni appaiati, tra il valore al Tempo 0 ed il valore al Tempo 1 è emersa una differenza statisticamente significativa ($p<0.001$), ovvero al Tempo 1 è stato registrato un valore medio di glicemia inferiore rispetto al Tempo 0 (79.1 ± 7.0 vs. 83 ± 7.1).

Al Tempo 0, il 3.9% delle donne ha dichiarato di essere fumatrice, il 6.5% di consumare bevande alcoliche abitualmente e il 28% di praticare regolare attività fisica. I cambiamenti dello stile di vita in termini di fumo, consumo di alcolici ed attività fisica riscontrati nei due tempi seguenti, sono riportati in Tabella 7. Il test di McNemar ha evidenziato che non c'è stata variazione statisticamente significativa nell'abitudine al fumo, mentre è stata riscontrata una differenza significativa nel consumo di bevande alcoliche tra il Tempo 0 ed il Tempo 2 ($p<0.001$) e tra il Tempo 1 ed il Tempo 2 ($p<0.001$), ovvero nel post-parto il

consumo di bevande alcoliche è aumentato significativamente. Anche la pratica dell'attività fisica è variata in maniera statisticamente significativa tra il Tempo 0 ed il Tempo 1 ($p<0.001$), tra il Tempo 0 ed il Tempo 2 ($p=0.002$) e tra il Tempo 1 ed il Tempo 2 ($p<0.001$), ovvero a fine gravidanza è stata riscontrata la maggiore percentuale di soggetti che praticavano attività fisica e nel post-parto, invece, si è registrata la minore percentuale.

Caratteristiche	Tempo 0 (N=279)	Tempo 1 (N=245)	Tempo 2 (N=184)
Età (media ±DS)	34 ± 5.3	34 ± 5.0	34 ± 5.1
Peso, kg (media±DS)	60.7 ± 10.6	69.2 ± 10.8	63.9 ± 11.5##
BMI, kg/m² (media±DS)	22.3 ± 3.6*	25.3 ± 3.6	23.3 ± 3.7##
Settimana gestazionale (media±DS)	10.3 ±1.1	31.0 ± 1.5	/
Glicemia, mg/dL (media±DS)	82.8 ± 7.1**	79.03 ± 7.1#	76.5 ± 18.8###
Nazionalità (%)	Italiana: 90.3% Europea: 6.5% Extra-Europea: 3.2%	Italiana: 91% Europea: 6.9% Extra-Europea: 2%	Italiana: 91.8% Europea: 5.4% Extra-Europea: 2.7%
Stato civile (%)	Nubile: 7.2% Sposata/Convivente: 90.7% Separata/Divorziata: 2.2%	Nubile: 6.1% Sposata/Convivente: 92.2% Separata/Divorziata: 1.6%	Nubile: 5.4% Sposata/Convivente: 92.4% Separata/Divorziata: 2.2%
Grado di istruzione (%)	Licenza media: 5% Diploma superiore: 38.4% Laurea: 53.4% Post-laurea: 3.2%	Licenza media: 3.7% Diploma superiore: 38.8% Laurea: 53.9% Post-laurea: 3.7%	Licenza media: 2.2% Diploma superiore: 40.8% Laurea: 54.3% Post-laurea: 2.7%
Abitudine al fumo (%)	Sì: 3.9% No: 96.1%	Sì: 3.3% No: 96.7%	Sì: 5.4% No: 94.6%
Consumo bevande alcoliche (%)	Sì: 6.5% *** No: 99.6%	Sì: 7.8% No: 92.2%	Sì: 29.3% No: 70.7%
Attività fisica (%)	Sì: 28% No: 72%	Sì: 42% No: 58%	Sì: 17.9% No: 82.1%

Tabella 7. Caratteristiche socio-demografiche, antropometriche e di stile di vita delle donne in gravidanza, nei tre tempi di valutazione. BMI: Body Mass Index.

*N=276; **N= 255; ***N=278; #N=219; ##N= 180; ###N=16.

Nelle Figure 20 e 21 sono riportate le percentuali di risposta alle domande di valutazione anamnestica, poste in fase di reclutamento e dei due successivi follow-up.

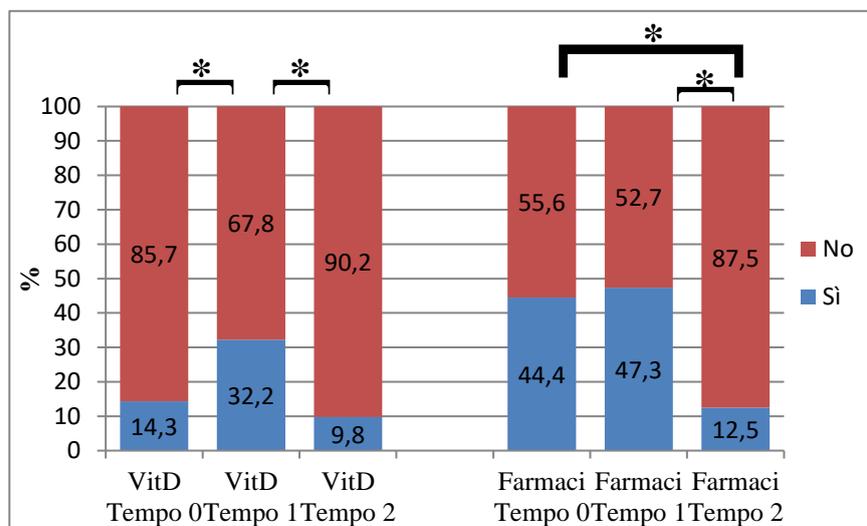


Figura 20. Percentuali di risposta alle domande relative all'assunzione di farmaci e supplementi delle donne in gravidanza, nei tre tempi di valutazione. VitD: vitamina D. * $p < 0.001$.

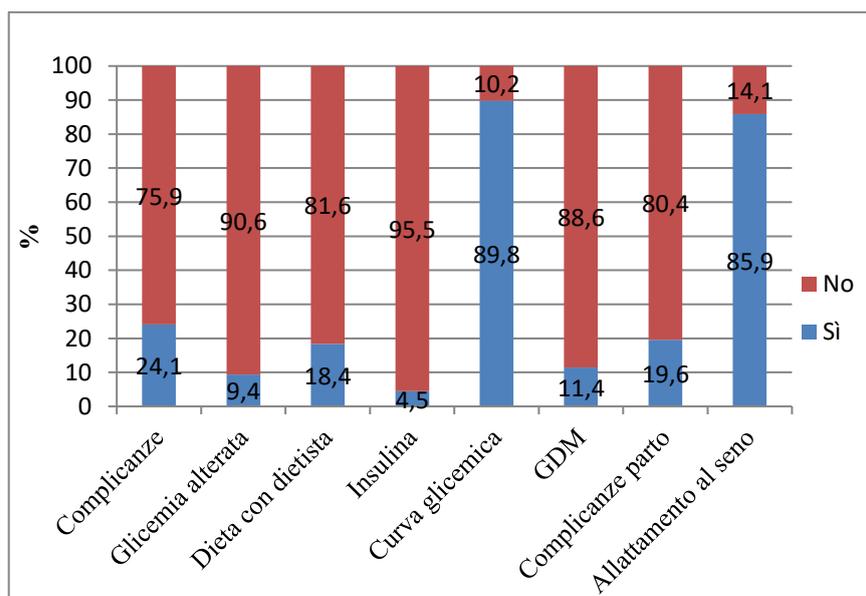


Figura 21. Percentuali di risposta alle domande relative alla presenza di complicanze della gravidanza, alla presenza di glicemia alterata, alla consulenza nutrizionale da una dietista, all'assunzione di insulina, all'esecuzione della curva glicemica, alla presenza di diabete gestazionale, alla presenza di complicanze del parto ed allattamento al seno, delle donne in gravidanza, ai tempi 1 e 2. GDM: Gestational Diabetes Mellitus.

Dalla valutazione anamnestica è emerso che l'assunzione di vitamina D era maggiore al Tempo 1 rispetto al Tempo 0 ed al Tempo 2 ($p < 0.001$), mentre l'assunzione di farmaci era minore al Tempo 2 rispetto al Tempo 0 ed al Tempo 1 ($p < 0.001$). I farmaci più comunemente usati erano il progesterone, la levotiroxina, l'eparina e l'acido acetilsalicilico. Inoltre, le complicanze più comuni riscontrate in gravidanza erano il GDM

(42.4%), l'accorciamento del collo dell'utero (13.6%) e l'anemia (8.5%), mentre le complicanze legate al parto riguardavano principalmente la terapia intensiva per il nascituro (50%) e l'emorragia per le partorienti (30.6%). La maggior parte delle donne allattava al seno in maniera esclusiva (69.6%) ed il 16.3% allattava al seno con un'integrazione di latte artificiale.

4.2.2 LE ABITUDINI ALIMENTARI

Il questionario di valutazione dell'aderenza alla DM ha mostrato che in tutti i tempi di valutazione la maggior parte delle donne aveva un livello "Alto" di aderenza alla DM (Figura 22). Il punteggio medio al Tempo 0 era di 7.19 ± 1.69 , al Tempo 1 di 7.62 ± 1.58 ed al Tempo 2 di 7.25 ± 1.40 .

L'effetto delle valutazioni nel tempo sul punteggio di aderenza alla DM è stato valutato attraverso un'ANOVA per misure ripetute ed è emerso un effetto significativo [$F(2,364)=7.26$, $p=0.001$]. I post-hoc corretti con Bonferroni hanno rivelato che il punteggio al Tempo 1 era significativamente maggiore rispetto a quello del Tempo 0 ($p=0.002$) ed a quello del Tempo 2 ($p=0.003$), mostrando un valore significativamente più alto alla fine della gravidanza rispetto agli altri due momenti di valutazione.

Le risposte al questionario DM sono mostrate in Figura 23. L'utilizzo dell'olio d'oliva è aumentato in maniera significativa al Tempo 2 rispetto al Tempo 0 ($p=0.006$) ed al Tempo 1 ($p<0.001$). Il numero di porzioni giornaliere di verdure è aumentato in maniera significativa al Tempo 1 rispetto al Tempo 0 ($p<0.001$), mantenendosi più alto al Tempo 2 rispetto al Tempo 0 ($p<0.001$), ma diminuendo rispetto al Tempo 1 ($p=0.010$).

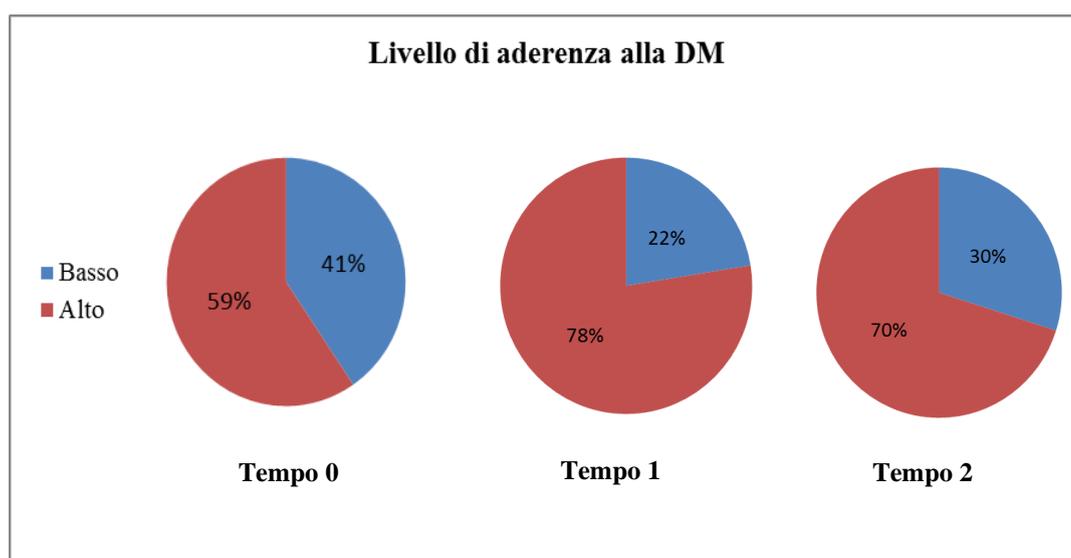


Figura 22. Livello di aderenza alla Dieta Mediterranea (DM), nelle donne in gravidanza al Tempo 0 (N=279), al Tempo 1 (N=245) ed al Tempo 2 (N= 184).

Il consumo giornaliero di frutta si è dimostrato più alto al Tempo 1 rispetto al Tempo 0

($p=0.040$) e rispetto al Tempo 2 ($p=0.006$). Il consumo settimanale di legumi è diminuito in maniera significativa al Tempo 2 rispetto al Tempo 1 ($p<0.001$) e rispetto al Tempo 0 ($p=0.005$).

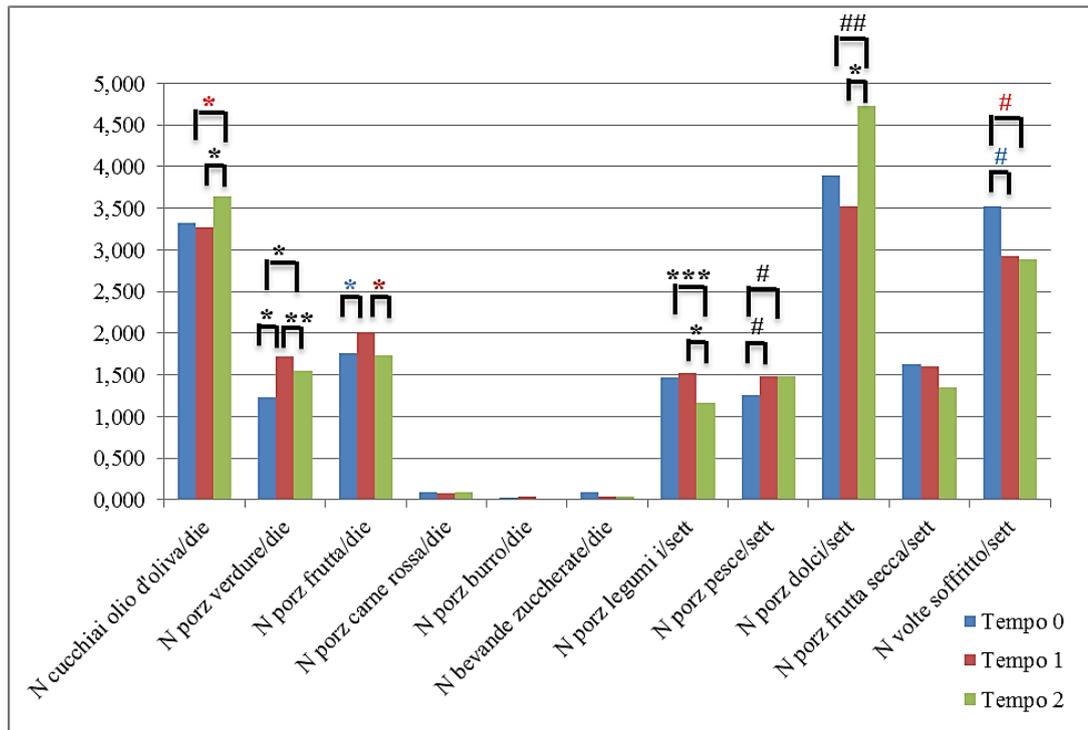


Figura 23. Frequenza di consumo degli alimenti, in base al questionario di aderenza alla Dieta Mediterranea, nelle donne in gravidanza ai tre tempi di valutazione. * $p<0.001$; ** $p=0.010$; *** $p=0.005$; * $p=0.006$; * $p=0.040$; # $p=0.017$; ## $p=0.001$; # $p=0.002$; # $p=0.003$.

Il numero di porzioni di pesce consumate in settimana era più basso al Tempo 0 rispetto al Tempo 1 ($p=0.017$) ed al Tempo 2 ($p=0.017$), mentre il consumo settimanale di dolci è aumentato in maniera significativa al Tempo 2, rispetto al Tempo 1 ($p<0.001$) e rispetto al Tempo 0 ($p=0.001$). Infine, il consumo settimanale di pietanze preparate con il soffritto (definito come “salsa fatta con pomodoro e cipolla, porro o aglio e cotta a fuoco lento con olio d’oliva”) è diminuito in maniera significativa dal Tempo 0 ai Tempi 1 e 2 (rispettivamente $p=0.003$ e $p=0.002$).

