

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI

*MEDICINA*

SCUOLA DI DOTTORATO DI

*SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE*

DOTTORATO DI RICERCA IN

*SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI*

CICLO XXIX/2014

STUDIO DEL COINVOLGIMENTO OSSEO E  
DELLA MEDIAZIONE DEL DOLORE IN CORSO DI  
COMPLEX REGIONAL PAIN SYNDROME TYPE I

S.S.D. Area 06 - Scienze mediche, MED/16 REUMATOLOGIA

Coordinatore: Prof. Giovanni Targher

Tutor: Prof. Maurizio Rossini

Dottoranda: Dott.ssa Maria Manara

Quest'opera è stata rilasciata con licenza Creative Commons Attribuzione – non commerciale

Non opere derivate 3.0 Italia . Per leggere una copia della licenza visita il sito web:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/it/>



**Attribuzione** Devi riconoscere una menzione di paternità adeguata, fornire un link alla licenza e indicare se sono state effettuate delle modifiche. Puoi fare ciò in qualsiasi maniera ragionevole possibile, ma non con modalità tali da suggerire che il licenziante avalli te o il tuo utilizzo del materiale.



**NonCommerciale** Non puoi usare il materiale per scopi commerciali.



**Non opere derivate** —Se remixi, trasformi il materiale o ti basi su di esso, non puoi distribuire il materiale così modificato.

STUDIO DEL COINVOLGIMENTO OSSEO E DELLA MEDIAZIONE DEL  
DOLORE IN CORSO DI COMPLEX REGIONAL PAIN SYNDROME TYPE I

Dott.ssa Maria Manara

Tesi di Dottorato

Verona, 20 Settembre 2017

## RIASSUNTO

**Obiettivo.** Scopo della nostra indagine è stato di valutare il ruolo del tessuto osseo nella Complex Regional Pain Syndrome- type I (CRPS-I), tramite a) studio dell'impatto del trattamento con bisfosfonati in una casistica *real-life* di pazienti con CRPS-I, volto ad identificare eventuali predittori di risposta al trattamento; b) analisi esplorativa della concentrazione sierica di Sclerostina (SOST), Dickkopf-1 (DKK-1) e Nerve Growth Factor (NGF) in corso di tale sindrome.

**Metodi.** Nella prima fase di studio sono stati valutati retrospettivamente i dati dei pazienti affetti da CRPS-I trattati con bisfosfonati endovenosi negli ultimi 5 anni. Sono state identificate le caratteristiche cliniche associate alla risposta al trattamento, definita in termini di riduzione del dolore e assenza dei criteri diagnostici della sindrome a distanza media di 40 giorni dal termine delle infusioni, tramite analisi univariata e multivariata (regressione logistica). Nella fase trasversale dello studio sono stati raccolti campioni di sangue refluo dall'arto affetto e dal controlaterale in pazienti affetti da CRPS-I di mano e in un gruppo di controlli sani, appaiati per età e sesso. È stato quindi effettuato un dosaggio della concentrazione sierica di SOST, DKK-1 e NGF tramite ELISA. I valori sono stati confrontati tra arto affetto e controlaterale e tra soggetti con CRPS-I e controlli sani.

**Risultati.** Dei 194 pazienti inclusi nella fase retrospettiva dello studio, trattati con Clodronato, Pamidronato e Neridronato, 139 pazienti (71,6%) avevano risposto al trattamento. Una minore durata di malattia, la presenza di una forma "calda" di malattia e una frattura come evento predisponente risultavano significativamente associati ad una maggiore probabilità di risposta al trattamento, mentre il tipo di bisfosfonati non influenzava significativamente la risposta terapeutica. I risultati della fase trasversale su 17 pazienti affetti da CRPS-I hanno evidenziato una concentrazione di DKK-1 significativamente superiore su sangue refluo dall'arto affetto rispetto al controlaterale nei pazienti con CRPS-I, tuttavia non statisticamente differente da quella dei controlli sani. Al contrario si sono osservati valori sierici di SOST significativamente più elevati nei pazienti affetti

da CRPS-I rispetto ai controlli sani, senza evidenziare una differenza significativa tra il lato affetto e il non affetto. Il dosaggio di NGF non ha invece identificato differenze tra il lato affetto e quello non affetto, né rispetto ai controlli sani; tale mediatore è risultato tuttavia dosabile in un numero molto limitato di soggetti, limitando fortemente la potenza della valutazione statistica.

**Conclusioni.** I risultati delle nostre osservazioni portano un ulteriore sostegno all'ipotesi di un coinvolgimento del tessuto osseo nella patogenesi della CRPS-I. La migliore risposta al trattamento con bisfosfonati in soggetti con precedente frattura suggerisce l'esistenza di un sottogruppo di pazienti in cui il ruolo del tessuto scheletrico risulti preponderante. Il riscontro di valori di DKK-1 più elevati su sangue refluo dall'arto affetto rispetto al controlaterale potrebbe indicare un'azione locale di tale regolatore del metabolismo osseo, mentre l'incremento della concentrazione di SOST non è di univoco significato, ma potrebbe essere implicato nella genesi dell'osteoporosi locale osservata nei soggetti affetti da CRPS-I. La valutazione dei livelli sierici di NGF non ha fornito risultati significativi per la limitata numerosità di soggetti in cui il mediatore è risultato dosabile: successivi studi, effettuati anche con differenti metodiche, potranno fornire ulteriori evidenze sul ruolo di questo mediatore del dolore nella CRPS-I.

## ABSTRACT

**Objective.** Aim of our study was to investigate the role of bone in Complex Regional Pain Syndrome- type I (CRPS-I), by a) analyzing the impact of the treatment with bisphosphonates in a real-life population of subjects with CRPS-I, with the aim to identify predictors of response to the treatment; b) exploring the serum concentration of Sclerostin (SOST), Dickkopf-1 (DKK-1) and Nerve Growth Factor (NGF) in CRPS-I.

**Methods.** In the first phase of the study we retrospectively evaluated data of patients with CRPS-I treated with intravenous bisphosphonates in the previous 5 years. We identified clinical features associated with a response to the treatment, defined as a pain reduction and the absence of diagnostic criteria for CRPS-I at 40 days after the end of the treatment, by univariate and logistic regression analysis. In the cross-sectional phase we collected serum samples from the affected arm and the contralateral one in patients with CRPS-I and in age- and sex-matched healthy controls. Serum concentration of SOST, DKK-1 and NGF was assessed by ELISA kit and values were compared between the affected arm and the contralateral one and between subjects with CRPS-I and controls.

**Results.** Among 194 subjects included in the retrospective phase of the study and treated with Clodronate, Pamidronate and Neridronate, 139 patients (71,6%) responded to the treatment. A shorter disease duration, a “warm” clinical phase and a fracture as predisposing event were significantly associated with higher odds of response to the treatment, while the type of bisphosphonates did not significantly affect the outcome. The results of the cross-sectional phase showed a significantly higher concentration of DKK-1 in serum from the affected site compared to the contralateral one, but we did not observe a significant difference from healthy controls. Conversely serum levels of SOST in patients with CRPS-I were significantly higher than in controls, but we did not find a significant difference between the affected site and the contralateral one. NGF was detectable only in a few patients, therefore a reliable statistical analysis on its concentration was not feasible.

**Conclusions.** Our results further support the hypothesis of a role of bone in the pathogenesis of CRPS-I. A better response to the treatment with bisphosphonates in subjects with a previous fracture suggests that a subgroup of patients with a prevalent bone involvement may exist. The finding of a higher concentration of DKK-1 in serum from the affected arm compared to the contralateral one may point out a local effect of this regulator of bone metabolism in CRPS-I, while the systemic increase of SOST concentration could be implicated in the pathogenesis of bone loss observed in patients with CRPS-I. The evaluation of serum levels of NGF did not provide significant results due to the low proportion of subjects in which this mediator was detectable: further studies with different methodologies may allow to better understand the role of NGF in CRPS-I.

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>8</b>
<b>1.1. LA SINDROME ALGODISTROFICA (CRPS)</b>	<b>8</b>
1.1.1 La sindrome algodistrofica: una sindrome complessa	8
1.1.2 Quadro clinico e diagnosi	10
1.1.3 Ipotesi patogenetiche	13
1.1.4 Trattamento della CRPS-I: il ruolo dei bisfosfonati	15
<b>1.2. IL COINVOLGIMENTO OSSEO IN CORSO DI CRPS-I</b>	<b>18</b>
1.2.1 Un ruolo per l'osso nella CRPS-I?	18
1.2.2 Modelli animali di CRPS-I	19
1.2.3 Il coinvolgimento del tessuto osseo in corso di CRPS-I: studi sull'uomo	23
<b>1.3. POSSIBILI MEDIATORI DEL DANNO OSSEO E DELLA TRASMISSIONE DEL DOLORE IN CORSO DI CRPS-I: IPOTESI SPECULATIVE</b>	<b>25</b>
<b>2. OBIETTIVO DELLO STUDIO</b>	<b>28</b>
<b>3. METODI</b>	<b>29</b>
<b>4. RISULTATI</b>	<b>34</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSIONI</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>57</b>

# Capitolo 1: INTRODUZIONE

## 1.1 La sindrome algodistrofica (Complex Regional Pain Syndrome)

### *1.1.1 La sindrome algodistrofica: una sindrome complessa*

Poche patologie come la sindrome algodistrofica hanno conosciuto nel tempo una simile varietà di nomi, descrizioni, definizioni, criteri classificativi, ipotesi patogenetiche e trattamenti proposti. Oggi il termine descrittivo utilizzato in ambito internazionale è quello di “Complex Regional Pain Syndrome” (CRPS), che meglio definisce rispetto ad altri nomi proposti in passato (come causalgia, atrofia di Sudeck, Reflex Sympathetic Dystrophy) questa patologia caratterizzata da un’intensa sintomatologia dolorosa regionale, associata ad una complessità di segni e sintomi a carico del distretto interessato. Il quadro clinico della sindrome è infatti caratterizzato da un dolore continuo e sproporzionato rispetto all’evento precipitante, che interessa una regione corporea solitamente distale (mano o piede) ma non è limitato ad uno specifico territorio di innervazione o dermatomero; la sintomatologia dolorosa è accompagnata da alterazioni sensitive (allodinia, iperalgesia), vasomotorie (tumefazione, calore, ipertermia o al contrario cianosi e ipotermia), sudomotorie (iperidrosi o disidrosi), alterazioni trofiche e limitazione funzionale (1). Il decorso della patologia può essere benigno, con una risoluzione del quadro clinico nell’arco di alcuni mesi, ma spesso in assenza di terapia la malattia può comportare gravi esiti, come una limitazione funzionale permanente e una sintomatologia dolorosa persistente non responsiva ai comuni analgesici.

La storia dell’identificazione clinica di questa sindrome ben esemplifica l’estrema complessità di manifestazioni cliniche e ipotesi patogenetiche ad essa relative (2). Le prime descrizioni di quadri clinici riconducibili alla CRPS nel XIX secolo furono riportate da chirurghi implicati nella gestione di ferite di guerra



all'arto superiore; le alterazioni vasomotorie e sudomotorie osservate a carico dell'estremità distale vennero attribuite alla lesione di un nervo e definite col termine di "causalgia", dal greco καυσός (bruciore) e άλγος (dolore) (3). Successivamente Paul Sudeck descrisse un quadro di "atrofia ossea infiammatoria acuta" in cui le manifestazioni infiammatorie osservate in seguito a fratture o eventi traumatici delle estremità distali si associavano ad un quadro radiografico di "atrofia ossea"; per questo la sindrome descritta assunse la terminologia di "atrofia di Sudeck" (4, 5). Un ruolo fondamentale del sistema nervoso simpatico venne invece ipotizzato da Leriche, che effettuò la prima simpatectomia a scopo terapeutico in questi pazienti, e successivamente ribadito da Evans, che formulò la definizione di "Reflex Sympathetic Syndrome" (6, 7). Altre ipotesi patogenetiche vennero successivamente proposte, come quella suggerita da Foisie di un "vasospasmo arterioso traumatico" all'origine della sintomatologia osservata (8); globalmente tuttavia l'ipotesi di un preponderante ruolo del sistema nervoso prevalse e la gestione della sindrome divenne appannaggio principalmente degli algologi, che coniarono il termine attualmente utilizzato di CRPS (9).

Ad oggi il riferimento principale per la terminologia e i criteri classificativi della sindrome è rappresentato dalla International Association for the Study of Pain (IASP), ma la gestione clinica del paziente coinvolge molteplici specialisti: algologi, fisiatristi, ortopedici, reumatologi, psicologi e altre figure in ambito sanitario.

Alla varietà delle manifestazioni cliniche, degli specialisti coinvolti e delle ipotesi patogenetiche formulate corrisponde inoltre una molteplicità di soluzioni terapeutiche proposte, per la maggior parte delle quali tuttavia ad oggi non sono disponibili livelli di evidenza elevati riguardo all'efficacia del trattamento. Per questo motivo, nonostante il notevole sforzo della comunità scientifica negli ultimi anni per approfondire la conoscenza della sindrome, rimangono ad oggi numerosi punti oscuri riguardo alla sua patogenesi e all'efficacia dei trattamenti proposti in pazienti con caratteristiche estremamente eterogenee.