L’apporto giornaliero di calcio stimato con il FFQ è risultato al Tempo 0 di 870.3 ± 335.3 mg, al Tempo 1 di 1035.4 ± 304.4 mg ed al Tempo 2 di 957.2 ± 301.9 mg (Figura 24). Al Tempo 0 ed al Tempo 1 l’introito di calcio risulta significativamente inferiore rispetto al PRI per la gravidanza che è pari a 1200 mg ($p<0.001$). Al Tempo 2, l’apporto di calcio risulta più basso rispetto al PRI per l’allattamento che è pari a 1000 mg, ma non in maniera significativa ($p=0.056$). Il valore più elevato è stato riscontrato al Tempo 1 e differisce significativamente sia da quello del Tempo 0 ($p<0.001$), sia da quello del Tempo 2 ($p=0.004$). Sebbene al Tempo 2 l’introito giornaliero di calcio fosse inferiore rispetto al

Tempo 1, tale valore risulta significativamente più elevato rispetto al Tempo 0 ($p=0.036$).

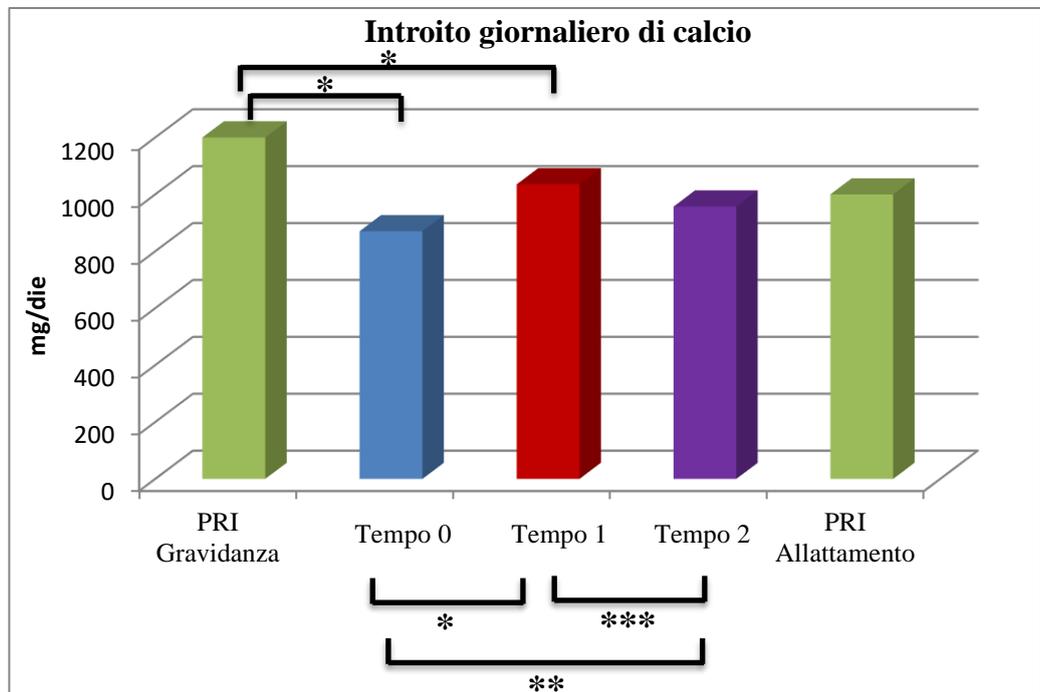


Figura 24. Introito giornaliero di calcio rispetto al PRI per la gravidanza al Tempo 0 ed al Tempo 1 e rispetto al PRI per l'allattamento al Tempo 2, nelle donne in gravidanza. * $p<0.001$; * $p=0.036$; *** $p=0.004$.

Le frequenze di risposta al FFQ sono state riportate nelle Figure 25, 26, 27, 28, 29 e 30. Tramite test di McNemar è stato valutato se le risposte alle domande fossero cambiate in maniera statisticamente significativa nei tre tempi di valutazione. Da quest'analisi è risultato che le percentuali di risposta alle domande, che sono cambiate in maniera statisticamente significativa, sono quelle relative a:

- Il consumo di latte è aumentato dal Tempo 0 (64%) al Tempo 1 (71%), $p=0.012$.
- Il consumo di yogurt tradizionale è diminuito al Tempo 2 (58%), sia rispetto al Tempo 1 ($p<0.001$), sia rispetto al Tempo 0 ($p=0.004$), mentre il consumo di yogurt greco è diminuito al Tempo 2, rispetto al Tempo 0 ($p=0.025$).
- Il consumo di formaggio ad alto contenuto di calcio si è ridotto dal Tempo 0 al Tempo 2 ($p=0.017$) ed il consumo di formaggio a medio contenuto di calcio è diminuito in maniera graduale dal Tempo 0 al Tempo 1 ($p=0.015$), dal Tempo 1 al Tempo 2 ($p=0.044$) e in maniera evidente dal Tempo 0 al Tempo 2 ($p=0.001$).
- Il consumo dei sostituti del pane (come crackers, grissini, gallette, fette biscottate, ecc.) si è ridotto in maniera graduale dal Tempo 0 al Tempo 1 ($p<0.001$), da quest'ultimo al Tempo 2 ($p=0.012$) ed in maniera evidente dal Tempo 0 al Tempo 2 ($p<0.001$).

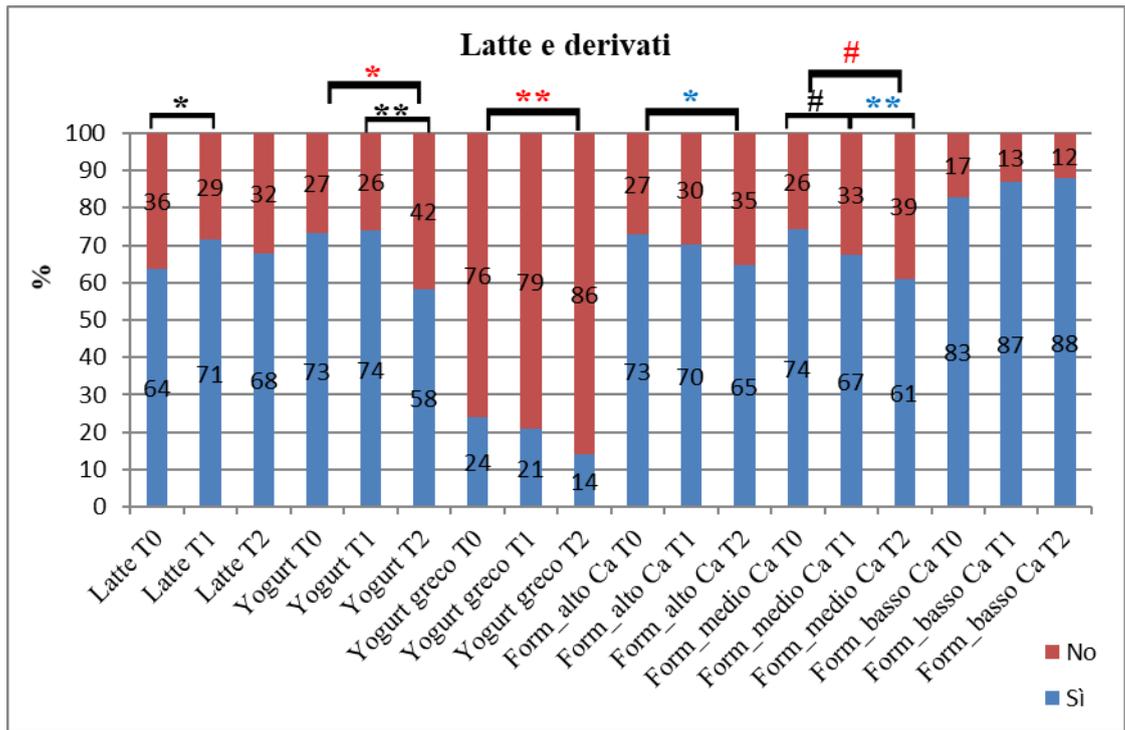


Figura 25. Frequenze di risposta (%) al FFQ per quanto riguarda latte e derivati, nelle donne in gravidanza ai tre tempi di valutazione. * $p=0.012$; ** $p<0.001$; * $p=0.004$; ** $p=0.025$; * $p=0.017$; ** $p=0.044$; # $p=0.015$; # $p=0.001$.

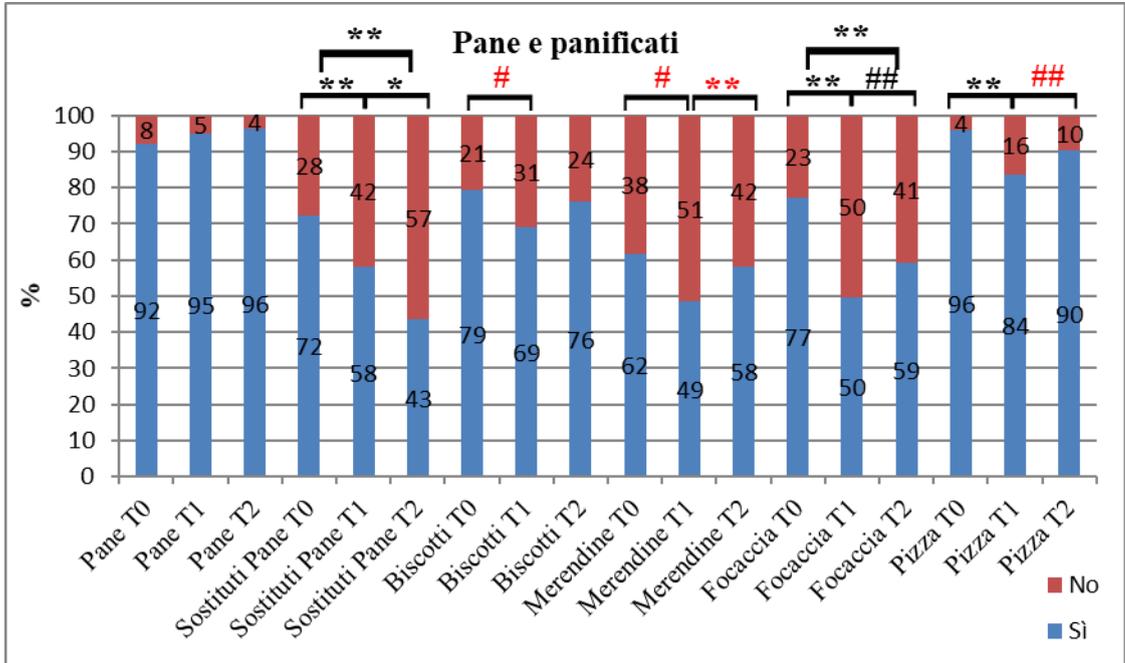


Figura 26. Frequenze di risposta (%) al FFQ per quanto riguarda pane e panificati, nelle donne in gravidanza ai tre tempi di valutazione. * $p=0.012$; ** $p<0.001$; ** $p=0.025$; # $p=0.015$; # $p=0.001$; ### $p=0.026$.

- Il consumo di biscotti è diminuito dal Tempo 0 al Tempo 1 ($p=0.001$) e l'assunzione

di merendine o brioche da pasticceria si è ridotto dal Tempo 0 al Tempo 1 ($p=0.001$), ma è aumentato al Tempo 2 ($p=0.025$) pur rimanendo inferiore rispetto al Tempo 0.

- Il consumo di focaccia o schiacciata si è ridotto dal Tempo 0 al Tempo 1 ($p<0.001$), ma è aumentato al Tempo 2 ($p=0.026$) pur rimanendo inferiore rispetto al Tempo 0 ($p<0.001$), mentre il consumo di pizza è diminuito dal Tempo 0 al Tempo 1 ($p<0.001$), ma è aumentato al Tempo 2 ($p=0.026$).
- Il consumo di patate si è ridotto dal Tempo 0 al Tempo 1 ($p<0.001$), ma è aumentato al Tempo 2, pur rimanendo inferiore rispetto al Tempo 0 ($p=0.003$).

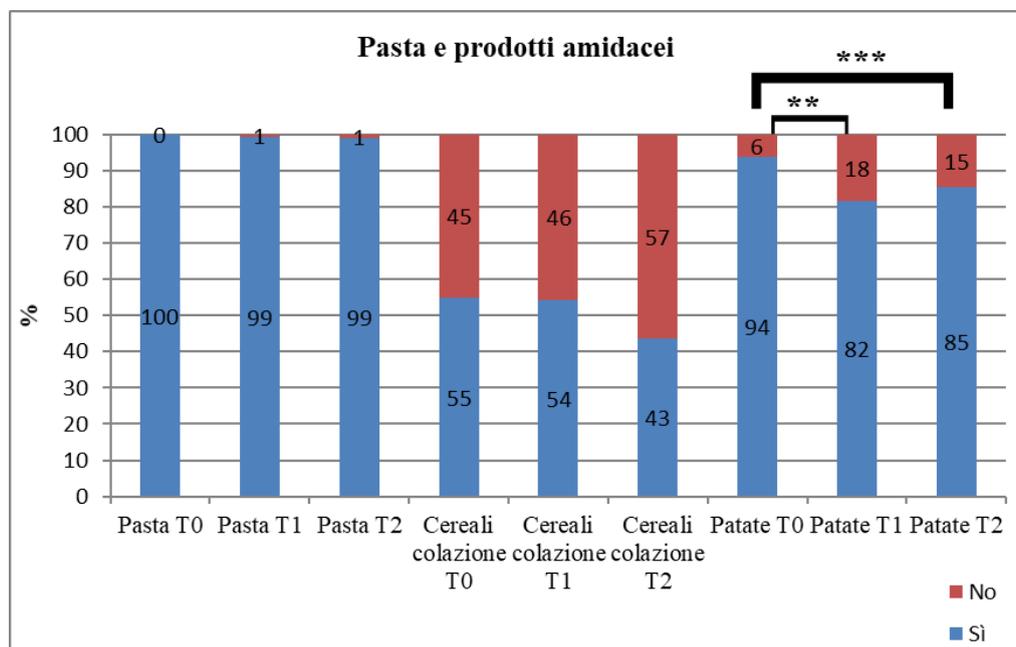


Figura 27. Frequenze di risposta (%) al FFQ per quanto riguarda pasta e prodotti amidacei, nelle donne in gravidanza ai tre tempi di valutazione. ** $p<0.001$; *** $p=0.003$.

- L'assunzione di legumi è diminuita in maniera evidente al Tempo 2, sia rispetto al Tempo 0 ($p=0.001$), sia rispetto al Tempo 1 ($p=0.004$), mentre il consumo di frutta secca è diminuito dal Tempo 0 al Tempo 2 ($p=0.018$).
- Il consumo di affettati è aumentato al Tempo 2, sia rispetto al Tempo 0 ($p=0.001$), sia rispetto al Tempo 1 ($p=0.007$), mentre il consumo di pesce fresco è aumentato dal Tempo 0 al Tempo 1 ($p<0.001$).

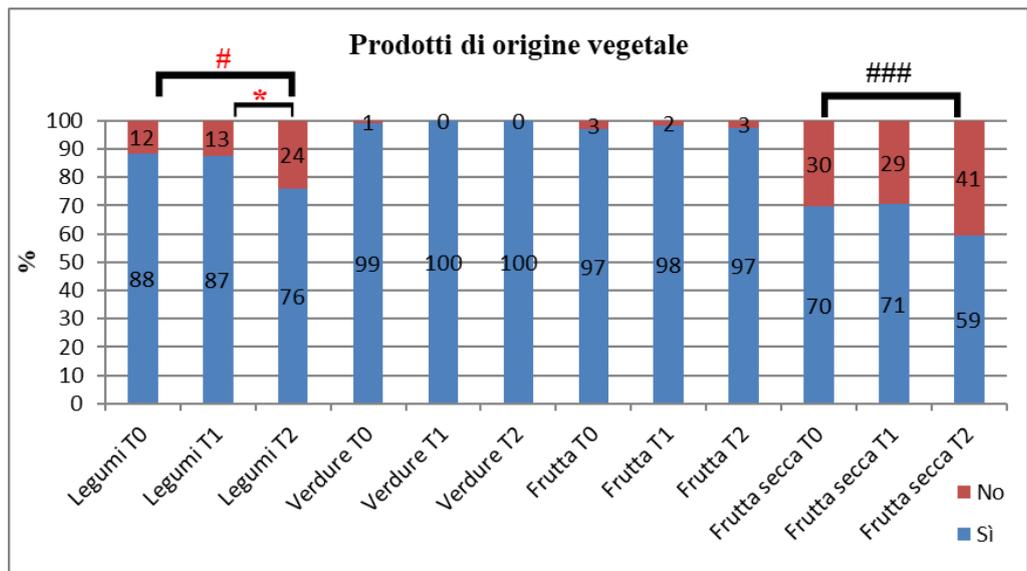


Figura 28. Frequenze di risposta (%) al FFQ per quanto riguarda prodotti di origine, nelle donne in gravidanza ai tre tempi di valutazione. * $p=0.004$; # $p=0.001$; ### $p=0.018$.

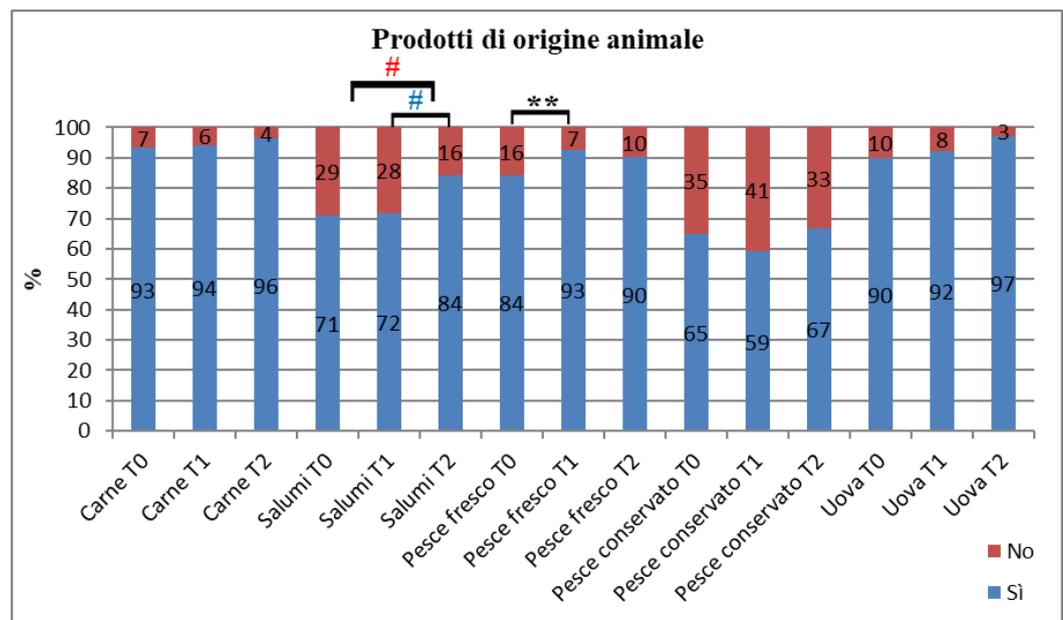


Figura 29. Frequenze di risposta (%) al FFQ per quanto riguarda prodotti di origine animale, nelle donne in gravidanza ai tre tempi di valutazione. ** $p<0.001$; # $p=0.001$; # $p=0.007$.

- Il consumo di gelato è diminuito dal Tempo 0 al Tempo 1 ($p=0.001$), mentre il consumo di cioccolato al latte o bianco è diminuito in maniera evidente dal Tempo 0 al Tempo 1 ($p<0.001$), aumentando poi al Tempo 2 rispetto al primo ($p=0.046$) e rimanendo comunque più basso rispetto al Tempo 0 ($p=0.028$).
- Il consumo di acqua minerale ricca di calcio è aumentato in maniera evidente dal Tempo 0 al Tempo 1 ($p<0.001$), diminuendo al Tempo 2 rispetto al primo ($p=0.002$), ma rimanendo comunque più alto rispetto al Tempo 0 ($p<0.001$).

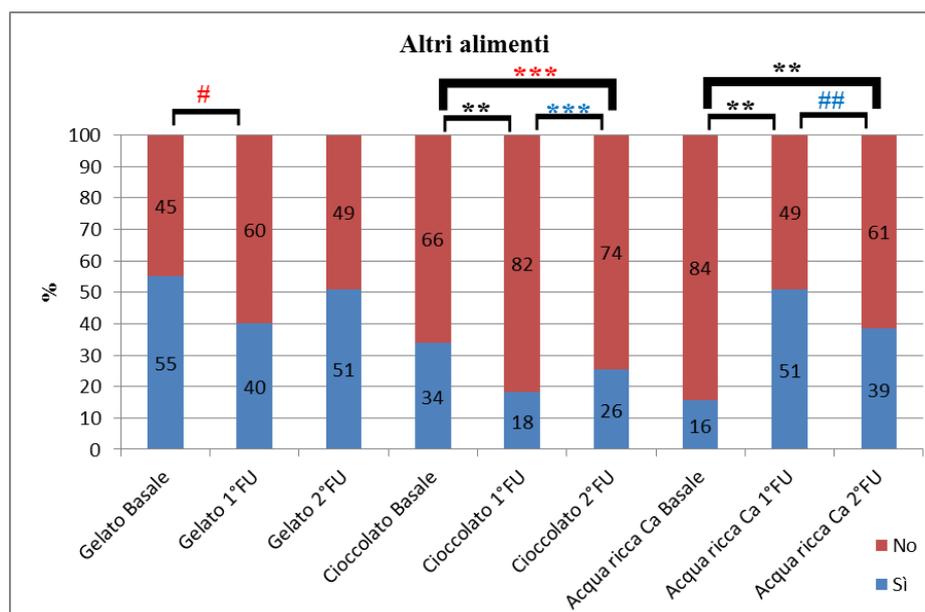


Figura 30. Frequenze di risposta (%) al FFQ per quanto riguarda gelato, cioccolato al latte o bianco ed acqua ricca di calcio nelle donne in gravidanza ai tre tempi di valutazione. **p<0.001; #p=0.001; ##p=0.002; ***p=0.046; ***p=0.028.

4.2.3 LE ANALISI DI RELAZIONE TRA LE VARIABILI

Il punteggio di aderenza alla DM è stato messo in relazione all'introito giornaliero di calcio, alla glicemia ed ai parametri antropometrici misurati nei tre momenti, tramite la correlazione di Pearson. In Tabella 8 sono riportati i coefficienti di correlazione al Tempo 0 ed ai due tempi successivi, che sono risultati significativi. In occasione di ogni valutazione il punteggio di aderenza alla DM si correla significativamente all'introito di calcio, ovvero ad un maggiore punteggio si associa un maggiore intake calcico.

	Punteggio aderenza DM Tempo 0	p	Punteggio aderenza DM Tempo 1	p	Punteggio aderenza DM Tempo 2	p
Introito di calcio Tempo 0	0.199	0.001				
Introito di calcio Tempo 1			0.197	0.002		
Introito di calcio Tempo 2					0.190	0.010
Glicemia Tempo 0	-0.134	0.032				
Peso Tempo 1			-0.258	<0.001		
Peso Tempo 2					-0.149	0.044
BMI Tempo 0	-0.126	0.036				
BMI Tempo 1			-0.294	<0.001		
BMI Tempo 2					-0.178	0.017

Tabella 8. Correlazione di Pearson tra punteggio di aderenza alla Dieta Mediterranea (DM) e valori di introito di calcio, glicemia ed antropometrici, nelle donne in gravidanza ai tre tempi di valutazione. BMI: Body Mass Index.

Per valutare se ci fosse una differenza significativa tra i livelli di aderenza alla DM “alto” e “basso” riguardo all’introito giornaliero di calcio, alla glicemia ed ai parametri antropometrici, è stato applicato lo Student’s t-test. È emerso che:

- al Tempo 0, si nota una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda introito giornaliero di calcio, che risultava maggiore in coloro che avevano un livello “alto” di aderenza alla DM (795.3 ± 319.1 vs. 921.3 ± 337.4), (Figura 31) ed i valori di glicemia a digiuno, che risultava più bassa in coloro che mostravano una maggiore aderenza alla DM (83.9 ± 7.5 vs. 82.0 ± 6.7), (Figura 32).

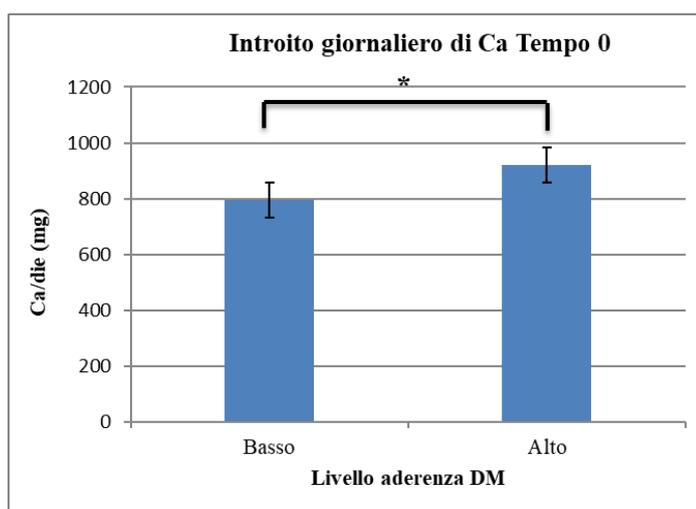


Figura 31. Introito giornaliero di calcio al Tempo 0, comparato nei due livelli di aderenza alla Dieta Mediterranea (DM), nelle donne in gravidanza (Student’s t-test, $*p < 0.002$).

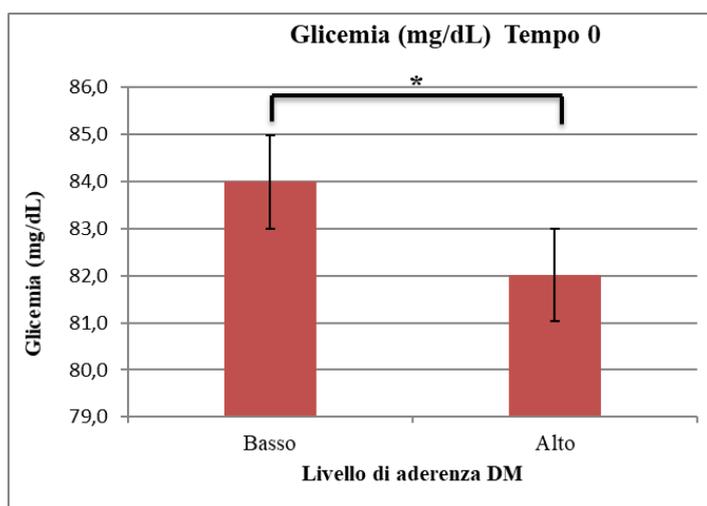


Figura 32. Glicemia al Tempo 0, comparata nei due livelli di aderenza alla Dieta Mediterranea (DM), nelle donne in gravidanza (Student’s t-test, $*p = 0.029$).

- Al Tempo 1, c’era una differenza statisticamente significativa nei valori di introito giornaliero di calcio, che risultava maggiore in coloro che avevano un livello “alto” di aderenza alla DM (936.9 ± 292.5 vs. 1063.9 ± 302.5), (Figura 33) e dei parametri

antropometrici, che risultavano più bassi in coloro che aderivano di più alla DM, ovvero per il peso 73.1 ± 14.5 vs. 68.1 ± 9.2 e per il BMI 26.9 ± 4.6 vs. 24.9 ± 3.2 (Figure 34 e 35).

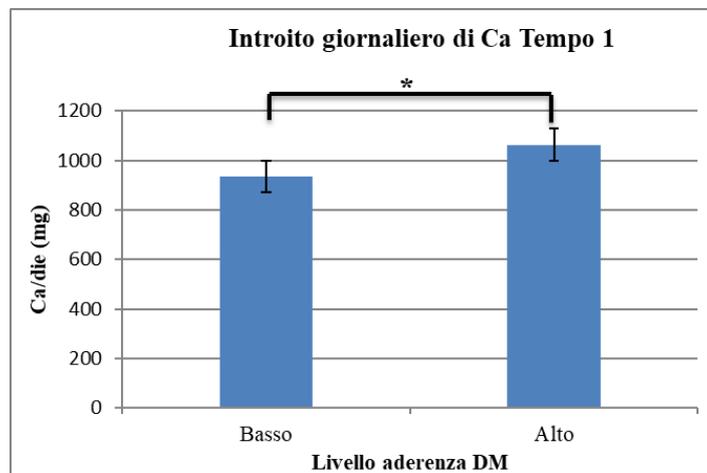


Figura 33. Introito giornaliero di calcio al Tempo 1, comparato nei due livelli di aderenza alla Dieta Mediterranea (DM), nelle donne in gravidanza (Student's t-test, * $p=0.006$).

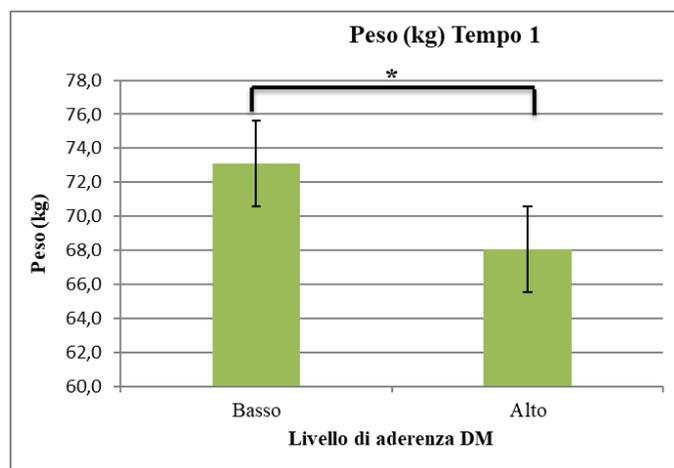


Figura 34. Peso al Tempo 1, comparato nei due livelli di aderenza alla Dieta Mediterranea (DM), nelle donne in gravidanza (Student's t-test, * $p=0.002$).

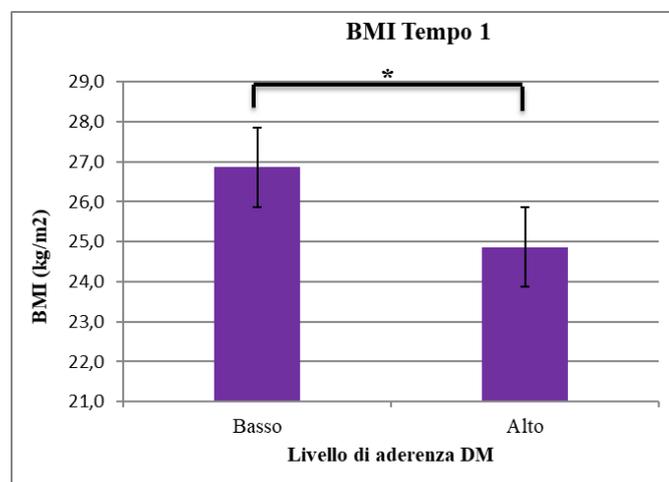


Figura 35. BMI al Tempo 1, comparato nei due livelli di aderenza alla Dieta Mediterranea (DM), nelle donne in gravidanza (Student's t-test, * $p<0.001$).

- Al Tempo 2, c'era una differenza statisticamente significativa nei valori dei parametri antropometrici, che risultavano più bassi in coloro che aderivano di più alla DM, ovvero per il peso 67.1 ± 15.2 vs. 62.5 ± 9.2 e per il BMI 24.4 ± 4.7 vs. 22.8 ± 3.2 , (Figure 36 e 37).