### *1.1.2 Quadro clinico e diagnosi*

L'estrema eterogeneità delle manifestazioni cliniche e dei criteri diagnostici utilizzati negli anni rendono difficile dare un'esatta definizione dei dati di prevalenza e incidenza della CRPS (10). In letteratura sono descritti tassi di incidenza che vanno dal 5 al 26 per 100.000 persone-anni, a seconda della casistica analizzata (11, 12). La sindrome colpisce più frequentemente il sesso femminile e si manifesta spesso nella quinta o sesta decade di vita (10).

Nella maggior parte dei casi si riconoscono degli eventi "precipitanti" all'origine della CRPS. Questi possono essere rappresentati da fratture dell'arto superiore o inferiore, trattate conservativamente o chirurgicamente: a seconda dei criteri diagnostici utilizzati, la percentuale di pazienti che sviluppa una CRPS in seguito a frattura del radio distale supera il 30% in alcuni studi (13). Anche l'intervento chirurgico in ambito ortopedico (come ad esempio per sindrome del tunnel carpale o morbo di Dupuytren, o in seguito a frattura) può essere seguito dall'insorgenza di una CRPS in una percentuale significativa di casi (14). Tra i fattori scatenanti si osserva anche il trauma accompagnato o meno da distorsione e, più raramente, infarto miocardico, ictus, infezione da herpes zoster o altre patologie; in alcuni casi non è possibile identificare alcun evento precipitante.

Il quadro clinico, caratterizzato da dolore continuo e sproporzionato rispetto all'evento precipitante, associato ad alterazioni sensitive, vasomotorie, sudomotorie e trofiche e a limitazione funzionale, può essere estremamente variabile. In passato è stata ipotizzata la presenza di tre fasi consecutive: una fase "acuta" iniziale, caratterizzata da alterazioni flogistiche quali edema, rossore, calore e iperidrosi in associazione al dolore e alla limitazione funzionale; una successiva fase "distrofica" in cui all'eritema si sostituisce la cianosi e le alterazioni degli annessi cutanei; e una fase finale "atrofica", con atrofia cutanea, ipotermia, dolore cronico e limitazione funzionale residua con contratture e tremore (15). Studi successivi tuttavia non hanno confermato la presenza di queste tre fasi in tutti i pazienti affetti da CRPS e soprattutto la successione temporale delle stesse (16). Un'altra distinzione clinica comunemente effettuata è quella tra le fasi "calda" e "fredda" di malattia: nella prima l'ipertermia si associa a

manifestazioni infiammatorie quali rossore ed edema, mentre nella seconda l'estremità interessata dalla CRPS si presenta fredda e non tumefatta. La fase fredda sembrerebbe rappresentare un'evoluzione dalla fase calda verso una forma cronica di CRPS, risultando quindi associata ad un peggiore outcome di malattia; anche questa sequenza di fasi tuttavia è stata recentemente contestata in quanto non tutti i pazienti sembrerebbero attraversare entrambe le fasi in maniera consecutiva nella loro storia clinica, mentre potrebbero esistere forme "fredde" dall'esordio (16).

Quella che invece è comunemente accettata è la suddivisione in differenti sottogruppi in base alla supposta origine del dolore, ovvero in CRPS di tipo I (CRPS-I), corrispondente alle forme in cui non vi è un evidente danno di un nervo (normalmente secondaria ad evento traumatico, frattura o intervento chirurgico) e in CRPS di tipo II (CRPS-II), in cui vi è l'evidenza di un danno maggiore di un nervo (1).

La diagnosi di CRPS si basa essenzialmente su criteri di tipo clinico. Secondo i criteri di Budapest (17), fatti propri dalla IASP nel 2012 (1), al dolore continuo e sproporzionato rispetto a qualsiasi evento scatenante, si devono associare un numero minimo di segni e sintomi nelle altre categorie (**Tabella 1**). La diagnosi prevede l'esclusione di altre possibili cause della sintomatologia, ma non richiede l'utilizzo di accertamenti strumentali.

I criteri di Budapest utilizzati per la diagnosi prevedono la presenza di un sintomo in almeno tre delle quattro categorie indicate, mentre quelli utilizzati a scopo di ricerca prevedono almeno un sintomo per ognuna delle quattro categorie. Questa distinzione tra criteri diagnostici e di ricerca è stata effettuata per privilegiare la sensibilità dei criteri in fase diagnostica e la loro specificità in ambito di ricerca. Tuttavia questo tipo di criteri esclude dalla diagnosi un certo numero di pazienti verosimilmente affetti da CRPS, che vanno quindi a costituire un terzo gruppo rispetto a CRPS-I e CRPS-II, definito come CRPS-NOS (*not otherwise specified*): esso include coloro che soddisfano solo parzialmente i criteri diagnostici, ma per i quali non vi sono altre diagnosi più plausibili.

**Tabella 1: Criteri per la diagnosi clinica della CRPS-I (modificato da Harden 2013) (1)**

---

**Criteri per la diagnosi clinica della CRPS-I**

---

1) Dolore continuo, sproporzionato rispetto ad ogni evento scatenante

2) Almeno un sintomo in 3 delle 4 seguenti categorie:

Alterazioni sensitive: riferita iperalgesia e/o allodinia

Alterazioni vasomotorie: riferita asimmetria della temperatura e/o alterazioni del colore cutaneo e/o asimmetria del colore cutaneo

Alterazioni sudomotorie/edema: riferito edema e/o alterazioni della sudorazione e/o asimmetria della sudorazione

Alterazioni motorie/trofiche: riferito ridotto range di movimento e/o disfunzioni motorie (debolezza, tremore, distonia) e/o alterazioni trofiche (peli, unghie, cute)

3) Almeno un segno al momento della valutazione in 2 delle 4 seguenti categorie:

Alterazioni sensitive: evidenza di iperalgesia e/o allodinia

Alterazioni vasomotorie: evidenza di asimmetria della temperatura e/o alterazioni del colore cutaneo e/o asimmetria del colore cutaneo

Alterazioni sudomotorie/edema: evidenza di edema e/o alterazioni della sudorazione e/o asimmetria della sudorazione

Alterazioni motorie/trofiche: evidenza di ridotto range di movimento e/o disfunzioni motorie (debolezza, tremore, distonia) e/o alterazioni trofiche (peli, unghie, cute)

4) Assenza di altre diagnosi che giustifichino i segni e sintomi osservati

---

CRPS-I: complex regional pain syndrome - type I

Sebbene non inclusi nei criteri diagnostici per la notevole variabilità dei riscontri, alcuni accertamenti radiologici permettono un ulteriore supporto alla diagnosi. Il quadro radiografico può mostrare un'iperdiafania del distretto interessato rispetto al controlaterale, suggestiva di una ipomineralizzazione; nelle forme di lunga durata si può osservare l'osteoporosi "maculata" descritta da Sudeck come tipica dei pazienti affetti da CRPS-I (4). La scintigrafia ossea nelle fasi precoci può mostrare un'iper captazione locale del tracciante nella sede della CRPS-I; tuttavia la sua utilità nella pratica clinica è oggi messa in discussione in quanto questo esame è caratterizzato da un'elevata specificità ma bassa sensibilità (18). In alcuni pazienti affetti da CRPS-I è stato osservato un edema osseo alla Risonanza Magnetica; la sensibilità di questo quadro in corso di CRPS-I tuttavia non è nota, così come l'estrema eterogeneità delle manifestazioni cliniche associate a questo tipo di riscontro strumentale ne limita certamente la specificità (19).

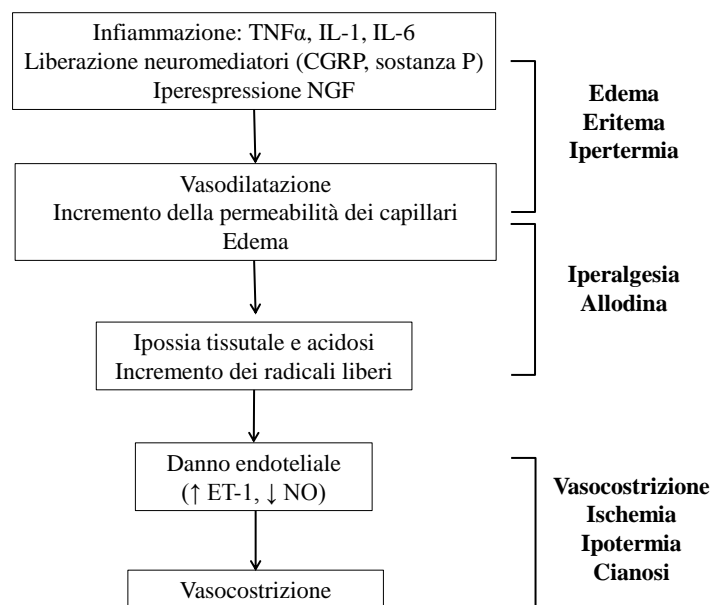
### ***1.1.3 Ipotesi patogenetiche***

L'estrema varietà di ipotesi patogenetiche proposte negli anni corrisponde alla notevole eterogeneità di manifestazioni cliniche associate alla CRPS-I. Tuttavia negli ultimi anni lo sviluppo di modelli animali della sindrome, come il modello di dolore cronico ottenuto nei ratti tramite frattura di tibia o il modello di ischemia e riperfusione dell'arto, ha permesso di chiarire meglio alcuni meccanismi locali che si instaurano nelle fasi precoci e in quelle più tardive di malattia (20, 21).

Sulla base di questi riscontri, le ipotesi patogenetiche ad oggi più accreditate sono quelle che vedono un ruolo preponderante di un processo neuro-infiammatorio nelle fasi precoci di malattia e di un'alterazione della microcircolazione nelle fasi più tardive (22). Più nel dettaglio, nelle prime fasi di malattia, nelle quali da un punto di vista clinico si osservano manifestazioni di tipo infiammatorio (edema, eritrosi, ipertermia), vi sarebbe un rilascio locale di citochine infiammatorie e neuropeptidi, in grado di causare l'iperalgia e l'allodinia tipiche della CRPS-I. L'infiltrato di cellule polimorfonucleate,

leucociti, macrofagi e mastociti stimolerebbero il rilascio di sostanza P e calcitonin related-gene peptide (CGRP), anche grazie alla mediazione del Nerve Growth Factor (NGF), con conseguenti alterazioni sensitive e del microcircolo. Le principali citochine infiammatorie implicate in questa fase sarebbero  $TNF\alpha$ , IL-6 e IL-1 (23). Nella fase successiva, cronica, di malattia, prevarrebbero le manifestazioni ischemiche, corrispondenti dal punto di vista clinico all'ipotermia e alla cianosi osservate nella fase "fredda" di malattia. In queste fasi l'ischemia e l'alterata permeabilità capillare sarebbero responsabili di un'ipossia e acidosi tissutale, a loro volta causa di sensitizzazione nocicettiva (21). In queste fasi si osserva anche un danno endoteliale con liberazione di Endotelina-1 (24) (**Figura 1**).

**Figura 1. Possibili meccanismi patogenetici della CRPS-I con relative manifestazioni cliniche (modificato da Varenna et al. 2015) (22).**



Il ruolo del sistema nervoso simpatico è stato ridimensionato negli ultimi anni in seguito alla dimostrazione di una limitata efficacia della terapia con blocco del sistema nervoso simpatico (25). Inoltre l'osservazione di una ridotta attività del sistema parasimpatico nelle fasi iniziali di malattia, potenzialmente responsabile

della vasodilatazione locale, supporta l'ipotesi di un prevalente coinvolgimento del sistema nervoso simpatico nelle fasi più tardive, in cui è stata dimostrata un'elevata espressione di recettori  $\alpha$ -adrenergici a livello cutaneo (22). Anche il sistema nervoso centrale sembrerebbe coinvolto nella patogenesi del dolore, che tipicamente ha una distribuzione non metamERICA e si può associare a manifestazioni di tipo motorio, quali tremore e debolezza muscolare. Studi funzionali di Risonanza Magnetica cerebrale hanno dimostrato una riorganizzazione nelle aree somatosensitive corticali corrispondenti all'arto affetto e non al controlaterale; non è chiaro tuttavia se queste possano rappresentare alterazioni tipiche della CRPS-I o al contrario siano manifestazioni aspecifiche legate al dolore cronico neuropatico (26).

#### ***1.1.4 Trattamento della CRPS-I: il ruolo dei bisfosfonati***

Il trattamento della CRPS-I richiede un approccio multidisciplinare integrato, che affianchi alla terapia farmacologica un programma riabilitativo funzionale e psicologico e, nelle forme croniche, un supporto al paziente nella gestione del dolore.

Sono state proposte molteplici terapie, con approcci totalmente differenti e basati su ipotesi patogenetiche estremamente diversificate. Tuttavia l'evidenza di efficacia ad oggi disponibile è scarsa dal momento che trial controllati correttamente disegnati e con numerosità adeguate di soggetti inclusi sono difficili da realizzare per una patologia a bassa incidenza come la CRPS-I. Inoltre gli *end-point* di efficacia specifici per la patologia non sono chiaramente definiti e la valutazione della risposta si basa normalmente sul criterio soggettivo di riduzione del dolore.

Sono stati effettuati trial randomizzati controllati per testare l'efficacia in corso di CRPS-I dei trattamenti farmacologici con glucocorticoidi, immunoglobuline endovena, farmaci anti-infiammatori non steroidei, *scavenger* dei radicali liberi dell'ossigeno, ketamina (27-34). Questi studi tuttavia non raggiungevano una numerosità sufficiente per ottenere dimostrazioni certe di

efficacia o dimostravano un effetto transitorio sul dolore, limitato nel tempo e solo nei pazienti in fase acuta di malattia (35). I dati relativi all'utilizzo di farmaci anticonvulsivanti, antidepressivi e oppioidi sembrerebbero inconcludenti (36), mentre una recente meta-analisi suggerisce un ruolo della vitamina C nella prevenzione della CRPS-I in seguito a frattura (37).

Le più recenti linee guida IASP sul trattamento della CRPS-I suggeriscono l'utilizzo di terapie farmacologiche complementari all'approccio psicologico e funzionale a seconda delle manifestazioni cliniche prevalenti (1). Tuttavia occorre sottolineare che al momento della formulazione delle raccomandazioni non erano ancora disponibili alcune evidenze sull'efficacia di trattamenti farmacologici, quali ad esempio quelle relative all'utilizzo del Neridronato endovenoso (38). La IASP suggerisce nei casi refrattari, o come approccio complementare alla terapia farmacologica, la possibilità di utilizzo di metodiche più invasive, come per esempio blocchi nervosi, cateteri intratecali, neurostimolazione, o, in caso di mancata risposta, interventi di simpatectomia o stimolazione della corteccia motoria; tuttavia una recente revisione Cochrane conclude che vi siano scarse evidenze in supporto dell'utilizzo di un blocco anestetico locale del sistema simpatico nella CRPS-I (25).

I dati ad oggi più solidi riguardo al trattamento farmacologico della CRPS-I sono relativi ai bisfosfonati. L'utilizzo dei bisfosfonati nel trattamento della CRPS-I è stato per la prima volta proposto in un trial randomizzato controllato del 1997, in cui si dimostrava la superiore efficacia rispetto al placebo di Alendronato somministrato per via endovenosa (39). Ad esso sono seguiti altri trial randomizzati in cui differenti bisfosfonati (Clodronato endovenoso, Alendronato per os e Pamidronato endovenoso) sono stati testati contro placebo per il trattamento della CRPS-I (40-42). Il trial con la maggiore numerosità è stato pubblicato nel 2013 ed ha utilizzato Neridronato endovenoso (al dosaggio di 100 mg per 4 infusioni ogni quarto giorno), dimostrandone l'efficacia in termini di riduzione del dolore associato alla CRPS-I (38). I risultati di questo studio hanno portato all'approvazione da parte dell'AIFA del Neridronato per il trattamento della CRPS-I.



**Tabella 2: Principali trial randomizzati controllati contro placebo sull'uso dei bisfosfonati nella CRPS-I (modificato da Chevreau 2017) (43)**

<b>Autore</b>	<b>Bisfosfonato</b>	<b>Dosaggio</b>	<b>N. pazienti</b>
Adami, 1997 (39)	Alendronato	7,5 mg/die endovena per 3 giorni	20
Manicourt, 2004 (41)	Alendronato	40 mg/die per os per 8 settimane	40
Robinson, 2004 (42)	Pamidronato	60 mg endovena una sola volta	27
Varena, 2000 (40)	Clodronato	300 mg/die endovena per 10 giorni	32
Varena, 2013 (38)	Neridronato	100 mg endovena per 4 volte in 10 giorni	82

CRPS-I: complex regional pain syndrome - type I

Una recente revisione sistematica sull'utilizzo dei bisfosfonati nella CRPS-I ha permesso di effettuare una meta-analisi dei risultati dei trial randomizzati controllati pubblicati, che ha dimostrato l'efficacia di queste molecole nel trattamento a breve (30-40 giorni) e medio termine (2-3 mesi) in termini di riduzione del dolore (43). Globalmente gli studi inclusi non hanno evidenziato eventi avversi seri nella popolazione in studio ed il profilo di safety dei bisfosfonati è risultato accettabile, con una maggiore prevalenza di eventi avversi lievi o di media entità nel gruppo dei soggetti trattati con bisfosfonati, riconducibili principalmente alla reazione di fase acuta caratteristica degli aminobisfosfonati (febbre, poliartalgie, malessere), a reazioni locali nel sito di infusione o a un'ipocalcemia transitoria asintomatica.

## **1.2 Il coinvolgimento osseo in corso di CRPS-I**

### ***1.2.1 Un ruolo per l'osso nella CRPS-I?***

Sebbene la CRPS-I sia stata considerata per anni una patologia legata prevalentemente ad una disfunzione del sistema nervoso, numerosi dati negli anni hanno portato a considerare il possibile ruolo di altri sistemi all'origine o nel mantenimento della sintomatologia. In particolare un coinvolgimento del tessuto osseo è stato ipotizzato inizialmente da Sudeck, che ha evidenziato nei suoi pazienti un quadro radiografico tardivo caratteristico, definito come "patchy osteoporosis", limitato al distretto interessato dalla CRPS-I e facilmente individuabile dal confronto con l'arto controlaterale (4).

Anche altri esami strumentali come la scintigrafia ossea, che mostra un'iper captazione locale del tracciante in fase precoce di malattia, o la risonanza magnetica, che evidenzia in alcuni pazienti un edema osseo in sede di CRPS-I, suggeriscono un coinvolgimento del tessuto osseo nel corso della patologia, anche più precocemente di quanto osservabile tramite la radiografia convenzionale.

Il dato epidemiologico della frequente insorgenza di CRPS-I in seguito a fratture, in soggetti in età avanzata e in donne dopo la menopausa (12) o in pazienti con osteogenesi imperfetta (44), fornisce un ulteriore supporto all'ipotesi di un ruolo del tessuto osseo nella genesi della patologia.

Inoltre la recente introduzione dei bisfosfonati nel trattamento della CRPS-I sembra aprire nuove prospettive speculative sulla patogenesi della sindrome, anche se è ipotizzabile che in questo contesto i bisfosfonati agiscano tramite un meccanismo d'azione diverso da quello che viene utilizzato a scopo terapeutico in altre patologie, come per esempio nell'osteoporosi (45).

### ***1.2.2 Modelli animali di CRPS-I***

Il modello animale di CRPS-I più utilizzato a scopo di ricerca è quello che si ottiene nei topi tramite frattura: in seguito alla frattura di tibia e all'immobilizzazione, gli animali sviluppano edema, ipertermia, osteoporosi locale e un comportamento indicativo di dolore spontaneo e indotto da stimolo meccanico, analogamente a quanto si osserva nell'uomo in corso di CRPS-I (36). Questi modelli murini di CRPS-I post frattura hanno permesso di studiare più a fondo le alterazioni locali che si evidenziano nel corso della patologia.

Il gruppo di Palo Alto ha dimostrato in tali modelli animali che, a distanza di 4 settimane dalla frattura e dall'immobilizzazione dell'arto fratturato, si osserva un'incrementata espressione di sostanza P e calcitonin gene-related peptide (CGRP) nel nervo sciatico e a livello sierico, con conseguente edema dell'arto fratturato e sviluppo di comportamenti di difesa dal dolore (46); inoltre si osserva un'iperproliferazione dei cheratinociti cutanei e un incremento dell'espressione tissutale di Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 e Nerve Growth Factor (NGF) (47-50). Negli studi effettuati, la proliferazione dei cheratinociti e l'incrementata produzione di citochine pro-infiammatorie veniva inibita dall'utilizzo di antagonisti del recettore NK1 per la sostanza P e non si verificava in topi con deplezione del recettore per la sostanza P e per il CGRP, suggerendo che un'iperattivazione del signaling dei neuropeptidi nell'arto immobilizzato in seguito a frattura possa avere un ruolo cruciale nell'attivazione dei cheratinociti e nell'espressione dei mediatori dell'infiammazione, responsabili del corredo di segni e sintomi associati alla CRPS-I (20, 47, 51).

Più recentemente lo stesso gruppo ha dimostrato che un quadro clinico sovrapponibile a quello che si osserva in corso di CRPS-I poteva essere indotto nei ratti dalla sola immobilizzazione dell'arto, anche in assenza di frattura. Essi hanno osservato che l'arto immobilizzato dopo quattro settimane si presentava caldo ed edematoso, veniva tenuto in scarico a scopo antalgico ed era presente allodinia; inoltre veniva registrato un incremento di sostanza P e CGRP a livello del nervo sciatico, un'iperproliferazione cutanea dei cheratinociti e un'aumentata espressione cutanea di citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NGF).

Al contrario, la mobilitazione precoce dell'arto preveniva le alterazioni nocicettive e infiammatorie, suggerendo che l'immobilizzazione possa avere un ruolo patogenetico nella malattia anche indipendentemente dalla frattura (52).

Questa ipotesi è coerente con l'osservazione da parte di altri autori che l'osteoporosi locale indotta dall'immobilizzazione in modelli sperimentali di topi mantenuti sospesi per la coda, era in grado di causare dolore, potenzialmente legato all'iperattivazione osteoclastica e alla conseguente acidificazione tissutale; il dolore poteva essere prevenuto dal trattamento con bisfosfonati e si riduceva significativamente con l'utilizzo di antagonisti dei nocicettori sensibili all'acidità (53).

Sempre il gruppo di Palo Alto ha osservato che la sensitizzazione cronica regionale mediata da IL-1 $\beta$  era secondaria ad un'iperattivazione dell'inflammasoma a livello cutaneo, stimolata dai recettori per la sostanza P, suggerendo un possibile ruolo dell'immunità innata nella patogenesi di tale malattia (54). Più recentemente, in un simile modello murino di CRPS-I post frattura, lo stesso gruppo ha dimostrato la presenza di un infiltrato di cellule CD20 positive in sede di riparazione e ha osservato che il trattamento con anti-CD20 era in grado di attenuare le alterazioni vascolari e nocicettive tipiche della CRPS-I, aprendo la strada ad un possibile ruolo dell'autoimmunità nella patogenesi della sindrome (55).

Nel valutare il ruolo di IL-1 nella genesi delle alterazioni tipiche della CRPS-I nei modelli murini post frattura, si è osservato che questa citochina è in grado di stimolare l'iperproduzione di NGF da parte dei cheratinociti cutanei, inducendo una sensitizzazione regionale nocicettiva cronica (56). Nei modelli sperimentali l'utilizzo di anticorpi diretti contro NGF era in grado di ridurre la sensitizzazione nocicettiva meccanica e il contenuto di neuropeptidi a livello del nervo sciatico; tuttavia non si osservava una significativa riduzione dell'edema né delle citochine pro-infiammatorie, riscontro che permette di ipotizzare che l'inibizione di NGF sia in grado di contrastare il dolore ma non le manifestazioni flogistiche associate alla malattia (50). È interessante notare che il trattamento con anti-NGF era in grado di limitare anche la perdita ossea a livello dell'arto affetto (50).

In uno studio successivo Wei e colleghi hanno valutato la differente espressione di tali mediatori in fase acuta e cronica di malattia, ovvero rispettivamente a 4 e 16 settimane dalla frattura. Nella fase acuta i segni di infiammazione (edema, calore, eritema) si associavano alle alterazioni nocicettive, mentre in quella cronica erano presenti solo le alterazioni sensitive. L'iperespressione a livello cutaneo dei neuropeptidi, delle molecole infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) e dell'NGF era riscontrabile solo a 4 settimane dalla frattura, mentre a 16 settimane solo i neuropeptidi risultavano elevati e unicamente a livello spinale. La somministrazione sistemica di antagonisti del recettore per la sostanza P, di anticorpi diretti contro l'IL-1 (anakinra) e contro l'NGF si dimostrava efficace nel ridurre il dolore solo nella fase acuta di malattia, mentre in quella cronica unicamente la somministrazione intratecale di tali sostanze risultava efficace sui comportamenti nocicettivi. Sulla base di tali riscontri, gli autori hanno ipotizzato che in fase acuta vi sia una liberazione locale di neuropeptidi che innescano una reazione locale infiammatoria e nocicettiva (mediata da NGF) che coinvolge diversi tessuti (osso, cute, nervo), mentre nella fase cronica il dolore sarebbe mediato essenzialmente da una stimolazione nocicettiva cronica a livello spinale (23).