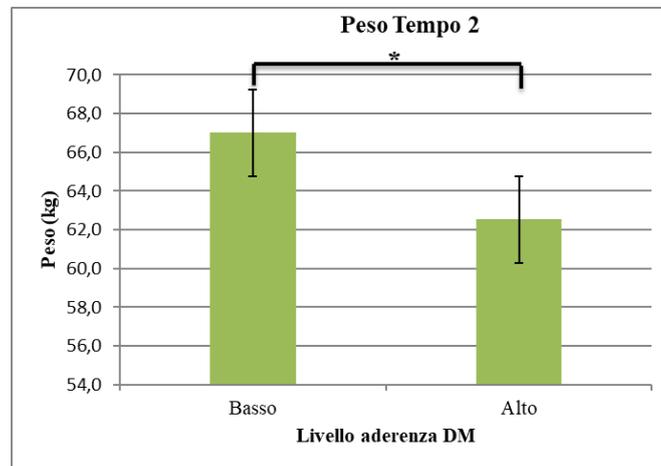


Figura 36. Peso al Tempo 2, comparato nei due livelli di aderenza alla DM (Student's t-test, *p=0.016).

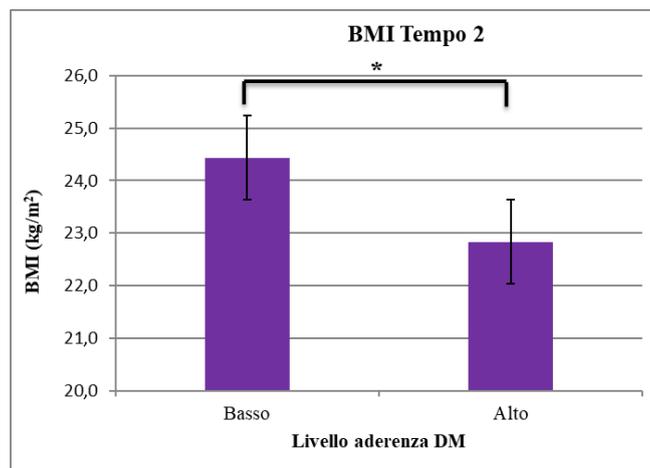


Figura 37. BMI al Tempo 2, comparato nei due livelli di aderenza alla Dieta Mediterranea (DM), nelle donne in gravidanza (Student's t-test, *p=0.008).

Inoltre, al Tempo 1 è stato valutato l'aumento di peso in gravidanza, in base alla condizione fisica, individuata tramite il calcolo del BMI al Tempo 0, ovvero suddividendo i soggetti nelle categorie "Sottopeso", "Normopeso", "Sovrappeso" ed "Obeso". L'ANOVA ha individuato un effetto significativo della categoria, individuata tramite il BMI al Tempo 0, sull'aumento di peso in gravidanza. I post-hoc corretti con Bonferroni hanno mostrato che le donne che erano inquadrate nella categoria "Obeso" al Tempo 0 hanno avuto un aumento di peso in gravidanza minore rispetto alle donne inquadrate come "Normopeso" (p=0.003) e come "Sovrappeso" (p=0.006), vedi Figura 38. Una differenza

statisticamente significativa non è stata riscontrata nell'aumento di peso tra i soggetti con livello di aderenza alla DM "Alto" e "Basso" ($p=0.481$). Tuttavia, al Tempo 1, le donne con un livello di aderenza "Alto" hanno avuto un aumento di peso minore rispetto a coloro con un livello "Basso" (8.6 ± 2.7 vs. 8.9 ± 4.2).

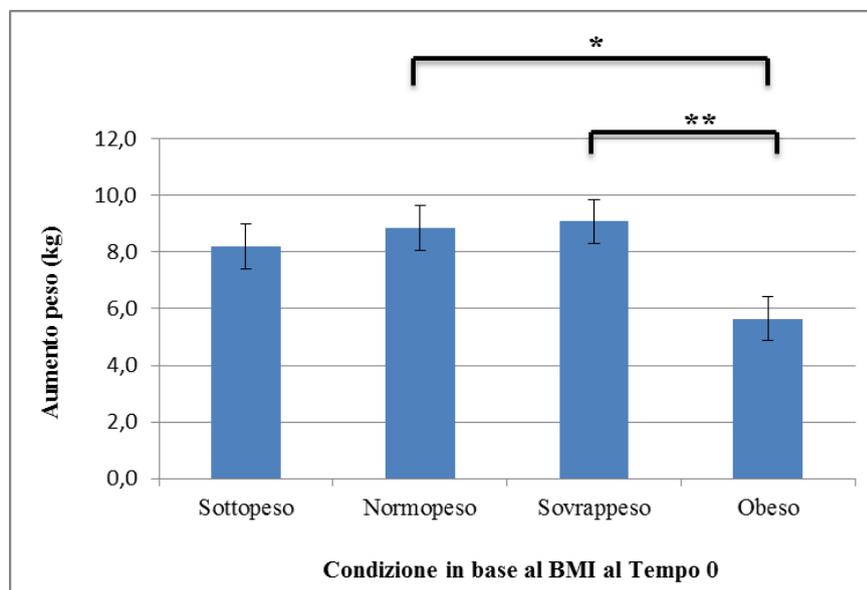


Figura 38. ANOVA per valutare l'aumento di peso in gravidanza nelle quattro categorie di condizione fisica, individuati tramite il BMI al Tempo 0, nelle donne in gravidanza al Tempo 1. * $p=0.003$; ** $p=0.006$.

Il valore della glicemia è stato correlato con i parametri antropometrici ed i coefficienti di correlazione di Pearson risultati significativi sono stati riportati in Tabella 9. Ai tempi 0 e 1, a valori di glicemia più elevati corrispondevano valori di peso e BMI maggiori.

	Glicemia Tempo 0	p	Glicemia Tempo 1	p
Peso Tempo 0	0.194	0.002		
Peso Tempo 1			0.233	0.002
BMI Tempo 0	0.229	<0.001		
BMI Tempo 1			0.233	0.002

Tabella 9. Correlazione di Pearson tra glicemia e valori antropometrici, nelle donne in gravidanza ai tre tempi 0 e 1. BMI: Body Mass Index.

Infine, i dati sono stati analizzati attraverso un modello ad effetti misti per misure ripetute (i tre "momenti" di rilevazione) con un fattore tra soggetti (livello di aderenza alla dieta mediterranea, alto o basso) e l'introito di calcio medio giornaliero come variabile dipendente. Sono stati considerati come effetti random le singole pazienti, il centro di reclutamento, la nazionalità, il grado di istruzione e lo stato civile. Risultano significativi sia l'effetto principale dell'aderenza alla dieta mediterranea ($F(424,2) = 24.73$, $p<0.001$) sia l'effetto principale delle misure ripetute ($F(424,1) = 21.51$, $p<0.001$) ma non l'interazione tra questi due effetti ($F(424,2) = 0.46$, $p=0.634$).

Il valore di calcio misurato al tempo 0 risulta inferiore a quello misurato al tempo 1 ($t(424) = 3.37, p= 0.0008$) e al tempo 2 ($t(424) = 2.39, p= 0.0173$).

5. DISCUSSIONE

Lo studio condotto durante il corso di dottorato ha indagato le abitudini alimentari e di stile di vita di due popolazioni di donne in fasi della vita molto delicate, la peri-menopausa e la gravidanza.

Il ruolo dell'alimentazione e, nello specifico, della DM sulla salute dell'osso è stato ampiamente dibattuto, non solo in popolazioni di donne in gravidanza [128], ma anche confrontando l'impatto delle scelte alimentari tra i periodi pre- e post-menopausale [129], [76]. Sebbene non sia emersa una relazione causa-effetto tra l'aderenza alla DM e la BMD e/o la riduzione del rischio di frattura, molte sono le evidenze che supportano l'importanza di uno stile dietetico di stampo mediterraneo per la salute dello scheletro, promuovendo il consumo di frutta, verdura, frutta secca e pesce, piuttosto che carni rosse e processate, bevande zuccherate ed alimenti confezionati ad alta densità energetica [99], [100].

All'interno di questo panorama, tale studio ha permesso di approfondire il ruolo dello stile di vita sulla salute dell'osso e di valutare i cambiamenti nel tempo delle abitudini alimentari di due popolazioni di donne afferenti a strutture specializzate per il metabolismo osseo e per la gravidanza.

Per quanto riguarda la popolazione di donne in peri-menopausa, è emerso che la maggior parte dei soggetti era di nazionalità italiana (98%), sposata e/o convivente (66.8%) ed in menopausa (93.5%). L'abitudine al fumo non era molto diffusa, infatti solo il 12.1% delle donne ha dichiarato di fumare al reclutamento ed il dato si è mantenuto simile (12.3%) anche nelle donne rivalutate al follow-up. Considerando che la carenza di vitamina D risulta essere una problematica molto diffusa, specialmente nelle donne in post-menopausa [130], un aspetto importante che è stato rilevato al reclutamento è che il 73.5% dei soggetti faceva già integrazione con vitamina D. Inoltre, i livelli ematici di 25OH-vitamina D erano in linea con quanto raccomandato come valori di sufficienza (30-100 ng/mL), infatti, sia al basale, sia al follow-up, i valori medi di vitamina D ematica erano significativamente maggiori rispetto al valore minimo di sufficienza (rispettivamente $p<0.001$ e $p=0.001$). Probabilmente, dal momento che è stata reclutata una popolazione di donne che afferivano ad un centro specialistico per il metabolismo osseo, erano soggetti già sensibilizzati sulla necessità di tenere sotto controllo i livelli sierici di vitamina D ed eventualmente provvedere con un'integrazione specifica.

La valutazione dell'aderenza alla DM ha mostrato che la maggior parte dei soggetti aveva un livello "Medio" di aderenza, sia al basale (70.5%), sia al follow-up (75%). Tuttavia, è interessante sottolineare che dal reclutamento al follow-up il punteggio è aumentato in

maniera statisticamente significativa ($p < 0.001$) ed, in particolare, sono aumentati i consumi delle porzioni giornaliere di verdura ($p = 0.003$), delle porzioni settimanali di frutta secca ($p = 0.037$) e delle pietanze cucinate con il “soffritto” (definito come “salsa fatta con pomodoro e cipolla, porro o aglio e cotta a fuoco lento con olio d’oliva”, $p = 0.002$), mentre è diminuito il consumo giornaliero di carne rossa e/o affettati ($p = 0.004$). Questi dati ci mostrano che c’è stato un cambiamento nelle abitudini alimentari, specialmente come orientamento verso uno stile dietetico maggiormente affine a quello mediterraneo. Inoltre, le associazioni tra il punteggio di aderenza alla DM ed i parametri antropometrici e di composizione corporea, effettuate al basale tramite la correlazione di Pearson, mostravano che un maggiore punteggio si associava a valori inferiori di BMI, circonferenza ombelicale e FM ed a valori maggiori di FFM e TBW. Queste valutazioni rispecchiano gli studi in letteratura, che evidenziano il ruolo della DM per il mantenimento di un peso adeguato e per il miglioramento di alcuni parametri metabolici, quali la FM [84], [131]. Un aspetto peculiare che è stato osservato solo al reclutamento è che a punteggio più alto di aderenza alla DM corrispondevano valori di fosfaturia nelle 24 ore più elevati. Considerando che tra gli alimenti ricchi di fosfato ci sono i cereali integrali, la frutta secca ed il pesce, ovvero alcuni degli alimenti tipici dell’alimentazione mediterranea, è plausibile che avere una maggiore aderenza a questo stile dietetico comporti un maggiore introito di fosfato e quindi una più elevata escrezione urinaria.

In questa popolazione, l’apporto giornaliero di calcio risultava essere significativamente inferiore al PRI, sia al reclutamento, sia al follow-up. Tuttavia, è stato registrato un lieve aumento dalla prima alla seconda valutazione, seppure in maniera non statisticamente significativa ($p = 0.133$). Tale aumento può essere dovuto al maggior consumo di acqua minerale ricca di calcio, che risultava essere più elevato al follow-up (14% vs. 38%, $p < 0.001$). A conferma dei dati già evidenziati dalla letteratura [44], al reclutamento un maggiore introito giornaliero di calcio si associava in maniera significativa ad una maggiore BMD a livello del collo femorale ($p = 0.047$).

La relazione tra aderenza alla DM ed apporto dietetico di calcio al basale ha mostrato una tendenza interessante, ovvero all’aumentare del livello di aderenza, corrispondevano valori di calcio crescenti, mentre al follow-up è stato preso in considerazione il punteggio complessivo, che ha mostrato una correlazione positiva, seppur non significativa ($p = 0.053$), con l’intake di calcio, confermando quanto osservato al basale. Quest’ultimo aspetto è molto interessante perché è ormai noto che in molti paesi dell’area mediterranea, l’introito dietetico di diversi micronutrienti, tra cui il calcio, risulti insufficiente a coprirne il fabbisogno giornaliero [132]. Da alcuni studi su bambini ed adolescenti è emerso che una scarsa aderenza alla DM si associava ad un introito giornaliero di calcio inadeguato [133], [134] e che adottare un’alimentazione mediterranea rispetto ad una dieta standard

favoriva un maggiore assorbimento, ritenzione ed escrezione di calcio [135]. Bisogna ricordare che, all'interno della DM, sono consigliate 1-2 porzioni al giorno di latte e/o yogurt e che, oltre a questo, aderire ad uno stile di vita più salubre sensibilizza verso scelte alimentari bilanciate, che portano ad un adeguato introito di tutti i nutrienti [136].

Il livello di attività fisica, indagato tramite il GPPAQ, sia al basale, che al follow-up è risultato essere prevalentemente “Inattivo” e/o “Moderatamente inattivo” (basale= 59%, follow-up= 62.3%). Al reclutamento, il Physical Activity Index (PAI) si è dimostrato avere un effetto sul punteggio di aderenza alla DM, sull'introito giornaliero di calcio e sulla BMD al femore totale ed al collo femorale. Il punteggio di aderenza alla DM è risultato più alto in coloro che erano più attive e, seppur in maniera meno evidente, anche l'introito giornaliero di calcio era maggiore in coloro che avevano un livello minimo di movimento settimanale. Da tali osservazioni emerge che, l'attenzione verso scelte alimentari adeguate si associa anche ad un minore livello di sedentarietà, andando a caratterizzare le donne secondo stili di vita più o meno salubri in generale. Per quanto concerne la BMD, solo a livello del collo femorale si rileva una maggiore BMD in coloro che erano “Moderatamente inattivi” rispetto agli “Inattivi”, mentre la BMD del femore totale risultava più elevata in coloro “Moderatamente inattivi” sia rispetto agli “Inattivi”, sia rispetto ai “Moderatamente attivi”. Al follow-up, il PAI ha dimostrato un effetto sui parametri di composizione corporea e sul livello sierico di vitamina D. Le donne con un PAI maggiore avevano una circonferenza ombelicale ed una FM più bassa ed i valori di FFM e di TBW risultavano più alti. L'importanza dell'attività fisica per il mantenimento di una composizione corporea ottimale e per il miglioramento della salute dello scheletro è ampiamente riconosciuta [48], [137], ma interventi educativi mirati per le donne in perimenopausa possono aiutare a diffondere questo messaggio. Infine, l'effetto del PAI sui livelli sierici di vitamina D ha mostrato che le donne “Attive” avevano livelli ematici di vitamina D significativamente maggiori rispetto alle “Inattive” e questo dato va a sottolineare l'importanza di una pratica regolare di attività fisica, sia essa all'aperto, che in ambienti chiusi (ad es. in palestra), per migliorare la quota di vitamina D circolante [138]. Dall'altro lato, da studi in letteratura è emerso che lo stesso livello di vitamina D ematica, in associazione ai livelli sierici di calcio, potrebbe essere implicata nel recupero muscolare, ovvero a livelli più elevati corrisponde una riduzione dei marker di affaticamento muscolare (quali lattato deidrogenasi, troponina I, idrossiprolina, creatinichinasi). Non solo, la 25OH-Vitamina D si correla positivamente alla performance muscolare, andando a migliorarne la forza, [139] e si può associare ad una minore prevalenza di sarcopenia [140].