Contrariamente a quello che accade normalmente, ovvero che dal modello animale si passa all'utilizzo nell'uomo, gli autori hanno voluto testare sul modello murino di CRPS-I post frattura l'azione dei bisfosfonati, a partire dai dati di efficacia derivati dagli studi clinici. Wang e colleghi hanno osservato che la somministrazione di Alendronato sottocutaneo o di Zoledronato per via orale era in grado di inibire l'allodinia e di ridurre l'espressione tissutale di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e NGF; inoltre il trattamento risultava efficace nell'inibire la perdita ossea, mentre non aveva effetto sull'espressione dei neuromediatori a livello del nervo sciatico e a livello spinale. Questi risultati complessivamente forniscono un'evidenza sperimentale dell'azione multisistemica che i bisfosfonati eserciterebbero in corso di CRPS-I (57).

Infatti, sebbene l'utilizzo dei bisfosfonati nel trattamento della CRPS-I sia stato ipotizzato sulla base del riscontro radiografico di un'osteoporosi regionale, un'iperattività degli osteoclasti non è mai stata chiaramente dimostrata in questa

sindrome (22). È ipotizzabile quindi che l'efficacia dei bisfosfonati nel trattamento della CRPS-I sia legata non tanto (o non solamente) alla nota attività anti-riassorbitiva diretta contro gli osteoclasti, quanto ad altri meccanismi di azione anti-flogistici che i bisfosfonati sono in grado di esercitare quando raggiungono elevate concentrazioni locali, come indirettamente è dimostrato che accada in questa patologia dall'iperaccumulo locale del bisfosfonato che si osserva alla scintigrafia ossea (22).

In corso di CRPS-I infatti si osserva una perdita ossea locale che si sviluppa molto rapidamente e che verosimilmente potrebbe essere legata non tanto a un riassorbimento mediato dagli osteoclasti, quanto a una ipomineralizzazione secondaria all'acidosi locale (58). I bisfosfonati in questo contesto potrebbero agire inibendo la dissoluzione dei cristalli di idrossiapatite, come dimostrato in studi storici effettuati su questi farmaci (59). Inoltre l'efficacia in termini di riduzione del dolore espletata da queste molecole potrebbe essere legata alla ridotta stimolazione dei recettori sensibili all'acido, che sono iperespressi in corso di CRPS-I (53).

Il riscontro di una riduzione dei segni locali di flogosi nei pazienti trattati con bisfosfonati porta inoltre a speculare sul possibile effetto anti-infiammatorio di tali molecole, che ad elevate concentrazioni sono in grado di inibire la proliferazione dei macrofagi e dei monociti, esercitando un'azione citotossica su tali cellule (60, 61). L'inibizione della produzione di citochine infiammatorie potrebbe interrompere la stimolazione da parte di queste sostanze dei neuromediatori implicati nella genesi dell'iperalgisia e dell'allodinia in modelli animali di CRPS-I (23).

Un altro possibile target dell'azione dei bisfosfonati potrebbe essere rappresentato da NGF, che nei modelli animali risulta incrementato in corso di CRPS-I e implicato nel mantenimento della flogosi e nel rilascio di sostanza P e CGRP (50). Recentemente in modelli murini di CRPS-I è stato dimostrato che i bisfosfonati sono in grado di ridurre l'espressione tissutale di NGF (57). Questa regolazione negativa dell'NGF potrebbe avvenire anche indirettamente, tramite l'inibizione della proliferazione dei cheratinociti da parte dei bisfosfonati (62).

### ***1.2.3 Il coinvolgimento del tessuto osseo in corso di CRPS-I: studi sull'uomo***

Sebbene alcuni studi epidemiologici permettano di ipotizzare una maggior prevalenza della CRPS-I tra i pazienti affetti da osteoporosi (12), una ridotta densità minerale ossea a livello sistemico non è un riscontro sistematico nei soggetti con algodistrofia. Inoltre l'interessamento regionale della sindrome permette di ipotizzare che vi possa essere un'alterazione esclusivamente locale del tessuto osseo, corrispondente a quanto si osserva all'imaging. Su queste basi alcuni autori hanno voluto valutare la densità minerale ossea a livello locale in corso di CRPS-I.

Karacan e colleghi hanno effettuato una valutazione densitometrica a livello del radio dell'arto affetto e di quello controlaterale in 32 pazienti con CRPS-I di mano: in 12 di essi non si osservavano valori densitometrici patologici (T score <-1) in nessuno dei due arti, 9 pazienti mostravano valori patologici in entrambi i lati, mentre in 11 soggetti i valori di densità minerale ossea erano significativamente inferiori a livello dell'arto affetto rispetto al controlaterale. Globalmente il 62.5% dei pazienti mostrava una perdita ossea a livello dell'arto affetto e il 28.1% a livello dell'arto controlaterale; tuttavia la perdita ossea a livello dell'arto controlaterale si sviluppava più tardivamente rispetto a quello affetto ed era di minore entità (63). In un altro studio del 2001 sono stati inclusi 20 pazienti affetti da CRPS-I dell'arto superiore, insorta in seguito a ictus: in questi pazienti i valori medi di densità minerale ossea tra lato affetto e non affetto non risultavano significativamente differenti, mentre risultavano ridotti rispetto a un gruppo di controlli sani; tuttavia il disegno dello studio non permetteva di distinguere se i ridotti valori osservati fossero secondari alla CRPS-I o all'immobilizzazione conseguente a ictus (64). In uno studio ancora precedente è stata effettuata una valutazione tramite microdensitometria computerizzata ad entrambe le mani in pazienti con CRPS-I dell'arto superiore: i valori microdensitometrici misurati a livello dell'arto affetto risultavano significativamente inferiori rispetto al lato opposto e l'entità della differenza correlava con la durata della malattia (65).

Se gli studi volti a valutare il coinvolgimento del tessuto osseo tramite densitometria non hanno fornito risultati dirimenti, altrettanto deboli sono i riscontri relativi ai marcatori sierici del metabolismo osseo in corso di CRPS-I. Nello studio di Varenna e colleghi del 2000, solo 7 pazienti su 32 mostravano valori incrementati del telopeptide N-terminale (NTX), indicativi di un aumento del riassorbimento osseo (40); analogamente l'idrossiprolina urinaria non ha mostrato in altri studi una chiara correlazione con l'andamento clinico della CRPS-I (66). Più recentemente è stato dimostrato un incremento della concentrazione sierica di Osteoprotegerina in 23 pazienti affetti da CRPS-I rispetto a un gruppo di controlli sani e di pazienti fratturati; tuttavia il significato patogenetico di questo marcatore di attività osteoblastica non è chiaro, soprattutto in relazione alla sua potenziale implicazione nella genesi del dolore (67).

È ipotizzabile che la scarsità di dati relativi ai marcatori del metabolismo osseo possa essere in qualche modo legata a una limitata attenzione degli specialisti che si occupano di CRPS-I verso il tessuto scheletrico. È anche possibile che in corso di CRPS-I si possa verificare un'alterazione locale della concentrazione di alcuni di questi marcatori, che non si traduce tuttavia in un'alterazione rilevabile a livello sistemico. Il quadro clinico che vede l'interessamento isolato di un distretto corporeo distale, insieme ai dati strumentali che dimostrano reperti patologici unicamente nella sede della CRPS-I (osteoporosi regionale all'esame radiografico, edema osseo alla risonanza magnetica, ipercaptazione del tracciante alla scintigrafia), permettono infatti di ipotizzare che dal punto di vista patogenetico l'alterata produzione e liberazione di citochine e altri mediatori si verifichi soprattutto a livello locale.



### **1.3 Possibili mediatori del danno osseo e della trasmissione del dolore in corso di CRPS-I: ipotesi speculative**

Da un punto di vista speculativo, è possibile ipotizzare che in corso di CRPS-I vi possa essere un'alterata concentrazione locale di Sclerostina (SOST) e Dickkopf-related protein 1 (DKK-1), mediatori coinvolti nella regolazione del metabolismo osseo mediata dal sistema Wnt. Dati su studi animali hanno infatti evidenziato un incremento dell'espressione di SOST a livello osseo in assenza di carico, con conseguente sviluppo di osteopenia (68): una situazione analoga si ritrova in corso di CRPS-I, dove l'immobilizzazione dell'arto affetto è un frequente riscontro clinico e l'osteopenia regionale è documentabile nelle fasi di malattia più avanzate. Studi recenti su modelli animali hanno dimostrato inoltre che la sola immobilizzazione dell'arto è in grado di indurre quadri di CRPS-I analoghi a quelli che si possono ottenere tramite frattura (52) e che lo scarico articolare determina l'insorgenza di dolore associato ad acidosi locale nell'ambito di un'osteoporosi regionale (53).

La dimostrazione di un ruolo di DKK-1 e SOST nella regolazione del metabolismo scheletrico è un'acquisizione relativamente recente. Nei primi anni del 2000 infatti alcuni ricercatori identificarono una mutazione condizionante una perdita di funzione del gene che codifica per SOST in pazienti affetti da sclerosteosi, una rara patologia ereditaria autosomica recessiva caratterizzata da un'eccessiva crescita e densità del tessuto osseo, che condiziona una serie di segni e sintomi scheletrici (69). Poco dopo un'altra mutazione inattivante lo stesso gene fu identificata nei pazienti affetti da malattia di Van Buchem, un'altra forma di displasia sclerosante dell'osso a trasmissione ereditaria (70). Queste scoperte diedero avvio allo studio di SOST e del sistema Wnt come importante regolatore del metabolismo dell'osso (71).

Il sistema Wnt rappresenta una delle principali vie di regolazione della neoformazione ossea, promuovendo la differenziazione delle cellule mesenchimali in osteoblasti e inibendo il riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti (72). SOST e DKK-1 sono stati identificati come fondamentali inibitori del sistema

Wnt e a vario titolo la loro azione è stata chiamata in causa in patologie caratterizzate da una ridotta densità ossea a livello sistemico (come ad esempio l'osteoporosi) e locale (come ad esempio l'artrite reumatoide). Addirittura negli ultimi anni tali mediatori sono stati utilizzati come target di terapie per l'osteoporosi: l'utilizzo di anticorpi diretti contro SOST si è dimostrato efficace nell'incrementare i valori di densità minerale ossea e nel ridurre il rischio di fratture in pazienti affetti da osteoporosi (73, 74).

Mentre DKK-1 sembrerebbe essere espresso in diversi tessuti e secreto da diversi tipi di cellule, come osteociti ed osteoblasti, SOST è prodotta principalmente dagli osteociti, anche se dati più recenti suggeriscono che in circostanze particolari possa essere prodotta anche da cellule diverse, come i condrociti o i sinoviociti in corso di artrite reumatoide (75). In ogni caso SOST sembrerebbe agire in modo più selettivo rispetto a DKK-1 sul rimodellamento scheletrico (76); tuttavia ad oggi il differente ruolo dei due inibitori non è chiaramente stabilito e le due molecole mostrano un andamento talvolta differente nelle patologie in cui sono state dosate (77, 78).

Dal momento che gli osteociti rappresentano i principali "meccanocettori" dell'osso, la produzione di SOST è fortemente condizionata dal carico: in condizioni di immobilizzazione e scarico articolare, SOST risulta iperespressa, mentre la ripresa del carico in modelli sperimentali ne condiziona l'immediata riduzione (68). Anche altri elementi regolano l'espressione di SOST e DKK-1, come ad esempio gli estrogeni, il PTH e alcune citochine pro-infiammatorie (76).

Un'altra molecola per la quale è ipotizzabile un ruolo nella patogenesi della sintomatologia legata alla CRPS-I (in particolare nella mediazione del dolore, che è il sintomo cardine di questa entità clinica) è il Nerve Growth Factor (NGF). L'incrementata espressione tissutale di questo mediatore nelle fasi precoci di malattia è stata dimostrata in modelli animali (50) e l'utilizzo di anticorpi anti-NGF nei topi con CRPS-I si associa alla riduzione della sintomatologia dolorosa nelle forme acute (23). Inoltre un recente studio su modelli animali di CRPS-I ha

dimostrato che i bisfosfonati, trattamento di provata efficacia nell'uomo, sono in grado di ridurre significativamente l'espressione tissutale di NGF, parallelamente al miglioramento delle alterazioni nocicettive legate alla malattia (57). Tuttavia non sono disponibili ad oggi dati sull'uomo riguardanti il ruolo di NGF in corso di CRPS-I, anche se un possibile coinvolgimento di tale mediatore nella patogenesi del dolore che caratterizza questa sindrome potrebbe essere desunto indirettamente dall'osservazione che anticorpi diretti contro NGF si sono dimostrati efficaci clinicamente nel ridurre il dolore legato all'artrosi (79), dove, in corso di poussée dolorosa acuta, si possono riscontrare alcune caratteristiche analoghe alla CRPS-I (come il dolore acuto, l'edema osseo locale e la risposta clinica al trattamento con bisfosfonati endovenosi (80)).

## CAPITOLO 2: OBIETTIVO DELLO STUDIO

Obiettivo del nostro studio è stato quello di approfondire il ruolo del tessuto osseo in corso di CRPS-I. A questo scopo, la nostra ricerca si è svolta in due fasi, retrospettiva e trasversale.

Nella fase retrospettiva abbiamo voluto indagare l'impatto del trattamento con i bisfosfonati in una casistica real-life di pazienti affetti da CRPS-I. Se infatti l'evidenza globale derivante dai trial randomizzati e controllati effettuati contro placebo è sufficiente per stabilire l'efficacia del trattamento con bisfosfonati nella CRPS-I (43), mancano studi che ne valutino l'*effectiveness* nella pratica clinica: l'inclusione di pazienti selezionati con criteri specifici (quali per esempio la breve durata di malattia o la presenza di ipercaptazione del tracciante alla scintigrafia ossea) può limitare la generalizzabilità dei risultati alla popolazione afferente agli ambulatori nella realtà clinica quotidiana. Inoltre non è chiaro se esistano sottogruppi di pazienti che possano beneficiare maggiormente dal trattamento con bisfosfonati rispetto ad altri.

Sulla base di tali considerazioni, scopo della prima fase del nostro studio è stato quello di analizzare retrospettivamente i dati dei pazienti affetti da CRPS-I afferenti ad un centro reumatologico terziario per il trattamento con bisfosfonati endovenosi, per valutare l'impatto di variabili legate al paziente o alla malattia sulla risposta al trattamento.

Nella fase trasversale dello studio invece abbiamo voluto valutare a scopo esplorativo la concentrazione plasmatica di SOST, DKK-1 e NGF in pazienti affetti da CRPS-I. Al fine di verificarne un'eventuale differente espressione locale, la concentrazione dei mediatori è stata dosata su sangue refluo dall'arto affetto e confrontata con quella su sangue refluo dall'arto non affetto. Inoltre è stato effettuato un confronto tra la concentrazione plasmatica di tali molecole nei soggetti affetti da CRPS-I e quella in un'analogha popolazione di controlli sani, per evidenziarne un'eventuale alterazione sistemica.

## CAPITOLO 3: METODI

Nella fase retrospettiva dello studio è stata effettuata una valutazione dei dati dei pazienti affetti da CRPS-I afferenti al Day Hospital di Reumatologia dell'Istituto Ortopedico Gaetano Pini di Milano per il trattamento con bisfosfonati endovenosi dal gennaio 2009 al dicembre 2013. I pazienti sono stati identificati nel database amministrativo dell'ospedale tramite codice SDO corrispondente alla diagnosi di CRPS-I e/o tramite ricerca con testo libero corrispondente a “sindrome algodistrofica” o a suoi sinonimi.

Tutte le cartelle cliniche sono state riviste per valutare la correttezza della diagnosi e la completezza delle informazioni. In una prima fase sono stati esclusi tutti i pazienti con una diagnosi potenzialmente diversa da quella di CRPS-I, come per esempio osteoporosi regionale migrante, edema midollare post traumatico, o altre. Tra i soggetti rimanenti, sono stati inclusi quelli i cui dati clinici registrati in cartella permettevano di confermare la presenza dei segni e sintomi necessari per confermare la diagnosi di CRPS-I secondo i criteri di Budapest del 2007 (17) e per i quali erano disponibili i dati clinici richiesti dallo studio.

Tutti i pazienti sono stati trattati con bisfosfonati endovenosi, secondo schemi differenti: dal gennaio 2009 all'aprile 2010 sono stati trattati con Clodronato e.v. al dosaggio di 300 mg per 10 giorni consecutivi (40); dal maggio 2010 all'agosto 2011 sono stati trattati con Pamidronato 60 mg per 4 infusioni ogni terzo giorno (42); dal settembre 2011 al dicembre 2013 con Neridronato 100 mg per 4 infusioni ogni terzo giorno (38). Al termine del trattamento con bisfosfonati, tutti i pazienti hanno effettuato una fisioterapia con lo scopo di migliorare la funzionalità dell'arto coinvolto dalla CRPS-I. Prima del trattamento sono stati effettuati esami di laboratorio estesi per escludere altre condizioni cliniche all'origine del dolore; nelle donne in età fertile il trattamento è stato effettuato previa valutazione della negatività del test di gravidanza. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato prima della terapia con bisfosfonati.

Per ogni paziente sono state raccolte le variabili demografiche e quelle legate alla malattia come la durata dei sintomi prima del trattamento, la localizzazione

della CRPS-I, l'eventuale occorrenza di eventi scatenanti e il tipo di trattamento effettuato. La valutazione della risposta al trattamento è stata effettuata a distanza media di 40 giorni dall'ultima infusione. Al paziente veniva richiesto di descrivere l'effetto del trattamento sul dolore, secondo un punteggio verbale di 4 punti (0 = nessuna risposta; 1 = lieve miglioramento del dolore; 2 = significativo miglioramento del dolore; 3 = ottimo miglioramento/assenza di dolore). La risposta clinica veniva definita in presenza di una risposta sul dolore  $\geq 2$  e in assenza di segni o sintomi diagnostici per CRPS-I secondo i criteri di Budapest (17).

Nella fase trasversale sono stati arruolati consecutivamente tutti i pazienti affetti da CRPS-I di mano, con diagnosi clinica formulata secondo i criteri IASP 2012 (1), afferenti presso il Day Hospital di Reumatologia per il trattamento con Neridronato endovenoso secondo lo schema utilizzato per questa patologia (4 infusioni di Neridronato da 100 mg ogni terzo giorno) (38). Il precedente trattamento con tale molecola per la patologia in studio è stato considerato motivo di esclusione dallo studio. L'inclusione di pazienti affetti solo da CRPS-I di mano è stata motivata dalla necessità di effettuare un prelievo su sangue refluo dal lato affetto per effettuare un confronto con il controlaterale.

Per ogni paziente sono state raccolte le variabili demografiche e cliniche relative alle comorbidità e ai trattamenti concomitanti. Riguardo alla CRPS-I, sono stati raccolti i dati relativi alla sede di malattia, ai segni e sintomi inclusi nei criteri classificativi presenti al momento della valutazione, alla data di esordio dei sintomi, alla data di diagnosi, all'eventuale evento predisponente, agli accertamenti strumentali inerenti la patologia effettuati in fase diagnostica, al pregresso utilizzo di terapie fisiche (fiosiochinesiterapia, magnetoterapia o altro) e al trattamento con farmaci sintomatici o con bisfosfonati (con molecole differenti dal Neridronato). Inoltre è stata valutata al momento della visita l'intensità del dolore su scala analogica visiva (VAS 0-100). È stata infine effettuata una valutazione anamnestica della storia di osteoporosi, della presenza di familiarità per osteoporosi e della storia di precedenti fratture; qualora indicato per la

presenza di fattori di rischio, è stata effettuata una valutazione densitometrica lombare e femorale con metodica DXA (Hologic 4500 Waltham, CA), o sono stati raccolti i dati relativi a valutazioni densitometriche già eseguite dal paziente nei precedenti 24 mesi.

Previo consenso informato, è stato effettuato al paziente un prelievo di sangue venoso refluo dall'arto affetto e dall'arto non affetto a livello della vena brachiale. Per ogni paziente sono state raccolte due provette di sangue venoso da 5 ml, una per lato. Il campione ematico è stato successivamente processato e centrifugato alla velocità di 3000 rotazioni per minuto per 15 minuti, quindi il surnatante (siero) è stato trasferito in appositi criovials che sono stati stoccati e conservati a temperatura inferiore a -20°C.

Come popolazione di confronto, sono stati inclusi un ugual numero di controlli non affetti da CRPS-I né da altre patologie note del tessuto osseo, con uguale distribuzione di età e sesso rispetto ai pazienti inclusi. Previo consenso informato, è stato effettuato ad ognuno di essi un prelievo di sangue venoso refluo dall'arto superiore. I campioni di siero sono stati raccolti, processati e conservati a temperatura controllata, come precedentemente descritto.

Sui campioni raccolti è stato effettuato il dosaggio in cieco della concentrazione di SOST e DKK-1 tramite ELISA (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co Kg, Wien, Austria) e il dosaggio di  $\beta$ -NGF umano tramite kit ELISA (RayBio, Norcross, GA).

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico locale.

### ***Analisi statistica***

Nell'analisi dei dati relativi alla fase retrospettiva dello studio, le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti inclusi sono state presentate in termini descrittivi come media (deviazione standard, DS), mediana (intervallo interquartile, IQR) e numerosità (frequenza), in base alle caratteristiche e alla distribuzione di normalità delle variabili utilizzate. Il confronto tra le variabili cliniche dei pazienti con e senza risposta al trattamento è stato effettuato tramite

test T di Student per variabili indipendenti, o test di Mann-Whitney, a seconda della distribuzione delle variabili.

Per valutare l'impatto delle diverse variabili cliniche sulla risposta al trattamento con bisfosfonati è stata effettuata un'analisi di regressione logistica. Sono state incluse nel modello le variabili che sono risultate statisticamente differenti tra pazienti con e senza risposta clinica all'analisi univariata, oltre ad altre variabili potenzialmente in grado di influenzare la risposta al trattamento come età, sesso e localizzazione della CRPS-I; sono stati inclusi nel modello anche i diversi bisfosfonati endovenosi utilizzati.

La fase trasversale dello studio ha incluso a scopo esplorativo 17 pazienti e, come popolazione di controllo, un ugual numero di soggetti sani, appaiati per età e sesso. Non essendo disponibili in letteratura dati sulla concentrazione sierica di SOST, DKK-1 o NGF in corso di CRPS-I, in assenza di valori di riferimento (media e deviazione standard) non è stato possibile effettuare un calcolo formale della numerosità campionaria.

Le caratteristiche cliniche e demografiche relative ai pazienti inclusi sono state presentate in termini descrittivi come media (DS), mediana (IQR) e numerosità (frequenza), in base alle caratteristiche e alla distribuzione di normalità delle variabili utilizzate. Analogamente, le concentrazioni sieriche dei marker dosati sono state presentate utilizzando le opportune statistiche descrittive.

Il confronto tra la concentrazione dei marker dosati su siero proveniente dall'arto affetto e da quello non affetto è stato effettuato tramite test T di Student per variabili appaiate, o test di Wilcoxon per campioni appaiati, a seconda della distribuzione delle variabili. Il confronto tra la concentrazione sierica dei marker dosati nei pazienti affetti da CRPS-I e quella nei controlli sani è stato effettuato tramite test T di Student per campioni indipendenti, o test U di Mann-Whitney, a seconda della distribuzione delle variabili. Il *matching* per età e sesso tra casi e controlli non ha reso necessarie analisi multivariate per valutare l'impatto di



fattori confondenti sulla concentrazione sierica di tali mediatori, quali età e sesso. Le analisi esplorative sui pazienti affetti da CRPS-I per valutare l'impatto della durata di malattia sulla concentrazione sierica dei marker dosati sono state effettuate tramite test non parametrici, in considerazione dell'esiguità numerica e della distribuzione non normale delle variabili (test U di Mann-Whitney).

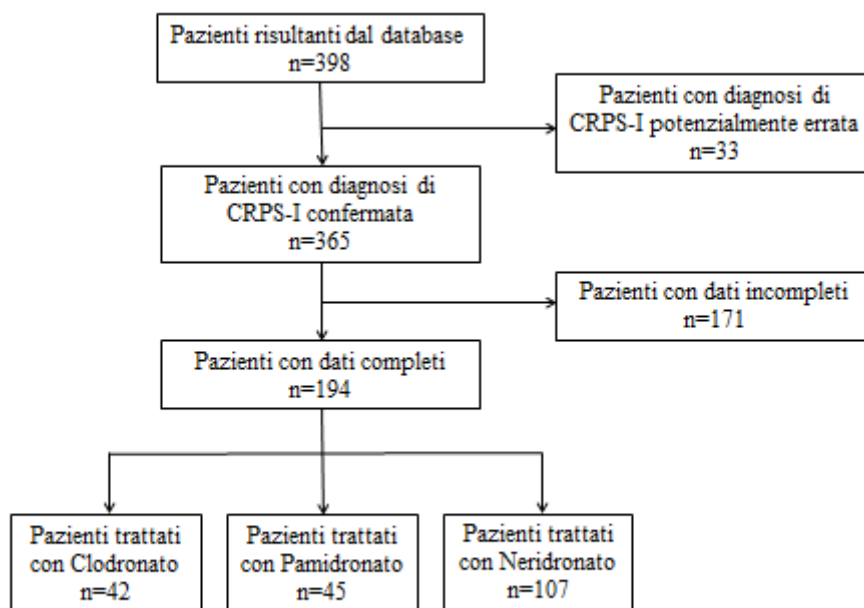
Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software SPSS versione 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## CAPITOLO 4: RISULTATI

### Predittori di risposta al trattamento con bisfosfonati nella CRPS-I

Il diagramma di flusso relativo alla selezione e inclusione dei pazienti nello studio, a partire dalle cartelle cliniche risultanti dalla ricerca sul database ospedaliero, è riportato in **Figura 1**.