Per quanto riguarda la popolazione di donne in gravidanza, è emerso che la maggior parte dei soggetti reclutati era di nazionalità italiana (90.3%), sposata e/o convivente (90.7%) e

laureata (53.4%). Lo stile di vita, indagato in termini di abitudine al fumo, consumo di bevande alcoliche ed attività fisica, ha evidenziato un'attenzione particolare nel periodo gestazionale. L'abitudine al fumo era poco diffusa al tempo 0, infatti solo il 3.9% dei soggetti ha dichiarato di fumare regolarmente, e questa percentuale non è cambiata in maniera significativa nel corso delle due successive valutazioni. Il consumo di bevande alcoliche si è mantenuto basso al tempo 0 (6.5%) ed al tempo 1 (7.8%) ed è aumentato in maniera statisticamente significativa al tempo 2 (29.3%). Questo dato fa riflettere sul fatto che questa popolazione di donne fosse più informata ed attenta proprio nel periodo gestazionale, mentre perdeva regolarità subito dopo il parto. Gli effetti dell'esposizione all'alcool durante la gravidanza, quali la sindrome feto alcolica (Fetal alcohol syndrome, FAS) ed i disordini dello spettro feto alcolico (fetal alcohol spectrum disorders, FASD), sono ben noti [141], [142], ma le conseguenze del consumo di bevande alcoliche nel periodo dell'allattamento sono ancora poco divulgate. Infatti, l'alcol consumato dalla madre entra nella circolazione sanguigna ed arriva al latte materno, con le stesse concentrazioni presenti nel sangue. Esporre il nascituro ad etanolo comporta dei cambiamenti nel ritmo del sonno, irritabilità, una riduzione della suzione e quindi dell'assunzione di latte ed una riduzione dello sviluppo psicomotorio [143]. Pertanto, l'AOU Careggi di Firenze ha elaborato un manuale per gli operatori del settore, dal titolo "Alcol e gravidanza – Il ruolo chiave degli operatori sanitari", per favorire la diffusione di questi messaggi e per sottolineare l'importanza dell'astensione dal consumo di bevande alcoliche sia in gravidanza, sia durante l'allattamento [144]. La pratica dell'attività fisica è aumentata in maniera significativa dal tempo 0 (28%) al tempo 1 (42%), riducendosi al tempo 2 (17.9%). Durante il periodo gestazionale, i soggetti hanno dichiarato di dedicarsi in maniera regolare ad attività quali la camminata, la ginnastica in acqua e/o il nuoto, lo yoga e/o il pilates, mentre nel post-parto, la mancanza di tempo è stata la motivazione per la riduzione significativa dell'esercizio fisico. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) raccomanda una regolare attività fisica a tutte le età, al fine di migliorare la funzionalità cardiorespiratoria e muscolare, favorire la salute delle ossa e ridurre il rischio di patologie croniche e di depressione [145]. Per la gravidanza, esistono diverse linee guida riguardo all'esercizio fisico, ma in generale si raccomanda di valutare il proprio stato di salute e poi promuovere la pratica di una costante attività fisica idonea alla persona, anche in base al grado di movimento pregravidico [146]. Infatti, questo permetterebbe di controllare l'aumento di peso, di prevenire il diabete gestazionale, di migliorare l'umore ed il sonno e di ridurre il rischio di pre-eclampsia [147].

La necessità di supplementazione con la vitamina D durante il periodo gestazionale è stato ampiamente indagato ed è emerso che questo tipo di integrazione in primis va ad incidere sui livelli sierici di 25-OH vitamina D e ha poi effetti per la prevenzione della pre-

eclampsia, del diabete gestazionale, del parto pre-termine e del basso peso alla nascita [148], [149]. Tuttavia, questi risultati vanno presi con cautela, poiché non ci sono evidenze che riportino le conseguenze di un eccesso di vitamina D [150]. L'integrazione con la vitamina D in questa popolazione ha subito delle variazioni nel corso delle valutazioni. Al tempo 1 si è registrata la maggiore percentuale di donne che assumevano vitamina D (32.2%), significativamente più alta rispetto al tempo 0 (14.3%) ed al tempo 2 (9.8%). Una maggiore conoscenza riguardo a questa tematica, anche tra gli specialisti del settore, potrebbe essere opportuna per impostare un'integrazione adeguata ed ottimizzare gli esiti della gravidanza stessa.

Un aspetto promettente che è emerso dallo studio di questa popolazione è che il 69.6% dei soggetti allattava al seno in maniera esclusiva e, considerando anche coloro che allattavano al seno con un'integrazione di latte artificiale (16.9%), si arrivava al 85.9%. Considerando l'importanza dell'allattamento al seno, sottolineata anche dall'OMS [151], è confortante registrare una diffusione così alta di questa pratica.

I parametri antropometrici presi in considerazione sono peso ed altezza auto-riportati dalle gestanti, da cui è stato ricavato il BMI. Il controllo del peso e dell'aumento di peso in gravidanza sono importanti fattori da conoscere per far sì che la gestante affronti la gravidanza nelle migliori condizioni nutrizionali possibili e che la gravidanza stessa decorra in uno stato di salute per la mamma e per il feto [152], [153], [154]. Come era prevedibile, al tempo 1 sono stati registrati il peso ed il BMI più elevati, significativamente maggiori rispetto al tempo 0 ($p < 0.001$) ed al tempo 2 ($p < 0.001$). Il peso ed il BMI sono risultati più elevati anche al tempo 2 rispetto al tempo 0, ovvero dopo circa 3 mesi dal parto le donne non erano ancora ritornate al peso pregravidico. È interessante notare che i soggetti che hanno iniziato la gravidanza in una condizione di "Obesità", definita in base al BMI al Tempo 0, hanno avuto un aumento di peso significativamente minore rispetto alle donne "Normopeso" ($p = 0.003$) ed alle donne "Sovrappeso" ($p = 0.006$). Questi risultati sono in linea con quanto raccomandato dall'Institute of Medicine (IOM) sull'aumento di peso in gravidanza [155]. Infatti, l'aumento di peso medio nelle donne sottopeso è stato di 8.2 ± 2.4 kg, nelle donne normopeso è stato 8.8 ± 2.8 kg, nelle donne sovrappeso è stato 9.1 ± 2.9 kg e nelle donne obese è stato di 5.6 ± 5.8 kg. Una differenza statisticamente significativa non è stata riscontrata nell'aumento di peso tra i soggetti con livello di aderenza alla DM "Alto" e "Basso" ($p = 0.481$). Tuttavia, al Tempo 1, le donne con un livello di aderenza "Alto" hanno avuto un aumento di peso minore rispetto a coloro con un livello "Basso" (8.6 ± 2.7 vs. 8.9 ± 4.2).

La glicemia a digiuno è stata registrata nei tre tempi di valutazione, in base agli esami ematici eseguiti dai soggetti per il monitoraggio in gravidanza. Secondo quanto previsto dalle linee guida italiane per lo screening di GDM, il rischio di GDM viene valutato in

base a diversi fattori, come il pregresso GDM, la storia familiare di diabete, $BMI \geq 25$ e la glicemia a digiuno ≥ 92 mg/dL, e si applicano dei monitoraggi specifici a 16-18 settimane ed a 24-28 settimane, a seconda del livello di rischio [156]. In questa popolazione, il valore della glicemia a digiuno era significativamente più basso al tempo 1 rispetto al tempo 0, mostrando che le gestanti avevano posto attenzione allo stile di vita e probabilmente anche alle scelte alimentari, per prevenire lo sviluppo di questa complicanza. Infatti, solo l'11.4% delle partecipanti ha poi sviluppato GDM. A conferma di ciò, le risposte al FFQ hanno mostrato che dal tempo 0 al tempo 1 è diminuito il consumo dei sostituti del pane, dei biscotti, delle merendine e/o brioche di pasticceria, di focaccia e/o schiacciata, di pizza, di patate, di gelato e di cioccolato al latte e/o bianco, ovvero degli alimenti più zuccherini che potevano influire sulla glicemia. Inoltre, è emerso che il valore della glicemia a digiuno si correlava in maniera positiva sia al peso, sia al BMI, al tempo 0 ed al tempo 1, ovvero a valori di glicemia più elevati corrispondevano valori di peso e BMI maggiori, come era prevedibile. Per tale motivo, l'intervento su fattori come peso e BMI, entrambi coinvolti nel rischio di GDM insieme ai valori glicemici, può favorire la prevenzione di questa complicanza della gravidanza.

La valutazione dell'aderenza alla DM ha mostrato che la maggior parte dei soggetti aveva un livello "Alto" di aderenza, in tutti i tempi di valutazione. Il punteggio di aderenza alla DM è risultato maggiore al tempo 1 (7.62 ± 1.58), in maniera statisticamente significativa sia rispetto al tempo 0, sia rispetto al tempo 2. Da notare il fatto che, il punteggio al tempo 2 era più alto rispetto a quello del tempo 0, nonostante non ci fosse una differenza statisticamente significativa. Le risposte al questionario sulla DM hanno mostrato che il miglioramento al tempo 1 era dovuto ad un maggiore consumo giornaliero di porzioni di verdura e frutta, di porzioni settimanali di legumi e di pesce e ad una riduzione del consumo di dolci. Per quanto riguarda il tempo 2, rispetto al tempo 1, è diminuito il consumo giornaliero di verdura e frutta ed il consumo settimanale di legumi ed è aumentato il consumo settimanale di dolci. Da questi dati è possibile evincere che c'è stato un maggiore orientamento verso lo stile dietetico mediterraneo specialmente alla fine della gravidanza, ovvero dopo che le donne erano state educate sui benefici di quest'alimentazione ed avevano la responsabilità della propria salute e della salute del loro feto. Dopo il parto è stata mantenuta una certa attenzione alle scelte alimentari, superiore rispetto al tempo 0, ma non tanto elevata quanto la fase finale del periodo gestazionale.

Le analisi di correlazione del punteggio di aderenza alla DM con la glicemia ed i parametri antropometrici hanno mostrato che un maggiore punteggio è inversamente correlato alla glicemia, al peso ed al BMI. Anche dal test t di Student si evince questo risultato: i soggetti che avevano un livello di aderenza alla DM "Alto" avevano valori medi di glicemia, peso e BMI più bassi rispetto a quelli con un livello "Basso". Quest'aspetto

conferma gli effetti benefici della DM in termini di buona tolleranza del glucosio e di mantenimento di uno stato di normopeso [117].

In questa popolazione, l'apporto giornaliero di calcio risultava essere significativamente inferiore al PRI per la gravidanza (1200 mg/die), al tempo 0 ed al tempo 1. Per quanto riguarda il tempo 2, l'introito di calcio era più basso rispetto al PRI per l'allattamento (1000 mg/die), ma non in maniera statisticamente significativa ($p=0.056$). È interessante notare che dal tempo 0 al tempo 1 c'è stato un aumento significativo nell'introito dietetico di calcio e, osservando le risposte al questionario di frequenza alimentare (FFQ), è emerso che è aumentato il consumo di latte ($p=0.012$), di pesce fresco ($p<0.001$) e di acqua minerale ricca di calcio ($p<0.001$). Per quanto riguarda il passaggio dal tempo 1 al tempo 2, c'è stata una diminuzione statisticamente significativa dell'apporto di calcio ed il FFQ evidenziava che era diminuito il consumo di yogurt tradizionale ($p<0.001$), di formaggio a medio contenuto di calcio ($p=0.044$), di legumi ($p=0.004$) e di acqua minerale ricca di calcio ($p=0.002$). Sebbene ci sia stata una riduzione nell'apporto di calcio tra tempo 1 e tempo 2, l'introito giornaliero registrato al tempo 2 risultava comunque significativamente più alto rispetto al tempo 0 ($p=0.036$) ed il FFQ ha mostrato che, rispetto al tempo 0, al tempo 2 era diminuito il consumo di yogurt tradizionale, di yogurt greco, di formaggio ad alto contenuto di calcio, di formaggio a medio contenuto di calcio, di legumi, di frutta secca, ma era aumentato il consumo di acqua minerale ricca di calcio.

La relazione tra aderenza alla DM ed apporto dietetico di calcio, indagata tramite la correlazione di Pearson, è risultata positiva in tutti i tempi di valutazione, ovvero al crescere del punteggio di aderenza alla DM, aumentava in maniera significativa anche l'introito alimentare di calcio. Questo dato è stato confermato anche dal test t di Student, al tempo 0 ed al tempo 1: i soggetti che mostravano un livello di aderenza alla DM "Alto" avevano valori medi di introito di calcio più elevati rispetto a quelli con un livello "Basso". Infine, l'applicazione di un modello ad effetti misti per misure ripetute ha permesso di valutare il variare dell'introito di calcio, considerando come effetti fissi il livello di aderenza alla DM e le misurazioni nel tempo e come effetti random le singole pazienti, il centro di reclutamento, la nazionalità, il grado di istruzione e lo stato civile. Tramite quest'analisi inferenziale, è stato possibile evincere che l'introito giornaliero di calcio era sempre più elevato quando si aveva un livello "Alto" di aderenza alla DM ed il valore misurato al tempo 0 era inferiore rispetto a quello misurato al tempo 1 ($p<0.001$) ed al tempo 2 ($p=0.017$).

Un recente studio di Zhang et al. ha indagato le differenze di introiti giornalieri dei nutrienti, tra cui il calcio, tra la popolazione cinese e quelle di altre zone del mondo, tra cui la popolazione italiana, quale rappresentante dello stile alimentare mediterraneo. I risultati hanno mostrato che l'introito di calcio differiva in maniera statisticamente significativa tra

la popolazione cinese e quella italiana, in tutte le fasce d'età e per ogni genere [157]. Pertanto, risulta chiaro che la ricerca in tale ambito è in continua evoluzione e lo studio in questa popolazione di donne in gravidanza pone l'attenzione su un aspetto molto importante, ovvero la necessità di favorire l'aderenza ad uno stile alimentare mediterraneo al fine, non solo di prevenire diverse patologie croniche, ma anche di ottimizzare l'introito di molti nutrienti fondamentali, tra cui il calcio.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, nonostante le molteplici ricerche, è ancora difficile stabilire quale sia la reale relazione tra stili dietetici e salute dell'osso, specialmente in gruppi di popolazione in cui molte possono essere le variabili coinvolte.

Questo studio risulta essere importante poiché si pone nell'ampio panorama di indagine per la prevenzione dell'osteoporosi e ha mostrato che l'aderenza alla DM in due popolazioni di donne, in peri-menopausa e in gravidanza, si correla ad un maggiore introito giornaliero di calcio. Inoltre, nel periodo dello studio è stato evidenziato un deciso miglioramento in termini di aumento sia del punteggio di aderenza alla DM, sia dell'apporto dietetico di calcio. Il colloquio nutrizionale operato in queste due popolazioni è consistito nella dispensazione di consigli che fanno parte della routinaria *buona pratica clinica*, atti a promuovere buone abitudini alimentari per la salute dell'osso ed a stimolare l'adesione alla DM. I colloqui con i soggetti prevedevano un tempo moderato (15-20 minuti) e, nel complesso, ogni donna veniva seguita per circa 1 anno. Pertanto, è interessante sottolineare che, con una tempistica di azione relativamente breve, è stato possibile ottenere un risultato promettente in termini di miglioramento dello stile di vita e di strategia preventiva.

7. RINGRAZIAMENTI

Desidero ricordare tutti coloro che mi hanno aiutato nella stesura della tesi con suggerimenti, critiche ed osservazioni: a loro va la mia gratitudine, anche se a me spetta la responsabilità per ogni errore contenuto in questo elaborato.

Ringrazio il mio tutor, la Prof.ssa Maria Luisa Brandi, per le direttive fornite e per avermi permesso di approfondire le conoscenze sul metabolismo osseo.

Ringrazio tutti coloro che hanno contribuito all'elaborazione, allo sviluppo ed all'attuazione di questo progetto: la Dott.ssa Luisella Cianferotti, la Dott.ssa Barbara Pampaloni, la Dott.ssa Silva Ottanelli e la Dott.ssa Caterina Fossi, quest'ultima preziosa per l'elaborazione dei protocolli di studio.

Ringrazio il Dott. Giorgio Gronchi, che mi ha aiutata e sostenuta per l'elaborazione della parte statistica, ed il Dott. Mirko Duradoni, per i consigli statistici.

Un ringraziamento va anche agli ambulatori di Ginecologia ed Ostetrica dell'AOU Careggi e del Presidio Ospedaliero Piero Palagi, per avermi dato la possibilità di attuare il progetto con le donne in gravidanza ed in particolare alla Prof.ssa Mariarosaria Di Tommaso ed alla Dott.ssa Valeria Dubini.

Infine, un ringraziamento speciale va a tutti i miei amici (nuove conoscenze e compagni di vecchia data), ai miei familiari ed a Giuseppe, perché mi hanno sempre supportata e motivata a dare il meglio di me.