**Figura 1. Diagramma di flusso dei pazienti inclusi nello studio.**



Le caratteristiche basali dei 194 pazienti affetti da CRPS-I inclusi nello studio sono riportate nella **Tabella 1**. L'età media alla diagnosi di CRPS-I era di 57,1 (DS: 12,9) anni, con una prevalenza di femmine (122: 62,9%). La durata mediana di malattia era di 4 (IQR: 2-6) mesi e l'arto inferiore era più frequentemente coinvolto di quello superiore (119 pazienti con CRPS-I di piede o caviglia: 61,3%).

**Tabella 1: Caratteristiche demografiche e cliniche al basale dei 194 pazienti con CRPS-I trattati con bisfosfonati**

<b>Caratteristiche basali</b>	
Età (anni), media (DS)	57,1 (12,9)
Sesso (maschi/femmine), n (%)	72 (37,1) / 122 (62,9)
Durata di malattia (mesi), mediana (IQR)	4 (2; 6)
Pregressa CRPS-I, n (%)	13 (6,7)
Localizzazione (mano/piede), n (%)	75 (38,7) / 119 (61,3)
Evento predisponente, n (%)	
- Frattura	83 (42,8)
- Trauma	43 (22,1)
- Intervento chirurgico	28 (14,4)
- Altro	11 (5,7)
- Non noto	29 (14,9)

CRPS-I: complex regional pain syndrome - type I; DS: deviazione standard; n: numero; IQR: range interquartilico.

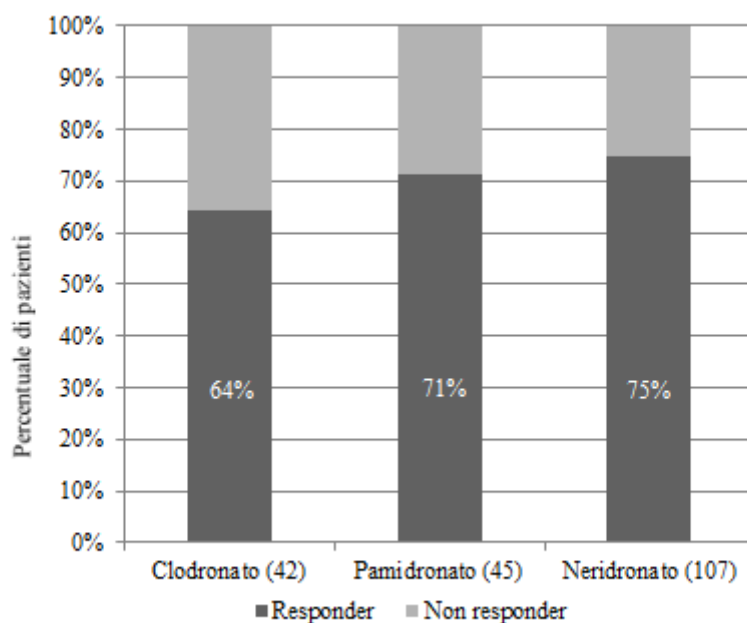
L'evento scatenante più frequentemente riportato era la frattura (83 pazienti: 42,8%), seguito da un trauma senza frattura, verificatosi in 43 pazienti (22,1%). In 28 pazienti (14,4%) l'evento precipitante era rappresentato da un intervento chirurgico, mentre per 11 pazienti (5,7%) venivano riportate altre condizioni patologiche (infarto miocardico, emiparesi, herpes zoster, etc.). In 29 casi (14,9%) non è stato identificato alcun evento precipitante.

In 142 pazienti la fase della CRPS-I era descritta come “calda” al momento del trattamento, in 31 casi come “fredda”, mentre in 21 casi non era riportata in cartella una descrizione della fase di malattia. Nei pazienti in fase “fredda” di malattia si osservava una maggior durata di malattia [durata mediana di 5 (IQR: 4; 8) mesi nella fase “fredda” rispetto a 3 (IQR: 2; 5) mesi nella fase “calda”].

Riguardo al tipo di molecola utilizzato per il trattamento endovenoso con bisfosfonati, 42 pazienti (21,6%) sono stati trattati con Clodronato, 45 pazienti (23,2%) sono stati trattati con Pamidronato e 107 pazienti (55,2%) con Neridronato.

Globalmente 139 pazienti (71,6%) hanno risposto al trattamento. La percentuale di pazienti con buona risposta alla terapia era di 64% (27 pazienti) per il Clodronato, 71% (32 pazienti) per il Pamidronato e 75% (80 pazienti) per il Neridronato (Figura 2). Il confronto tra i tre diversi regimi di trattamento non ha mostrato tuttavia una differenza statisticamente significativa ( $p=0.27$ ) (Figura 2).

**Figura 2. Percentuale di risposta clinica al trattamento con i diversi tipi di bisfosfonati (Clodronato, Pamidronato e Neridronato)**



**Tabella 2: Confronto tra i pazienti con CRPS-I che hanno risposto e che non hanno risposto al trattamento con bisfosfonati**

	<b>Risposta clinica (n=139)</b>	<b>Non risposta (n=55)</b>	<b>P</b>
Età (anni), media (DS)	57,3 (12,3)	56,5 (14,3)	0,698
Sesso (femmine), n (%)	89 (64%)	33 (60%)	0,601
Durata di malattia (mesi), mediana (IQR)	3 (2; 5)	5 (3; 8)	0,000
Localizzazione (piede), n (%)	83 (59,7%)	36 (65,5%)	0,459
Forma “calda”, n (%)	117 (84,2%)	35 (63,6%)	0,003
Evento predisponente, n (%)			
- Frattura	69 (49,6%)	14 (25,4%)	0,002*
- Trauma	27 (19,4%)	16 (29,1%)	
- Intervento chirurgico	16 (11,5%)	12 (21,8%)	
- Altro	7 (5,1%)	4 (7,3%)	
- Non noto	20 (14,4%)	9 (16,4%)	

CRPS-I: complex regional pain syndrome - type I; DS: deviazione standard; n: numero; IQR: range interquartilico; NA: non applicabile.

\*confronto tra pazienti con frattura come evento predisponente rispetto alle altre cause, nei due gruppi

Il confronto riguardo alle diverse variabili cliniche tra i pazienti con e senza risposta al trattamento con bisfosfonati endovenosi è riportato nella **Tabella 2**.

Solo per 107 soggetti era disponibile l'esito della scintigrafia ossea: tra i 73 pazienti con una franca ipercaptazione del tracciante in sede di CRPS-I la risposta al trattamento era del 100%, mentre tra coloro che avevano un risultato dubbio o negativo la risposta era del 79,4% (27/34 pazienti).

Nella **Tabella 3** sono riportati i risultati dell'analisi di regressione logistica per identificare i predittori di risposta al trattamento. Una minore durata di malattia, la presenza di una forma "calda" di malattia e una frattura come evento predisponente risultavano significativamente associati ad una maggiore probabilità di risposta al trattamento. Al contrario l'età, il sesso, la localizzazione di malattia e il tipo di bisfosfonati utilizzato non influenzavano significativamente la probabilità di risposta alla terapia.

Dall'analisi delle cartelle cliniche non sono emersi eventi avversi seri legati al trattamento (osteonecrosi della mandibola o fratture atipiche). In sei pazienti trattati con Clodronato era riportata una transitoria modesta ipocalcemia non associata a segni clinici. L'evento avverso più frequentemente osservato nei pazienti trattati con amino-bisfosfonati (Pamidronato e Neridronato) era una reazione di fase acuta caratterizzata da febbre e/o poliartalgie, riportata in 16 pazienti trattati con Pamidronato (35,5%) e 32 pazienti trattati con Neridronato (29,9%). Un paziente trattato con Neridronato ha sviluppato un'uveite anteriore acuta, risoltasi con un trattamento topico senza sequele.

**Tabella 3: Analisi di regressione logistica per i predittori di risposta al trattamento con bisfosfonati in 194 pazienti con CRPS-I**

	<b>Odds Ratio</b>	<b>Intervallo di confidenza 95%</b>	<b>p</b>
Età (anni)	0,99	0,96 – 1,03	0,669
Sesso (femminile vs maschile)	1,11	0,51 – 2,44	0,786
Durata di malattia (mesi)	0,84	0,72 – 0,98	0,023
Localizzazione (piede vs mano)	1,71	0,67 – 4,36	0,259
Forma (“calda” vs “fredda”)	5,07	1,59 – 16,19	0,006
Evento predisponente (frattura vs altri)	3,24	1,29 – 8,11	0,012
Tipo di bisfosfonato:			
- Clodronato	1 (rif.)		0,237
- Pamidronato	2,02	0,63 – 6,44	0,235
- Neridronato	2,15	0,87 – 5,33	0,098

CRPS-I: complex regional pain syndrome - type I

## Valutazione esplorativa della concentrazione sierica di SOST, DKK-1 e NGF in corso di CRPS-I

Sono stati inclusi 17 pazienti affetti da CRPS-I di mano ed un ugual numero di controlli, appaiati per età e sesso.

**Tabella 1: Caratteristiche demografiche e cliniche dei 17 pazienti con CRPS-I**

<b>Caratteristiche dei pazienti</b>	
Età (anni), media (DS)	60,3 (9,7)
Sesso (maschi/femmine), n (%)	5 (29,4) / 12 (70,6)
Durata di malattia (mesi), mediana (IQR)	2 (1; 3)
Pregressa CRPS-I, n (%)	3 (17,6)
Localizzazione (mano destra/sinistra), n (%)	10 (58,8) / 7 (41,2)
Evento predisponente, n (%)	
- Frattura	10 (58,8)
- Trauma	1 (5,9)
- Intervento chirurgico in seguito a frattura	5 (29,4)
- Non noto	1 (5,9)

CRPS-I: complex regional pain syndrome - type I; DS: deviazione standard; n: numero; IQR: range interquartilico.

L'età media dei pazienti inclusi era di 60,3 (DS: 9,7) anni, con una distribuzione maschi: femmine di 5:12. In 10 pazienti la CRPS-I interessava la



mano destra e in 7 la mano sinistra; 3 pazienti riportavano in anamnesi un precedente episodio di CRPS-I (due di mano e uno di piede). La durata mediana dei sintomi prima di iniziare il trattamento con Neridronato era di 2 mesi (IQR: 1; 3): tutti i pazienti arruolati si trovavano in una fase precoce di malattia, ovvero con durata dei sintomi uguale o inferiore ai 6 mesi e con caratteristiche cliniche evocative per una patologia non ancora evoluta in fase cronica.

L'evento predisponente era rappresentato da una frattura all'arto superiore in 10 pazienti, in 5 pazienti da una frattura seguita da intervento chirurgico e in un paziente da un trauma con distorsione ma senza frattura; in un caso non è stato possibile identificare nessun evento scatenante.

Riguardo ai precedenti trattamenti, 11 pazienti avevano effettuato terapie fisiche, mentre solo 1 paziente aveva effettuato un trattamento farmacologico specifico per la CRPS con farmaco non analgesico (Clodronato intramuscolare).

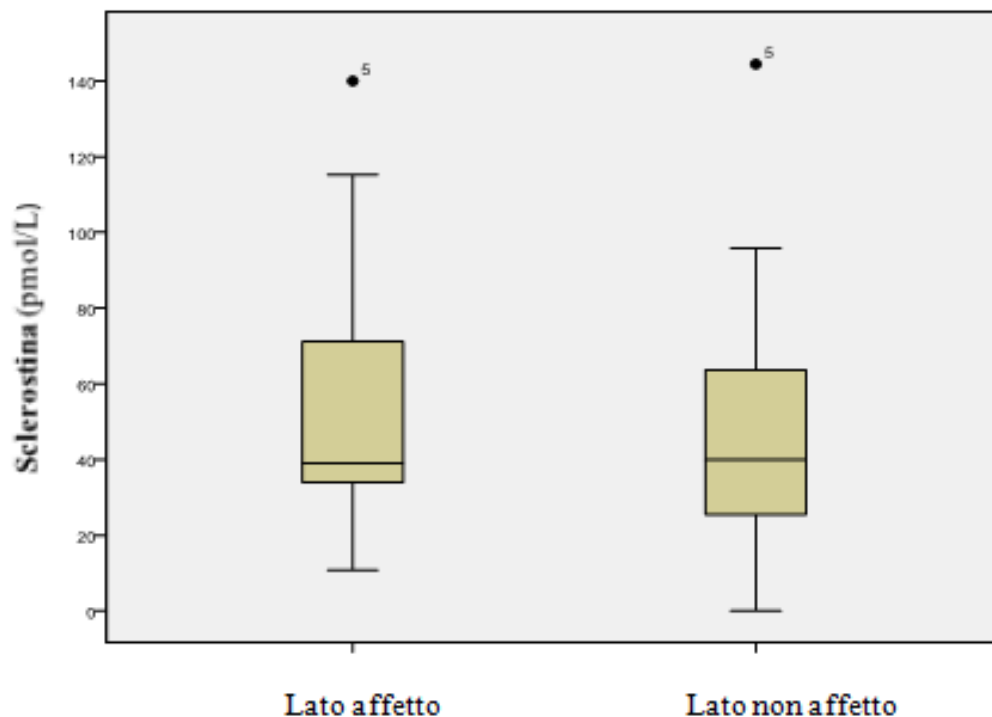
Tra le comorbidità riportate vi erano: carcinoma della mammella, depressione e ipertensione arteriosa (in 3 pazienti); gastrite e diabete mellito di tipo II (in 2 pazienti); pregressa embolia polmonare, asma e ipotiroidismo (in 1 paziente). Delle 12 donne incluse, 10 erano in menopausa e 4 di esse riportavano una storia di precedenti fratture (3 fratture di Colles, una frattura vertebrale e una frattura in altra sede); solo una paziente presentava valori densitometrici nel range dell'osteoporosi (T score inferiore a -2,5 sia a livello lombare che femorale).

Al momento della valutazione clinica, tutti i pazienti presentavano segni e sintomi adeguati a formulare una diagnosi di CRPS-I secondo i criteri IASP 2012 (1); l'intensità media del dolore riferito, misurato tramite VAS 0-100 mm era di 57 (DS: 16) mm. La maggior parte dei soggetti, ovvero 15 pazienti, si presentava in una fase "calda" di malattia con edema locale, incremento del termotatto e rossore cutaneo, mentre in due pazienti si osservava una fase "fredda" di malattia, caratterizzata da ipotermia e assenza di segni locali di flogosi.

Confrontando la concentrazione sierica di SOST su sangue refluo dall'arto affetto con quella su sangue proveniente dall'arto non affetto, si osservava una concentrazione media non significativamente superiore dal lato della CRPS-I [54

(SD 34) pmol/L] rispetto al controlaterale [48,6 (SD 34,8) pmol/L;  $p=0,265$ ] (**Figura 1**); la correlazione tra i valori nei due lati risultava significativamente elevata (R di Pearson=0,845;  $p=0,000$ ).

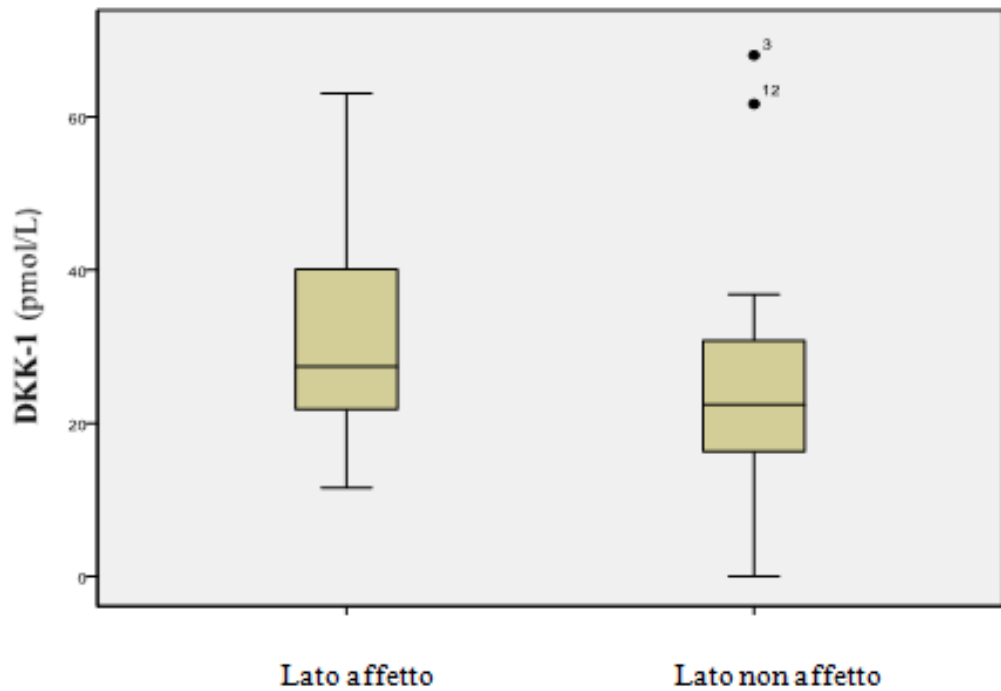
**Figura 1. Confronto tra la concentrazione sierica di Sclerostina su sangue refluo dal lato affetto rispetto al lato controlaterale in 17 pazienti con CRPS-I**



Il confronto tra lato affetto e non affetto per DKK-1 evidenziava invece una concentrazione media significativamente superiore dal lato della CRPS-I [31,5 (SD: 14,7) pmol/L] rispetto al controlaterale [25,9 (SD: 17,1) pmol/L;  $p=0,018$ ]

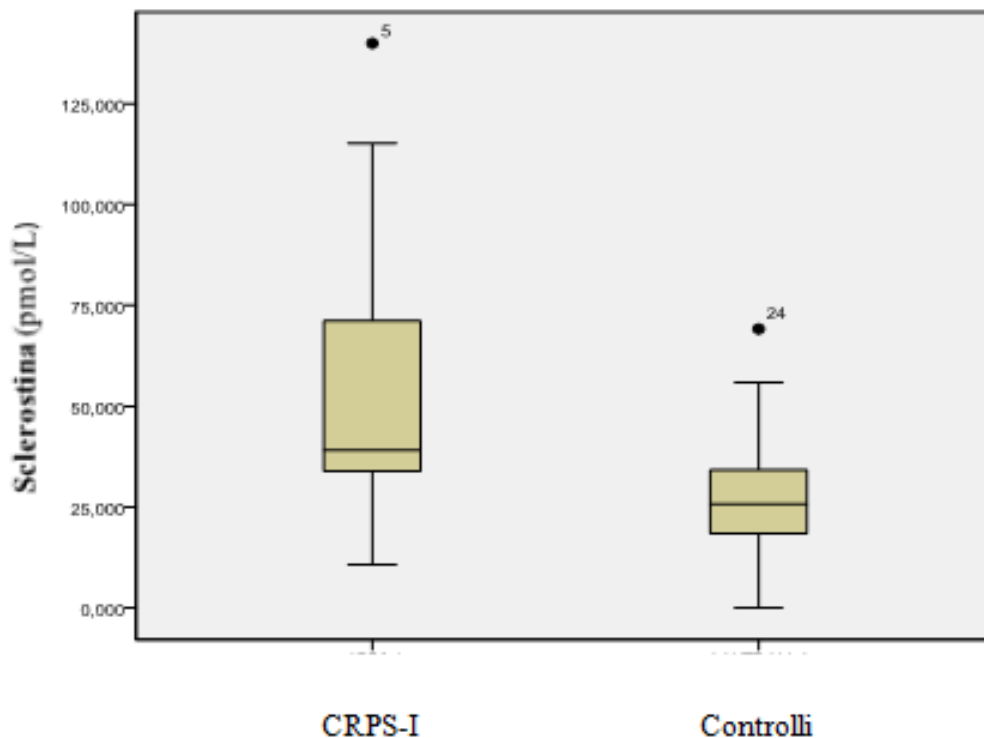
(Figura 2); anche per DKK-1 si osservava una significativa correlazione tra le concentrazioni nei due lati ( $R=0,683$ ;  $p=0,000$ ).

**Figura 2. Confronto tra la concentrazione sierica di DKK-1 su sangue refluo dal lato affetto rispetto al lato controlaterale in 17 pazienti con CRPS-I**



Quando la concentrazione media di SOST su sangue refluo dall'arto affetto nei pazienti con CRPS-I è stata confrontata con quella di un gruppo di controllo di pari età e sesso, nei pazienti affetti da CRPS-I la concentrazione sierica di SOST risultava significativamente superiore al gruppo di controllo [54 (SD: 34) pmol/l rispetto a 27,8 (SD:17,3) pmol/L;  $p=0,009$ ] (**Figura 3**). Analoghi risultati si osservavano confrontando con i controlli sani il livello sierico di SOST dal lato non affetto ( $p=0,037$ ) e il valore medio di concentrazione tra lato affetto e non affetto ( $p=0,016$ ).

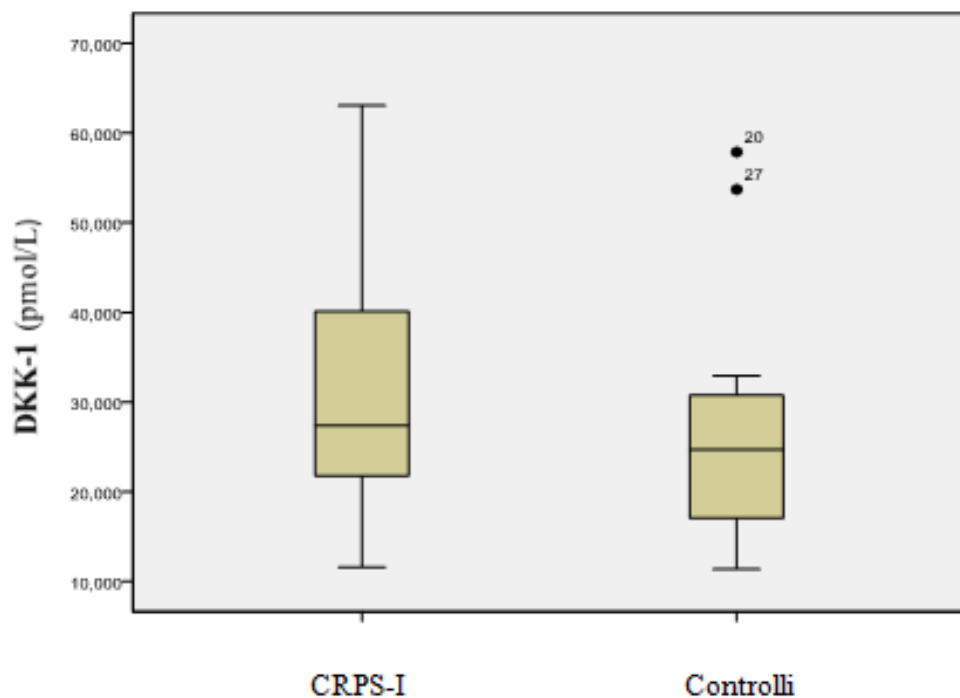
**Figura 3. Confronto tra la concentrazione sierica di Sclerostina su sangue refluo dall'arto affetto in 17 pazienti affetti da CRPS-I rispetto ai valori sierici di 17 controlli sani, appaiati per età e sesso.**



Al contrario, la concentrazione sierica media di DKK-1 su sangue refluo dall'arto affetto nei pazienti con CRPS-I non risultava significativamente

superiore a quella dei controlli sani [31,5 (SD: 14,7) pmol/L rispetto a 26,5 (SD:13) pmol/L;  $p=0,303$ ] (**Figura 4**), così come non si osservavano differenze significative quando il confronto veniva effettuato considerando la concentrazione sierica dal lato non affetto ( $p=0,917$ ) e la concentrazione media tra i due lati ( $p=0,653$ ).

**Figura 4. Confronto tra la concentrazione sierica di DKK-1 su sangue refluo dall'arto affetto in 17 pazienti affetti da CRPS-I rispetto ai valori sierici di 17 controlli sani, appaiati per età e sesso.**



Stratificando i risultati in base alla durata dei sintomi prima del trattamento, i valori mediani di SOST e DKK-1 non risultavano significativamente differenti tra i pazienti con durata di malattia inferiore ai 3 mesi (12 pazienti) e quelli con durata superiore (5 pazienti;  $p=0,399$  per SOST e  $p=0,171$  per DKK-1).

Per quanto concerne la valutazione esplorativa della concentrazione di NGF, tale mediatore è risultato dosabile solo in 9 pazienti e in 2 controlli. Non è stata osservata una differenza significativa di concentrazione tra lato affetto e non affetto né tra pazienti e controlli, ma la numerosità dei pazienti su cui è stato possibile effettuare il confronto è risultata estremamente ridotta. Per lo stesso motivo non è stato possibile valutare la concentrazione di NGF, stratificata per la durata dei sintomi.

## CAPITOLO 5: DISCUSSIONE

Sebbene la Complex Regional Pain Syndrome type I (CRPS-I) sia stata considerata per anni una malattia “orfana” per l’assenza di trattamenti con efficacia consolidata, l’utilizzo dei bisfosfonati negli ultimi decenni ha significativamente modificato la prognosi dei pazienti, che senza terapia possono andare incontro a dolore cronico e disabilità permanente.

A partire dai dati di efficacia riguardanti il trattamento con bisfosfonati nella CRPS-I riportati in diversi *trial* randomizzati e controllati (43), abbiamo voluto indagare quale fosse l’impatto di tale terapia nella *real life* e se fosse possibile individuare dei fattori prognostici di risposta al trattamento (81). La prima fase del nostro lavoro ci ha quindi permesso di osservare in un’ampia coorte di pazienti con CRPS-I candidati al trattamento con bisfosfonati endovenosi (Clodronato, Pamidronato e Neridronato) che la precocità dell’intervento terapeutico e il suo utilizzo nelle forme “calde”, ovvero in presenza di segni di flogosi quali quelli che si osservano nelle fasi iniziali della malattia, si associava ad una migliore risposta al trattamento con bisfosfonati. Inoltre i pazienti che sviluppavano la CRPS-I in seguito a frattura rispondevano più frequentemente a tale terapia infusiva. Queste osservazioni ci hanno portato a ipotizzare che il trattamento con bisfosfonati possa essere più efficace nelle fasi precoci di malattia e che possa esistere un *subset* di pazienti con maggiore probabilità di risposta alla terapia, rappresentato da quelli con un prevalente interessamento osseo.