8. BIBLIOGRAFIA

- [1] A. M. Coulston, C. J. Boushey and M. Ferruzzi, Nutrition in the prevention and treatment of disease, London: Elsevier, 2008.
- [2] C. A. Lee and T. A. Einhorn, The bone organ system, form and function, San Diego: Osteoporosis, second Ed., 2001.
- [3] R. Florencio-Silva, G. Rodrigues da Silva Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões and P. S. Cerri, "Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells," *BioMed research international*, vol. 2015, no. 421746, p. 17, 2015.
- [4] C. Cooper and S. Ferrari, "Compendio IOF sull'Osteoporosi," International Osteoporosis Foundation, Nyon, Switzerland, 2017.
- [5] S. Adamo, P. Carinci, M. Molinaro, G. Siracusa, M. Stefanini and E. Ziparo, Istologia di V. Monesi, Piccin, 2008.
- [6] J. Siddiqui and N. Partridge, "Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement," *Physiology (Bethesda)*, vol. May;31(3), pp. 233-45, 2016.
- [7] D. J. Hadjidakis and I. I. Androulakis, "Bone Remodeling," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. Dec;1092, pp. 385-96, 2006.
- [8] B. Frenkel, A. Hong, S. K. Baniwal, G. Coetzee, C. Ohlsson, O. Khalid and Y. Gabet, "Regulation of adult bone turnover by sex steroids," *J Cell Physiol*, vol. Aug;224(2), pp. 305-10, 2010.
- [9] S. Khosla, "Minireview: the OPG/RANKL/RANK system," *Endocrinology*, vol. Dec;142(12), pp. 5050-5, 2001.
- [10] B. Clarke, "Normal Bone Anatomy and Physiology," *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. Nov;3 Suppl 3:S, pp. 131-9, 2008.
- [11] M. L. Brandi, "Microarchitecture, the key to bone quality," *Rheumatology (Oxford)*, vol. Oct;48 Suppl 4:IV, pp. 3-8, 2009.
- [12] R. Bedini, F. Marinozzi, R. Pecci, L. Angeloni, F. Zuppante, F. Bini and A. Marinozzi, "Analisi microtomografica del tessuto osseo trabecolare: influenza della soglia di binarizzazione sul calcolo dei parametri istomorfometrici," Istituto Superiore di Sanità (Rapporti ISTISAN 10/15), Roma, 2010.
- [13] J. A. Kanis, E. McCloskey, J. Branco, M. L. Brandi, E. Dennison, J. P. Devogelaer, S. Ferrari, J. M. Kaufman, S. Papapoulos, J. Y. Reginster and R. Rizzoli, "Goal-directed treatment of osteoporosis in Europe," *Osteoporos Int.*, vol. Nov;25(11), pp. 2533-43, 2014.
- [14] M. Rossini, S. Adami, F. Bertoldo, D. Diacinti, D. Gatti, S. Giannini, A. Giusti, N. Malavolta, S. Minisola, G. Osella, M. Pedrazzoni, L. Sinigaglia, O. Viapiana and G. C. Isaia, "Linee guida 2015 per la Diagnosi, Prevenzione e Terapia dell'Osteoporosi," *Reumatismo*, vol. 68 (1), pp. 1-42, 2016.
- [15] J. Kanis and on behalf of the WHO Scientific Group, "Assessment of osteoporosis at the primary healthcare level. Technical Report," WHO Collaborating Centre, University of Sheffield, UK, 2008.
- [16] J. T. Schousboe and C. R. Debold, "Reliability and accuracy," *Osteoporosis Int.*, vol. 17, p. 281-289, 2006.
- [17] E. Hernlund, A. Svedbom, M. Ivergård, J. Compston, C. Cooper, J. Stenmark, E. V. McCloskey, B. Jönsson and J. A. Kanis, "Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden," *Arch Osteoporos*, vol. 8, p. 136, 2013.
- [18] International Osteoporosis Foundation, "International Osteoporosis Foundation Website, "Diagnosing Osteoporosis", [Online]. Available:

<https://www.iofbonehealth.org/diagnosing-osteoporosis>.

- [19] A. Oden, E. V. McCloskey, J. A. Kanis, N. C. Harvey and H. Johansson, "Burden of high fracture probability worldwide: secular increases 2010-2040," *Osteoporosis Int.*, vol. 26, pp. 2243-2248, 2015.
- [20] G. Ballane, J. A. Cauley, M. M. Luckey and G. El-Hajj Fuleihan, "Worldwide prevalence and incidence of osteoporotic vertebral fractures," *Osteoporosis Int.*, vol. 28(5), pp. 1531-1542, 2017.
- [21] J. Compston, A. Cooper, C. Cooper, R. Francis, J. A. Kanis, D. Marsh, E. V. McCloskey, D. M. Reid, P. Selby and M. Wilkins, "Guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women and men from the age of 50 years in the UK," *Maturitas*, vol. 62, pp. 105-108, 2009.
- [22] J. A. Kanis, O. Johnell, C. De Laet, H. Johansson, A. Oden, P. Delmas, J. Eisman, S. Fujiwara, P. Garnero, H. Kroger, E. V. McCloskey, D. Mellstrom, L. J. Melton, H. Pols, J. Reeve, A. Silman and A. Tenenhouse, "A meta-analysis of previous fracture and subsequent fracture risk," *Bone*, vol. Aug;35(2), pp. 375-82, 2004.
- [23] S. D. Sullivan, A. Lehman, N. K. Nathan, C. A. Thomson and B. V. Howard, "Age of menopause and fracture risk in postmenopausal women randomized to calcium + vitamin D, hormone therapy, or the combination: results from the Women's Health Initiative Clinical Trials," *Menopause*, vol. Apr;24(4), pp. 371-378, 2017.
- [24] C. M. Weaver, C. M. Gordon, K. F. Janz, H. J. Kalkwarf, J. M. Lappe, R. Lewis, M. O'Karma, T. C. Wallace and B. S. Zemel, "The National Osteoporosis Foundation's position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations," *Osteoporosis Int.*, vol. 27, p. 1281-1386, 2016.
- [25] J. A. Kanis, O. Johnell, A. Oden, H. Johansson, C. De Laet, J. A. Eisman, S. Fujiwara, H. Kroger, E. V. McCloskey, D. Mellstrom, L. J. Melton, H. Pols, J. Reeve, A. Silman and A. Tenenhouse, "Smoking and fracture risk: a meta-analysis," *Osteoporosis Int.*, vol. Feb;16(2), pp. 155-62, 2005.
- [26] J. A. Kanis, H. Johansson, O. Johnell, A. Oden, C. De Laet, J. A. Eisman, H. Pols and A. Tenenhouse, "Alcohol intake as a risk factor for fracture," *Osteoporosis Int.*, vol. 16, pp. 737-742, 2005.
- [27] A. Faje and A. Klibanski, "Body composition and skeletal health: too heavy? Too thin?," *Curr Osteoporosis Rep.*, vol. Sep;10(3), pp. 208-16, 2012.
- [28] J. A. Kanis, D. Hans, C. Cooper, S. Baim, J. P. Bilezikian, N. Binkley, J. A. Cauley, J. E. Compston, B. Dawson-Hughes, G. El-Hajj Fuleihan, H. Johansson, W. D. Leslie, E. M. Lewiecki, M. Luckey, A. Oden, S. E. Papapoulos, C. Poiana, R. Rizzoli, D. A. Wahl and E. V. McCloskey, "Interpretation and use of FRAX in clinical practice," *Osteoporosis Int.*, vol. 22, p. 2395-2411, 2011.
- [29] J. A. Kanis, E. McCloskey, H. Johansson, A. Oden and W. D. Leslie, "FRAX with and without Bone Mineral Density," *Calcif Tissue Int*, vol. 90, pp. 1-13, 2012.
- [30] T. H. Kim, H. H. Lee, D. S. Jeon and D. W. Byun, "Compression fracture in postpartum osteoporosis," *J Bone Metab*, no. 20, pp. 115-8, 2013.
- [31] M. Glerean, A. Furci, A. M. Galich, B. Fama and L. Plantalech, "Bone and mineral metabolism in primiparous women and its relationship with breastfeeding: a longitudinal study," *Medicina*, vol. 70, no. 3, p. 227-232, 2010.
- [32] U. K. Møller, S. Vi Streym, L. Mosekilde and L. Rejnmark, "Changes in bone mineral density and body composition during pregnancy and postpartum. A controlled cohort study," *Osteoporosis Int.*, vol. 23, no. 4, p. 1213-1223, 2012.
- [33] E. Lebel, Y. Mishukov, L. Babchenko, A. Samueloff, A. Zimran and D. Elstein, "Bone Mineral Density in Gravidia: Effect of Pregnancies and Breast-Feeding in Women of Differing Ages and Parity," *J Osteoporosis*, vol. 2014, p. 897182, 2014.
- [34] P. K. Wiklund, L. Xu, Q. Wang, T. Mikkola, A. Lyytikäinen, E. Völgyi, E.

- Munukka, S. M. Cheng, M. Alen, S. Keinänen-Kiukaanniemi and S. Cheng, "Lactation is associated with greater maternal bone size and bone strength later in life," *Osteoporos Int.*, vol. Jul;23(7), pp. 1939-45, 2012.
- [35] B. Heidari, P. Heidari, H. G. Nourooddini and K. O. Hajian-Tilaki, "Relationship between parity and bone mass in postmenopausal women according to number of parities and age," *Journal of Reproductive Medicine*, vol. 58, no. 9-10, p. 389-394, 2013.
- [36] K. Y. Yun, S. E. Han, S. C. Kim, J. K. Joo and K. S. Lee, "Pregnancy-related osteoporosis and spinal fractures," *Obstet Gynecol Sci.*, vol. Jan;60(1), pp. 133-137, 2017.
- [37] Y. Cherni, D. Desseauve, A. Decatoire, N. Veit-Rubinc, M. Begon, F. Pierre and L. Fradet, "Evaluation of ligament laxity during pregnancy," *J Gynecol Obstet Hum Reprod.*, vol. May;48(5), pp. 351-357, 2019.
- [38] C. S. Kovacs and S. H. Ralston, "Presentation and management of osteoporosis presenting in association with pregnancy or lactation," *Osteoporos Int.*, vol. Sep;26(9), pp. 2223-41, 2015.
- [39] M. L. Brandi, G. Guglielmi, S. Masala, S. Minisola, F. Oleari, S. Ortolani, F. Palumbo, P. Pisanti, G. Simonetti, U. Tarantino and R. Ugenti, "Appropriatezza diagnostica e terapeutica nella prevenzione delle fratture da fragilità da osteoporosi," Quaderni del Ministero della Salute, Roma, 2010.
- [40] L. Hightower, "Osteoporosis: pediatric disease with geriatric consequences," *Orthop Nurs*, vol. 19, pp. 59-62, 2000.
- [41] World Health Organization, "FACT SHEET N°394 - Healthy diet," Ginevra, 2015.
- [42] Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, "Exercise in pregnancy. RCOG Statement N°4," 2006.
- [43] N. K. Hyde, S. L. Brennan-Olsen, K. Bennett, D. J. Moloney and J. A. Pasco, "Maternal nutrition during pregnancy: intake of nutrients important for bone health," *Matern Child Health J.*, vol. Apr;21(4), pp. 845-851, 2017.
- [44] C. Cooper, B. Dawson-Hughes, C. M. Gordon and R. Rizzoli, "Healthy nutrition, healthy bones: how nutritional factors affect musculoskeletal health throughout life," International Osteoporosis Foundation, Nyon, 2015.
- [45] L. D. Moreira, M. L. Oliveira, A. P. Lirani-Galvão, R. V. Marin-Mio, R. N. Santos and M. Lazaretti-Castro, "Physical exercise and osteoporosis: effects of different types of exercises on bone and physical function of postmenopausal women," *Arq Bras Endocrinol Metabol*, vol. Jul;58(5), pp. 514-22, 2014.
- [46] M. Nilsson, D. Sundh, D. Mellström and M. Lorentzon, "Current Physical Activity Is Independently Associated With Cortical Bone Size and Bone Strength in Elderly Swedish Women," *J Bone Miner Res.*, vol. Mar;32(3), pp. 473-485, 2017.
- [47] K. T. Borer, "Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women : interaction of mechanical, hormonal and dietary factors," *Sports Med*, vol. 35(9), pp. 779-830, 2005.
- [48] S. I. Braun, Y. Kim, A. E. Jetton, M. Kang and D. W. Morgan, "Sedentary Behavior, Physical Activity, and Bone Health in Postmenopausal Women," *J Aging Phys Act.*, vol. Apr;25(2), pp. 173-181, 2017.
- [49] A. Karpouzou, E. Diamantis, P. Farmaki, S. Savvanis and T. Troupis, "Nutritional Aspects of Bone Health and Fracture Healing," *J Osteoporos.*, vol. 2017, 2017.
- [50] H. Vatanparast, D. A. Bailey, A. D. Baxter-Jones and S. J. Whiting, "The effects of dietary protein on bone mineral mass in young adults may be modulated by adolescent calcium intake," *J Nutr*, vol. 137, p. 2674-2679, 2007.
- [51] J. P. Bonjour, "Protein intake and bone health," *Int J Vitam Nutr Res.*, Vols. Mar;81(2-3), pp. 134-42, 2011.

- [52] Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU), LARN - Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed energia per la popolazione italiana; IV Revisione, Milano: SICS, 2014.
- [53] I. Kanazawa, "Interaction between bone and glucose metabolism [Review]," *Endocr J.*, vol. Nov 29;64(11), pp. 1043-1053, 2017.
- [54] V. Centeno, G. D. de Barboza, A. Marchionatti, V. Rodriguez and N. Tolosa de Talamoni, "Molecular mechanisms triggered by low-calcium diets," *Nutr Res Rev.*, vol. 22, pp. 163-174, 2009.
- [55] EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products nutrition and allergies), "Scientific opinion on dietary reference values for calcium," *EFSA J.*, vol. 13(5), p. 4101, 2015.
- [56] N. K. Hyde, S. L. Brennan-Olsen, J. D. Wark, S. M. Hosking and J. A. Pasco, "Maternal dietary nutrient intake during pregnancy and offspring linear growth and bone: the vitamin D in Pregnancy Cohort Study," *Calcif Tissue Int.*, vol. Jan;100(1), pp. 47-54, 2017.
- [57] L. C. Poon, A. Shennan, J. A. Hyett, A. Kapur, E. Hadar, H. Divakar, F. McAuliffe, F. da Silva Costa, P. von Dadelszen, H. D. McIntyre, A. B. Kihara, G. C. Di Renzo, R. Romero, M. D'Alton, V. Berghella, K. H. Nicolaidis and M. Hod, "The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention.," *Int J Gynaecol Obstet.*, vol. May;145 Suppl 1, pp. 1-33, 2019.
- [58] B. Pampaloni, E. Bartolini and M. L. Brandi, "Parmigiano Reggiano cheese and bone health," *Clin Cases Miner Bone Metab.*, vol. Sep;8(3), pp. 33-6, 2011.
- [59] S. Quattrini, B. Pampaloni and M. L. Brandi, "Natural mineral waters: chemical characteristics and health effects," *Clin Cases Miner Bone Metab.*, Vols. Sep-Dec;13(3), pp. 173-180, 2016.
- [60] T. Greupner, I. Schneider and A. Hahn, "Calcium Bioavailability from Mineral Waters with Different Mineralization in Comparison to Milk and a Supplement," *J Am Coll Nutr.*, vol. Jul;36(5), pp. 386-390, 2017.
- [61] L. Vannucci, C. Fossi, S. Quattrini, L. Guasti, B. Pampaloni, G. Gronchi, F. Giusti, C. Romagnoli, L. Cianferotti, G. Marcucci and M. L. Brandi, "Calcium Intake in Bone Health: A Focus on Calcium-Rich Mineral Waters," *Nutrients*, vol. Dec 5;10(12), 2018.
- [62] E. M. Balk, G. P. Adam, V. N. Langberg, A. Earley, P. Clark, P. R. Ebeling, A. Mithal, R. Rizzoli, C. F. Zerbin, D. D. Pierroz and B. Dawson-Hughes, "Global dietary calcium intake among adults: a systematic review," *Osteoporos Int*, vol. 28, p. 3315–3324, 2017.
- [63] S. Sette, C. Le Donne, R. Piccinelli, D. Arcella, A. Turrini and C. Leclercq, "The third Italian National Food Consumption Survey, INRAN-SCAI 2005-06--part 1: nutrient intakes in Italy," *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, vol. Dec;21(12), pp. 922-32, 2011.
- [64] M. Montomoli, S. Gonnelli, M. Giacchi, R. Mattei, C. Cuda and S. Rossi, "Validation of a food frequency questionnaire for nutritional calcium intake assessment in Italian women," *Eur J Clin Nutr*, vol. 56, p. 21–30, 2002.
- [65] X. Du, K. Zhu, A. Trube, Q. Zhang, G. Ma, X. Hu, D. R. Fraser and H. Greenfield, "School-milk intervention trial enhances growth and bone mineral accretion in Chinese girls aged 10–12 years in Beijing," *Br J Nutr*, vol. 92, p. 159–168, 2004.
- [66] H. T. Viljakainen, A. M. Natri, M. Karkkainen, M. Huttunen, A. Palassa, J. Jakobsen, K. D. Cashman, C. Molgaard and C. Lamberg-Allardt, "A positive dose–response effect of vitamin D supplementation on site-specific bone mineral augmentation in adolescent girls: a double-blinded randomized placebo-controlled 1-year intervention," *J Bone Miner Res*, vol. 21, p. 836–844, 2006.

- [67] M. Herrmann, C. L. Farrell, I. Pusceddu, N. Fabregat-Cabello and E. Cavalier, "Assessment of vitamin D status - a changing landscape," *Clin Chem Lab Med.*, vol. Jan 1;55(1), pp. 3-26, 2017.
- [68] L. Cianferotti and C. Marcocci, "Subclinical vitamin D deficiency," *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, vol. Aug;26(4), pp. 523-37, 2012.
- [69] L. Cianferotti, C. Cricelli, J. A. Kanis, R. Nuti, J. Y. Reginster, J. D. Ringe, R. Rizzoli and M. L. Brandi, "The clinical use of vitamin D metabolites and their potential developments: a position statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the International Osteoporosis Foundation (IOF)," *Endocrine.*, vol. Sep;50(1), pp. 12-26, 2015.
- [70] EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies), "Scientific opinion on dietary reference values for Vitamin D," *EFSA J.*, vol. 14(10), p. 4547, 2016.
- [71] C. Cooper, N. C. Harvey, N. J. Bishop, S. Kennedy, A. T. Papageorghiou, I. Schoenmakers, R. Fraser, S. V. Gandhi, A. Carr, S. D'Angelo, S. R. Crozier, R. J. Moon, N. K. Arden, E. M. Dennison, K. M. Godfrey, H. M. Inskip, A. Prentice, M. Z. Mughal, R. Eastell, D. M. Reid, M. K. Javaid and M. S. Group, "Maternal gestational vitamin D supplementation and offspring bone health (MAVIDOS): a multicentre, double-blind, randomised placebo-controlled trial," *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. May;4(5), pp. 393-402, 2016.
- [72] M. T. Kitson and S. K. Roberts, "D-livering the message: The importance of vitamin D status in chronic liver disease," *J Hepatol.*, vol. Oct;57(4), pp. 897-909, 2012.
- [73] D. A. Wahl, C. Cooper, P. R. Ebeling, M. Eggersdorfer, J. Hilger, K. Hoffmann, R. Josse, J. A. Kanis, A. Mithal, D. D. Pierroz, J. Stenmark, E. Stöcklin and B. Dawson-Hughes, "A global representation of vitamin D status in healthy populations," *Arch Osteoporos.*, vol. 7, pp. 155-72, 2012.
- [74] C. J. Vorland, E. R. Stremke, R. N. Moorthi and K. M. Hill Gallan, "Effects of Excessive Dietary Phosphorus Intake on Bone Health," *Curr Osteoporos Rep.*, vol. Oct;15(5), pp. 473-482, 2017.
- [75] S. Davinelli, A. Trichopoulou, G. Corbi, I. De Vivo and G. Scapagnini, "The potential nutrigenoprotective role of Mediterranean diet and its functional components on telomere length dynamics," *Ageing Res Rev.*, vol. Jan;49, pp. 1-10, 2019.
- [76] A. Rivas, A. Romero, M. Mariscal-Arcas, C. Monteagudo, B. Feriche, M. L. Lorenzo and F. Olea, "Mediterranean diet and bone mineral density in two age groups of women," *Int J Food Sci Nutr.*, vol. Mar;64(2), pp. 155-61, 2013.
- [77] M. Dinu, G. Pagliai, A. Casini and F. Sofi, "Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials," *Eur J Clin Nutr.*, vol. Jan;72(1), pp. 30-4, 2018.
- [78] S. Soltani, A. Jayedi, S. Shab-Bidar, N. Becerra-Tomás and J. Salas-Salvadó, "Adherence to the Mediterranean Diet in Relation to All-Cause Mortality: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies," *Adv Nutr.*, vol. May 21, pp. 1-11, 2019.
- [79] D. Eleftheriou, V. Benetou, A. Trichopoulou, C. La Vecchia and C. Bamia, "Mediterranean diet and its components in relation to all-cause mortality: meta-analysis," *Br J Nutr.*, vol. Nov;120(10), pp. 1081-1097, 2018.
- [80] L. Schwingshackl, C. Schwedhelm, C. Galbete and G. Hoffmann, "Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis," *Nutrients.*, vol. Sep 26;9(10), 2017.
- [81] R. Estruch, E. Ros, J. Salas-Salvadó, M. I. Covas, D. Corella, F. Arós, E. Gómez-

- Gracia, V. Ruiz-Gutiérrez, M. Fiol, J. Lapetra, R. M. Lamuela-Raventos, L. Serra-Majem, X. Pintó, J. Basora, M. A. Muñoz, J. V. Sorlí, J. A. Martínez, M. Fitó, A. Gea, M. A. Hernán, M. A. Martínez-González and PREDIMED Study Investigators, "Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts," *N Engl J Med.*, vol. Jun 21;378(25), p. e34, 2018.
- [82] A. Zampelas and E. Magriplis, "Dietary patterns and risk of cardiovascular diseases: a review of the evidence," *Proc Nutr Soc.*, vol. Jun 28, pp. 1-8, 2019.
- [83] R. Casas, R. Estruch and E. Sacanella, "The Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil on Immune-mediated Inflammatory Responses," *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.*, vol. 18(1), pp. 23-35, 2018.
- [84] Y. Gepner, I. Shelef, O. Komy, N. Cohen, D. Schwarzfuchs, N. Bril, M. Rein, D. Serfaty, S. Kenigsbuch, H. Zelicha, A. Yaskolka Meir, L. Tene, A. Bilitzky, G. Tsaban, Y. Chassidim, B. Sarusy, U. Ceglarek, J. Thiery, M. Stumvoll, M. Blüher, M. J. Stampfer, A. Rudich and I. Shai, "The beneficial effects of Mediterranean diet over low-fat diet may be mediated by decreasing hepatic fat content," *J Hepatol.*, vol. Aug;71(2), pp. 379-388, 2019.
- [85] C. T. McEvoy, T. Hoang, S. Sidney, L. M. Steffen, D. J. Jacobs, J. M. Shikany, J. T. Wilkins and K. Yaffe, "Dietary patterns during adulthood and cognitive performance in midlife: The CARDIA study," *Neurology.*, vol. Apr 2;92(14), pp. e1589-e1599, 2019.
- [86] S. L. Gardener and S. R. Rainey-Smith, "The Role of Nutrition in Cognitive Function and Brain Ageing in the Elderly," *Curr Nutr Rep.*, vol. Sep;7(3), pp. 139-149, 2018.
- [87] J. Mattei, S. J. Bigornia, M. Sotos-Prieto, T. Scott, X. Gao and K. L. Tucker, "The Mediterranean Diet and 2-Year Change in Cognitive Function by Status of Type 2 Diabetes and Glycemic Control," *Diabetes Care.*, vol. Aug;42(8), pp. 1372-1379, 2019.
- [88] F. Sofi, M. Dinu, G. Pagliai and R. Marcucci, "Validation of a literature-based adherence score to Mediterranean diet: the MEDI-LITE score," *Int J Food Sci Nutr.*, vol. Sep;68(6), pp. 757-762, 2017.
- [89] M. A. Martínez-González, A. García-Arellano, E. Toledo, J. Salas-Salvadó, P. Buil-Cosiales, D. Corella, M. I. Covas, H. Schröder, F. Arós, E. Gómez-Gracia, M. Fiol, V. Ruiz-Gutiérrez, J. Lapetra, R. M. Lamuela-Raventos, L. Serra-Majem, X. Pintó, M. A. Muñoz, J. Wärnberg, E. Ros, R. Estruch and PREDIMED Study Investigators, "A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial," *PLoS One.*, vol. 7(8), p. e43134, 2012.
- [90] D. Ciprián, E. M. Navarrete-Muñoz, M. Garcia de la Hera, D. Giménez-Monzo, S. González-Palacios, J. Quiles and J. Vioque, "Mediterranean and Western dietary patterns in adult population of a Mediterranean area; a cluster analysis," *Nutr Hosp.*, Vols. Sep-Oct;28(5), pp. 1741-9, 2013.
- [91] M. N. Händel, B. L. Heitmann and B. Abrahamsen, "Nutrient and food intakes in early life and risk of childhood fractures: a systematic review and meta-analysis," *Am J Clin Nutr.*, vol. Nov;102(5), pp. 1182-95, 2015.
- [92] V. Benetou, P. Orfanos, U. Pettersson-Kymmer, U. Bergström, O. Svensson, I. Johansson, F. Berrino, R. Tumino, K. B. Borch, E. Lund, P. H. Peeters, V. Grote, K. Li, J. M. Altzibar, T. Key, H. Boeing, A. von Ruesten, T. Norat, P. A. Wark, E. Riboli and A. Trichopoulou, "Mediterranean diet and incidence of hip fractures in a European cohort," *Osteoporos Int.*, vol. May;24(5), pp. 1587-98, 2013.
- [93] V. Benetou, P. Orfanos, D. Feskanich, K. Michaëlsson, U. Pettersson-Kymmer, S. Eriksson, F. Grodstein, A. Wolk, A. Bellavia, L. A. Ahmed, P. Boffeta and A.

- Trichopoulou, "Fruit and Vegetable Intake and Hip Fracture Incidence in Older Men and Women: The CHANCES Project," *J Bone Miner Res.*, vol. Sep;31(9), pp. 1743-52, 2016.
- [94] C. Bamia, P. Orfanos, P. Ferrari and et al., "Dietary patterns among older Europeans: the EPIC-Elderly study," *Br J Nutr.*, vol. Jul;94(1), pp. 100-13, 200
- [95] B. Haring, C. J. Crandall, C. Wu, E. S. LeBlanc, J. M. Shikany, L. Carbone, T. Orchard, F. Thomas, J. Wactawaski-Wende, W. Li, J. A. Cauley and S. Wassertheil-Smoller, "Dietary Patterns and Fractures in Postmenopausal Women: Results From the Women's Health Initiative," *JAMA Intern Med.*, vol. May 1;176(5), pp. 645-52, 2016.
- [96] L. Byberg, A. Bellavia, N. Orsini, A. Wolk and K. Michaëlsson, "Fruit and vegetable intake and risk of hip fracture: a cohort study of Swedish men and women," *J Bone Miner Res.*, vol. Jun;30(6), pp. 976-84, 2015.
- [97] L. Byberg, A. Bellavia, S. C. Larsson, N. Orsini, A. Wolk and K. Michaëlsson , "Mediterranean Diet and Hip Fracture in Swedish Men and Women," *J Bone Miner Res.*, vol. Dec;31(12), pp. 2098-2105, 2016.
- [98] H. Malmir, P. Saneei, B. Larijani and A. Esmailzadeh, "Adherence to Mediterranean diet in relation to bone mineral density and risk of fracture: a systematic review and meta-analysis of observational studies," *Eur J Nutr.*, vol. Sep;57(6), pp. 2147-2160, 2018.
- [99] E. Z. Movassagh and H. Vatanparast, "Current Evidence on the Association of Dietary Patterns and Bone Health: A Scoping Review," *Adv Nutr.*, vol. Jan 17;8(1), pp. 1-16, 2017.
- [100] S. K. Kunutsor, J. A. Laukkanen, M. R. Whitehouse and A. W. Blom, "Adherence to a Mediterranean-style diet and incident fractures: pooled analysis of observational evidence," *Eur J Nutr.*, vol. Jun;57(4), pp. 1687-1700, 2018.
- [101] V. Benetou, P. Orfanos, D. Feskanich, K. Michaëlsson, U. Pettersson-Kymmer, L. Byberg, S. Eriksson, F. Grodstein, A. Wolk, N. Jankovic, L. de Groot, P. Boffetta and A. Trichopoulou, "Mediterranean diet and hip fracture incidence among older adults: the CHANCES project," *Osteoporos Int.*, vol. Jul;29(7), pp. 1591-1599, 2018 .
- [102] J. V. Craig, D. K. Bunn, R. P. Hayhoe, W. O. Appleyard, E. A. Lenaghan and A. A. Welch, "Relationship between the Mediterranean dietary pattern and musculoskeletal health in children, adolescents, and adults: systematic review and evidence map," *Nutr Rev.*, vol. Oct 1;75(10), pp. 830-857, 2017.
- [103] E. Choi and Y. Park, "The Association between the Consumption of Fish/Shellfish and the Risk of Osteoporosis in Men and Postmenopausal Women Aged 50 Years or Older," *Nutrients.*, vol. Feb 25;8(3), p. 113, 2016.
- [104] K. M. Mangano, S. Sahni, D. P. Kiel, K. L. Tucker, A. B. Dufour and M. T. Hannan, "Bone Mineral Density and Protein-Derived Food Clusters from the Framingham Offspring Study," *J Acad Nutr Diet.*, vol. Oct;115(10), pp. 1605-1613, 2015.
- [105] R. P. Hayhoe, M. A. Lentjes , R. N. Luben, K. T. Khaw and A. A. Welch, "Dietary magnesium and potassium intakes and circulating magnesium are associated with heel bone ultrasound attenuation and osteoporotic fracture risk in the EPIC-Norfolk cohort study," *Am J Clin Nutr.*, vol. Aug;102(2), pp. 376-84, 2015.
- [106] N. A. De França, M. B. Camargo, M. Lazaretti-Castro and L. A. Martini, "Antioxidant intake and bone status in a cross-sectional study of Brazilian women with osteoporosis," *Nutr Health.*, vol. Apr;22(2), pp. 133-42, 2013.
- [107] O. García-Martínez, A. Rivas, J. Ramos-Torrecillas, E. De Luna-Bertos and C. Ruiz, "The effect of olive oil on osteoporosis prevention," *Int J Food Sci Nutr.*, vol. Nov;65(7), pp. 834-40, 2014.

- [108] J. M. Fernández-Real , M. Bulló, J. M. Moreno-Navarrete , E. Ros , R. Estruch and J. Salas-Salvadó , "A Mediterranean diet enriched with olive oil is associated with higher serum total osteocalcin levels in elderly men at high cardiovascular risk," *J Clin Endocrinol Metab.*, vol. Oct;97(10), pp. 3792-8, 2012.
- [109] M. C. Savanelli, L. Barrea, P. E. Macchia, S. Savastano, A. Falco, A. Renzullo, E. Scarano, I. C. Nettore, A. Colao and C. Di Somma, "Preliminary results demonstrating the impact of Mediterranean diet on bone health," *J Transl Med.*, vol. Apr 24;15(1), p. 81, 2017.
- [110] N. K. Hyde, S. L. Brennan-Olsen, J. D. Wark, S. M. Hosking and J. A. Pasco, "Maternal Dietary Nutrient Intake During Pregnancy and Offspring Linear Growth and Bone: The Vitamin D in Pregnancy Cohort Study," *Calcif Tissue Int.*, vol. Jan;100(1), pp. 47-54, 2017.
- [111] J. Yin, T. Dwyer, M. Riley, J. Cochrane and G. Jones, "The association between maternal diet during pregnancy and bone mass of the children at age 16," *Eur J Clin Nutr.*, vol. Feb;64(2), pp. 131-7, 2010.
- [112] G. Jones, M. D. Riley and T. Dwyer, "Maternal diet during pregnancy is associated with bone mineral density in children: a longitudinal study," *Eur J Clin Nutr.*, vol. Oct;54(10), pp. 749-56, 2000.
- [113] D. H. Heppel, C. Medina-Gomez, A. Hofman, O. H. Franco, F. Rivadeneira and V. W. Jaddoe, "Maternal first-trimester diet and childhood bone mass: the Generation R Study," *Am J Clin Nutr.*, vol. Jul;98(1), pp. 224-32, 2013.
- [114] A. Bach-Faig, E. M. Berry, D. Lairon, J. Reguant, A. Trichopoulou, S. Dernini, F. X. Medina, M. Battino, R. Belahsen, G. Miranda, L. Serra-Majem and Mediterranean Diet Foundation Expert Group., "Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates," *Public Health Nutr.*, vol. Dec;14(12A), pp. 2274-84, 2011 .
- [115] B. H Al Wattar, J. Dodds, A. Placzek, et al. and ESTEEM study group, "Mediterranean-style diet in pregnant women with metabolic risk factors (ESTEEM): A pragmatic multicentre randomised trial," *PLoS Med.*, vol. Jul 23;16(7), p. e1002857, 2019.
- [116] C. Assaf-Balut, N. García de la Torre, A. Durán and et al., "A Mediterranean diet with additional extra virgin olive oil and pistachios reduces the incidence of gestational diabetes mellitus (GDM): A randomized controlled trial: The St. Carlos GDM prevention study," *PLoS One.*, vol. Oct 19;12(10), p. e0185873, 2017 .
- [117] C. Assaf-Balut, N. Garcia de la Torre, A. Durán and et al., "Medical nutrition therapy for gestational diabetes mellitus based on Mediterranean Diet principles: a subanalysis of the St Carlos GDM Prevention Study," *BMJ Open Diabetes Res Care.*, vol. Oct 11;6(1), p. e000550, 2018 .
- [118] V. Izadi, H. Tehrani, F. Haghghatdoost, A. Dehghan, P. J. Surkan and L. Azadbakht, "Adherence to the DASH and Mediterranean diets is associated with decreased risk for gestational diabetes mellitus," *Nutrition.*, vol. Oct;32(10), pp. 1092-6, 2016.
- [119] C. Osorio-Yáñez, C. Qiu, B. Gelaye, D. A. Enquobahrie and M. A. Williams, "Risk of gestational diabetes mellitus in relation to maternal dietary calcium intake," *Public Health Nutr.*, vol. Apr;20(6), pp. 1082-1089, 2017.
- [120] D. A. Schoenaker, S. S. Soedamah-Muthu and G. D. Mishra, "Quantifying the mediating effect of body mass index on the relation between a Mediterranean diet and development of maternal pregnancy complications: the Australian Longitudinal Study on Women's Health," *Am J Clin Nutr.*, vol. Sep;104(3), pp. 638-45, 2016.
- [121] S. W. Groth, P. A. Stewart, D. J. Ossip, R. C. Block, N. Wixom and I. D. Fernandez, "Micronutrient Intake Is Inadequate for a Sample of Pregnant African-

- American Women," *J Acad Nutr Diet.*, vol. Apr;117(4), pp. 589-598, 2017.
- [122] S. B. Petersen, M. A. Rasmussen, S. F. Olsen, P. Vestergaard, C. Mølgaard, T. I. Halldorsson and M. Strøm, "Maternal dietary patterns during pregnancy in relation to offspring forearm fractures: prospective study from the Danish National Birth Cohort," *Nutrients.*, vol. Apr 2;7(4), pp. 2382-400, 2015.
- [123] E. Gesteiro, S. Bastida, B. Rodríguez Bernal and F. J. Sánchez-Muniz, "Adherence to Mediterranean diet during pregnancy and serum lipid, lipoprotein and homocysteine concentrations at birth," *Eur J Nutr.*, vol. Oct;54(7), pp. 1191-9, 2015.
- [124] J. Vioque, E. M. Navarrete-Muñoz, D. Gimenez-Monzó, M. García-de-la-Hera, F. Granado, I. S. Young, R. Ramón, F. Ballester, M. Murcia, M. Rebagliato, C. Iñiguez and INMA-Valencia Cohort Study, "Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire among pregnant women in a Mediterranean area," *Nutr J.*, vol. Feb 19, p. 12:26, 2013.
- [125] Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria (CREA), "Tabelle di composizione degli alimenti," [Online]. Available: http://nut.entecra.it/646/tabelle_di_composizione_degli_alimenti.html.
- [126] Istituto Oncologico Europeo (IEO), "Banca Dati di composizione degli Alimenti per studi epidemiologici in Italia," [Online]. Available: <http://www.bda-ieo.it/wordpress/en/>.
- [127] School of Hygiene & Tropical Medicine, "General Practice Physical Activity Questionnaire (GPPAQ)," Department of Health and Social Care, UK, 23 Aprile 2013. [Online]. Available: [ww.gov.uk/government/publications/general-practice-physical-activity-questionnaire-gppaq](http://www.gov.uk/government/publications/general-practice-physical-activity-questionnaire-gppaq).
- [128] H. Park, P. M. Brannon, A. A. West, J. Yan, X. Jiang, C. A. Perry, O. Malysheva, S. Mehta and M. A. Caudill, "Maternal vitamin D biomarkers are associated with maternal and fetal bone turnover among pregnant women consuming controlled amounts of vitamin D, calcium, and phosphorus," *Bone.*, vol. Feb;95, pp. 183-191, 2017.
- [129] M. D. Kontogianni, L. Melistas, M. Yannakoulia, I. Malagaris, D. B. Panagiotakos and N. Yiannakouris, "Association between dietary patterns and indices of bone mass in a sample of Mediterranean women," *Nutrition.*, vol. Feb;25(2), pp. 165-71, 2009.
- [130] T. Valladares, R. Simões, W. Bernardo, A. B. Schmitt, M. A. Cardoso and J. M. Aldrighi, "Prevalence of hypovitaminosis D in postmenopausal women: a systematic review," *Rev Assoc Med Bras (1992).*, vol. Jun 3;65(5), pp. 691-698, 2019.
- [131] J. Bajerska, A. Chmurzynska, A. Muzsik, P. Krzyżanowska, E. Mądry, A. M. Malinowska and J. Walkowiak, "Weight loss and metabolic health effects from energy-restricted Mediterranean and Central-European diets in postmenopausal women: A randomized controlled trial," *Sci Rep.*, vol. Jul 24;8(1), p. 11170, 2018.
- [132] R. A. Dhonukshe-Rutten, J. Bouwman, K. A. Brown, A. E. Cavelaars, R. Collings, E. Grammatikaki, L. C. de Groot, M. Gurinovi, L. J. Harvey, M. Hermoso, R. Hurst, B. Kremer, J. Ngo, R. Novakovic, M. M. Raats, F. Rollin, L. Serra-Majem, O. W. Souverein, L. Timotijevic and P. Van't Veer, "EURRECA-Evidence-based methodology for deriving micronutrient recommendations," *Crit Rev Food Sci Nutr.*, vol. 53(10), pp. 999-1040, 2013.
- [133] L. Serra-Majem, L. Ribas, A. García, C. Pérez-Rodrigo and J. Aranceta, "Nutrient adequacy and Mediterranean Diet in Spanish school children and adolescents," *Eur J Clin Nutr.*, vol. Sep;57, pp. Suppl 1:S35-9, 2003.
- [134] N. Rubio-López, A. Llopis-González, Y. Picó and M. Morales-Suárez-Varela, "Dietary Calcium Intake and Adherence to the Mediterranean Diet in Spanish

- Children: The ANIVA Study," *Int J Environ Res Public Health.*, vol. Jun 14;14(6), 2017.
- [135] I. Seiquer, M. Mesías, A. M. Hoyos, G. Galdó and M. P. Navarro, "A Mediterranean dietary style improves calcium utilization in healthy male adolescents," *J Am Coll Nutr.*, vol. Aug;27(4), pp. 454-62, 2008.
- [136] I. Castro-Quezada, B. Román-Viñas and L. Serra-Majem, "The Mediterranean diet and nutritional adequacy: a review," *Nutrients.*, vol. Jan 3;6(1), pp. 231-48, 2014.
- [137] B. L. Ilesanmi-Oyelere, N. C. Roy, J. Coad and M. C. Kruger, "Associations between Self-Reported Physical Activity, Heel Ultrasound Parameters and Bone Health Measures in Post-Menopausal Women," *Int J Environ Res Public Health.*, vol. Aug 31;16(17), 2019.
- [138] M. R. Fernandes and W. J. Barreto, "Association between physical activity and vitamin D: A narrative literature review," *Rev Assoc Med Bras (1992).*, vol. Jun;63(6), pp. 550-556, 2017.
- [139] E. S. Al-Eisa, A. H. Alghadir and S. A. Gabr, "Correlation between vitamin D levels and muscle fatigue risk factors based on physical activity in healthy older adults," *Clin Interv Aging.*, vol. May 4;11, pp. 513-22, 2016.
- [140] J. Bauer, J. E. Morley, A. W. Schols, L. Ferrucci, A. J. Cruz-Jentoft, E. Dent, V. E. Baracos, J. A. Crawford, W. Doehner, S. B. Heymsfield, A. Jatoi, K. Kalantar-Zadeh, M. Lainscak, F. Landi, A. Laviano, M. Mancuso, M. Muscaritoli, C. M. Prado, F. Strasser, S. von Haehling, A. S. Coats and S. D. Anker, "Sarcopenia: A Time for Action. An SCWD Position Paper," *J Cachexia Sarcopenia Muscle.*, vol. Sep 15, 2019.
- [141] L. Denny, S. Coles and R. Blitz, "Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Spectrum Disorders," *Am Fam Physician.*, vol. Oct 15;96(8), pp. 515-522, 2017.
- [142] L. F. Wilhoit, D. A. Scott and B. A. Simecka, "Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Characteristics, Complications, and Treatment," *Community Ment Health J.*, vol. Aug;53(6), pp. 711-718, 2017.
- [143] M. B. Haastrup, A. Pottegård and P. Damkier, "Alcohol and breastfeeding," *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, vol. Feb;114(2), pp. 168-7, 2014.
- [144] Gruppo di lavoro del Centro Alcologico Regionale Toscano, "Alcol e gravidanza - Il ruolo chiave degli operatori sanitari," AOUC Firenze, Firenze, 2011.
- [145] World Health Organization, "Global Recommendations on Physical Activity for Health," WHO Press, Switzerland, 2010.
- [146] K. R. Evenson, R. Barakat, W. J. Brown, P. Dargent-Molina, M. Haruna, E. M. Mikkelsen, M. F. Mottola, K. M. Owe, E. K. Rousham and S. Yeo, "Guidelines for Physical Activity during Pregnancy: Comparisons From Around the World," *Am J Lifestyle Med.*, vol. Mar;8(2), pp. 102-121, 2014.
- [147] Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, "Physical activity for pregnant women," 2017. [Online]. Available: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/622336/CMO_physical_activity__pregnant_women_infographic.jpg.
- [148] L. M. De-Regil, C. Palacios, L. K. Lombardo and J. F. Peña-Rosas, "Vitamin D supplementation for women during pregnancy," *Cochrane Database Syst Rev.*, vol. Jan 14;(1):CD008873, 2016.
- [149] C. Palacios, L. M. De-Regil, L. K. Lombardo and J. P. Peña-Rosa, "Vitamin D supplementation during pregnancy: Updated meta-analysis on maternal outcomes," *J Steroid Biochem Mol Biol.*, vol. Nov;164, pp. 148-155, 2016.
- [150] C. Palacios, M. A. Trak-Fellermeier, R. X. Martinez, L. Lopez-Perez, P. Lips, J. A. Salisi, J. C. John and J. P. Peña-Rosas, "Regimens of vitamin D supplementation for women during pregnancy," *Cochrane Database Syst Rev.*, vol. Oct

3;10:CD013446, 2019.

- [151] World Health Organization, "Breastfeeding," 2019. [Online]. Available: <https://www.who.int/topics/breastfeeding/en/>.
- [152] R. F. Goldstein, S. K. Abell, S. Ranasinha, M. Misso, J. A. Boyle, M. H. Black, N. Li, G. Hu, F. Corrado, L. Rode, Y. J. Kim, M. Haugen, W. O. Song, M. H. Kim, A. Bogaerts, R. Devlieger, J. H. Chung and H. J. Teede, "Association of Gestational Weight Gain With Maternal and Infant Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis," *JAMA.*, vol. Jun 6;317(21), pp. 2207-2225, 2017.
- [153] L. Xiao, G. Ding, A. Vinturache, J. Xu, Y. Ding, J. Guo, L. Huang, X. Yin, J. Qiao, I. Thureraja and X. Ben, "Associations of maternal pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain with birth outcomes in Shanghai, China," *Sci Rep.*, vol. Jan 25;7:41073, 2017.
- [154] S. Y. Yim, T. Guthrie and S. J. de Jersey, "Impact of service-wide initiatives to support healthy pregnancy weight gain on weight-related documentation," *Aust N Z J Obstet Gynaecol.*, vol. Oct 2, 2019.
- [155] Institute of Medicine (IOM), "Weight gain during pregnancy: reexamining the guidelines," National Academy Press, Washington, 2009.
- [156] C. Bianchi, G. de Gennaro, M. Romano, L. Battini, M. Aragona, M. Corfini, S. Del Prato and A. Bertolotto, "Italian national guidelines for the screening of gestational diabetes: Time for a critical appraisal?," *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, vol. Aug;27(8), pp. 717-722, 2017 .
- [157] R. Zhang, Z. Wang, Y. Fei, B. Zhou, S. Zheng, L. Wang, L. Huang, S. Jiang, Z. Liu, J. Jiang and Y. Yu, "The Difference in Nutrient Intakes between Chinese and Mediterranean, Japanese and American Diets," *Nutrients.*, vol. Jun 9;7(6), pp. 4661-88, 2015.
- [158] J. F. Calderon-Garcia, J. M. Moran, R. Roncero-Martin, P. Rey-Sanchez, F. J. Rodriguez-Velasco and J. D. Pedrera-Zamorano, "Dietary habits, nutrients and bone mass in Spanish premenopausal women: the contribution of fish to better bone health," *Nutrients.*, vol. Dec 27;5(1), pp. 10-22, 2012.
- [159] A. Rivas, A. Romero, M. Mariscal-Arcas, C. Monteagudo, B. Feriche, M. L. Lorenzo and F. Olea, "Mediterranean diet and bone mineral density in two age groups of women," *Int J Food Sci Nutr.*, vol. Mar;64(2), pp. 155-61, 2013.

9. APPENDICI

Si allegano a tale elaborato i seguenti documenti in formato PDF:

- Il Protocollo di studio dal titolo “Valutazione dell’aderenza alla Dieta Mediterranea e dell’introito alimentare di calcio in relazione alla salute dell’osso in una popolazione di donne afferenti alla SOD Malattie del Metabolismo Minerale e Osseo”, versione 03 del 19 Luglio 2017, approvato dal CE con numero 11097_oss.
- Gli Annex n°1 (“Questionario di valutazione dello Score di aderenza alla Dieta Mediterranea”), n°2 (“FFQ per stimare l’introito alimentare di calcio”), n°4 (“General practice physical activity questionnaire, GPPAQ) e n°5 (“Brochure informativa ‘MANGIA SANO E CON STILE...MEDITERRANEO!’), relativi al protocollo qui sopra citato.
- Il Protocollo di studio dal titolo “Valutazione dell’aderenza alla dieta mediterranea, dell’introito alimentare di calcio e delle abitudini nutrizionali in 300 donne in gravidanza fisiologica ed a 6 e/o 12 mesi dal parto”, versione 02 del 09 Ottobre 2017, approvato dal CE con numero 11538_OSS.
- Gli Annex n°1 (“Questionario di valutazione dello Score di aderenza alla Dieta Mediterranea”), n°2 (“FFQ per stimare l’introito alimentare di calcio”) e n°4 (“Brochure informativa ‘PER IL TUO BAMBINO E PER LE TUE OSSA: MANGIA SANO E...MEDITERRANEO!’), relativi al protocollo qui sopra citato.
- Diagramma di Gantt, relativo ai tempi di esecuzione del progetto di Dottorato.