Il campione di pazienti incluso nella fase retrospettiva del nostro studio mostra caratteristiche simili a quello del più ampio studio epidemiologico sulla CRPS-I, condotto in Olanda (12), suggerendo che la nostra popolazione sia rappresentativa di quella normalmente valutata nella pratica clinica, se si esclude la durata di malattia relativamente breve osservata nel nostro campione: questa verosimilmente può essere ricondotta alle caratteristiche del reparto in cui è stato condotto lo studio, tra i centri italiani con maggiore esperienza nella diagnosi e nel trattamento di tale patologia. La percentuale di risposta al trattamento con bisfosfonati endovenosi osservata nel nostro studio (71,6%) risulta simile a quella

descritta nel principale trial randomizzato controllato contro placebo sull'utilizzo di Neridronato nella CRPS-I (38): questo riscontro suggerisce che la risposta al trattamento con bisfosfonati endovenosi nella pratica clinica possa essere sovrapponibile a quella osservata in studi dedicati in popolazioni selezionate.

Ad oggi il ruolo del trattamento con bisfosfonati nella CRPS-I è ancora dibattuto, come evidenziato dal grande numero di meta-analisi, revisioni e linee guida ad oggi pubblicate: mentre alcune di queste identificano i bisfosfonati come trattamento di scelta per la CRPS-I per il maggior livello di evidenza di efficacia rispetto ad altri interventi finora testati, altre ne suggeriscono l'utilizzo solo in pazienti con chiaro coinvolgimento osseo, sebbene la valutazione strumentale non sia inclusa nei criteri diagnostici per la CRPS-I attualmente utilizzati (1).

L'evidenza di un coinvolgimento dell'osso, suggerita dall'ipercapatizzazione locale del tracciante alla scintigrafia ossea, dall'osteoporosi locale alla radiografia e dall'edema osseo alla Risonanza Magnetica che si osservano frequentemente in corso di tale sindrome, è stato il razionale storico dell'utilizzo dei bisfosfonati nei pazienti con CRPS-I. Nel nostro studio retrospettivo non è stato possibile valutare in tutti i pazienti quali accertamenti strumentali siano stati effettuati e con quale esito, sebbene per alcuni di essi sia stata riportata in cartella la positività dell'esame scintigrafico: è interessante notare che in questi pazienti la percentuale di risposta al trattamento con bisfosfonati sia risultata del 100%, suggerendo che questo esame possa individuare i pazienti con maggiore probabilità di risposta al trattamento. Inoltre la più frequente risposta alla terapia in pazienti con una frattura come evento precipitante, potrebbe suggerire una maggiore efficacia della terapia con bisfosfonati endovenosi in un sottogruppo di pazienti con maggiore coinvolgimento del tessuto osseo.

I risultati del nostro studio suggeriscono inoltre che il trattamento con bisfosfonati endovenosi possa essere più efficace nelle forme acute, di breve durata e con manifestazioni infiammatorie associate. Questa osservazione potrebbe trovare un razionale nei modelli animali di CRPS-I indotta da frattura, in cui si osserva nelle fasi precoci di malattia un'incrementata espressione di citochine infiammatorie, neuropeptidi e Nerve Growth Factor (NGF) (47). In un



recente studio sperimentale il trattamento con bisfosfonati in modelli murini di CRPS-I era in grado di inibire non solo la perdita ossea locale, ma anche il dolore e i segni locali di flogosi (57). Questo modello potrebbe rispecchiare quanto accade in vivo nell'uomo in corso di CRPS-I, dove i bisfosfonati somministrati ad alto dosaggio per via endovenosa riescono a raggiungere elevate concentrazioni locali che permetterebbero loro di espletare non solo il noto effetto di inibizione del riassorbimento sul tessuto osseo, ma anche un'azione antiflogistica e di inibizione dell'NGF (45). Infatti, come dimostrato dall'iper captazione locale del tracciante alla scintigrafia ossea che si osserva precocemente in corso di CRPS-I, in questa fase i bisfosfonati possono raggiungere un'elevata concentrazione locale in sede di malattia, grazie alla quale possono esercitare un effetto citotossico sulle cellule infiammatorie (60, 61), con una conseguente riduzione del rilascio di neuropeptidi quali il calcitonin gene-related peptide e la sostanza P (47) e inibizione dell'espressione locale dell'NGF da parte dei macrofagi (50). L'osservazione in modelli animali di CRPS-I di una minore espressione flogistica locale e di un maggior coinvolgimento del sistema nervoso nelle fasi più avanzate di malattia potrebbe in parte giustificare un minore effetto di queste molecole nei pazienti con durata dei sintomi più prolungata (23).

Non è stata osservata una risposta statisticamente differente tra i diversi schemi terapeutici utilizzati, sebbene la percentuale di pazienti responsivi sia risultata superiore tra quelli trattati con Neridronato rispetto al Clodronato. Questo suggerisce che, più che il differente meccanismo di azione tra amino-bisfosfonati (Neridronato e Pamidronato) e bisfosfonati non aminati (Clodronato), il fattore determinante sia il dosaggio del bisfosfonato utilizzato. Infatti, considerando la potenza relativa e la via di somministrazione delle differenti molecole utilizzate negli studi randomizzati (43), tutti i bisfosfonati sembrerebbero efficaci, quando somministrati ad un dosaggio sufficiente per raggiungere l'*outcome* della terapia. Questo troverebbe una sua spiegazione nell'osservazione che i bisfosfonati esercitano un'azione antinocicettiva sull'osso e sul dolore infiammatorio e neuropatico che è dose-dipendente, sia in studi su modelli animali che in studi clinici (82).

Il disegno retrospettivo della prima fase del nostro studio presenta alcune limitazioni. Innanzitutto, la breve durata mediana di malattia dei pazienti inclusi non ci permette di escludere che la buona risposta al trattamento con bisfosfonati possa essere stata influenzata da un andamento naturalmente benigno della patologia; tuttavia i dati presenti in letteratura non ci permettono di stabilire quale sia il decorso spontaneo della CRPS-I, verso una piena guarigione piuttosto che verso una condizione di dolore permanente con disabilità funzionale (83), così come quali siano i fattori prognostici in grado di influenzare la storia della malattia (84). Inoltre la breve durata di malattia sembrerebbe essere associata ad un *outcome* terapeutico più favorevole con qualsiasi trattamento utilizzato (23), così come la forma “calda” di malattia tenderebbe a risolvere più facilmente di quella “fredda” (85). Tuttavia dei pazienti inclusi nello studio di Beerthuizen e colleghi che avevano sviluppato una CRPS-I in seguito a frattura in una coorte di 596 soggetti, nessuno presentava una guarigione completa dopo 12 mesi (86); nella nostra popolazione invece i pazienti con una frattura come evento precipitante presentavano più frequentemente una risposta al trattamento con bisfosfonati rispetto agli altri.

I risultati della fase retrospettiva del nostro studio, che confermano nella *real life* l'efficacia del trattamento con bisfosfonati e sembrano suggerire una maggiore risposta in pazienti con CRPS-I insorta in seguito a frattura, ci hanno spinto ad approfondire il possibile ruolo del tessuto osseo in corso di tale sindrome. A questo scopo, abbiamo voluto dosare alcuni biomarcatori del metabolismo osseo sul sangue refluo dall'arto affetto da CRPS-I, confrontando tale concentrazione con quella su sangue refluo dall'arto non affetto e con una popolazione di controlli sani. La nostra attenzione è stata focalizzata principalmente sugli inibitori del sistema Wnt, Sclerostina (SOST) e Dickkopf-1 (DKK-1), in quanto dati sperimentali ne indicano un incremento in seguito all'immobilizzazione, che costituisce un elemento comune ai pazienti con CRPS-I (52). Inoltre un aumento dell'attività di SOST e DKK-1 si associa ad un'inibizione della neoformazione ossea mediata da Wnt, che condiziona un quadro di osteoporosi, analogamente a

quello che si osserva a livello regionale in corso di CRPS-I (72). Infine, dati su modelli animali di artrite suggeriscono un'incrementata espressione locale di SOST e DKK-1 come conseguenza della flogosi (87, 88) ed una iperproduzione di citochine pro-infiammatorie è documentata a livello locale anche in corso di CRPS-I (49).

I risultati della fase trasversale del nostro studio hanno evidenziato una concentrazione di DKK-1 significativamente superiore su sangue refluo dall'arto affetto rispetto al controlaterale nei pazienti con CRPS-I, che però non è risultata statisticamente differente da quella dei controlli sani. Al contrario si sono osservati valori sierici di SOST significativamente più elevati nei pazienti affetti da CRPS-I rispetto ai controlli sani, senza tuttavia evidenziare una differenza significativa tra il lato affetto e il non affetto. Il dosaggio di NGF, effettuato a scopo esplorativo, non ha invece identificato differenze tra il lato affetto e quello non affetto, né rispetto ai controlli sani; occorre tuttavia sottolineare che tale mediatore è risultato dosabile in un numero molto limitato di soggetti, limitando fortemente la potenza della valutazione statistica.

Ad oggi non sono disponibili in letteratura dati sulla concentrazione degli inibitori del sistema Wnt, SOST e DKK-1, in corso di CRPS-I, né in modelli animali né sull'uomo. Tuttavia numerosi studi negli ultimi anni hanno dimostrato un possibile coinvolgimento di tali mediatori in diverse patologie caratterizzate da un coinvolgimento del sistema scheletrico o da un quadro di infiammazione locale.

Il riscontro di elevati livelli di SOST nei nostri pazienti potrebbe essere riconducibile in prima ipotesi all'immobilizzazione e allo scarico articolare dell'arto affetto in corso di CRPS-I; l'immobilizzazione infatti, principale stimolo alla liberazione di SOST, rappresenta una condizione predisponente allo sviluppo della sindrome (come per esempio nelle forme di CRPS-I in esiti di IMA o emiparesi) ed è utilizzata addirittura come meccanismo di induzione della CRPS-I in modelli animali (52).

Inoltre in uno studio su 79 pazienti con frattura di ossa lunghe è stato riportato un significativo incremento della concentrazione sierica di SOST in seguito a

frattura, rispetto a una popolazione di controllo; anche nella nostra casistica la maggior parte dei pazienti ha sviluppato la CRPS-I in seguito a una frattura, tuttavia mentre nello studio di Sarahrudi i livelli di SOST si riducevano progressivamente dopo le 8 settimane, nei nostri pazienti la concentrazione di SOST nei soggetti con durata dei sintomi superiore ai 2 mesi non è risultata significativamente differente da quella di pazienti con durata inferiore, suggerendo un mantenimento di livelli elevati di SOST in corso di CRPS-I (89). Il significato dell'incremento della concentrazione di SOST in seguito a frattura è comunque dibattuto: non è chiaro infatti se SOST possa avere un ruolo attivo nella riparazione fisiologica della frattura, dal momento che non si è osservata una differente concentrazione di questo mediatore nei pazienti con riparazione fisiologica da quelli con difetto di riparazione, o se la sua elevata concentrazione rappresenti solo un epifenomeno, essendo il risultato di un'augmentata produzione da parte dei condrociti durante il processo di formazione ossea intramembranosa ed endondrale a livello del callo osseo, oppure conseguenza dell'immobilizzazione dell'arto dovuta alla frattura. Studi su modelli animali infatti dimostrerebbero, al contrario dei dati riportati da Sarahrudi e colleghi, che l'inibizione di SOST determina una più rapida ed efficace riparazione della frattura (90, 91).

Un altro stimolo alla produzione di SOST potrebbe essere rappresentato dall'infiammazione locale, descritta in corso di CRPS-I (23, 49): studi su modelli animali di artrite hanno infatti dimostrato che, in corso di artrite indotta da  $TNF\alpha$ , vi è un incremento dell'espressione di SOST e che l'inibizione di SOST è in grado di ridurre la perdita ossea locale, anche se risulta inefficace sull'infiammazione; in base a questi studi si può ipotizzare quindi che l'inibizione del sistema Wnt da parte di SOST potrebbe essere all'origine della porosi locale e delle erosioni che si osservano in corso di artrite reumatoide come conseguenza della flogosi articolare (87). Tuttavia dati più recenti hanno evidenziato che l'inibizione di SOST in modelli murini di artrite indotta da  $TNF\alpha$  si associava ad un peggioramento della flogosi (75). Il ruolo di SOST rimane quindi controverso: è ipotizzabile che essa possa avere un effetto inibitorio sull'infiammazione mediata

da TNF $\alpha$  e che l'iperproduzione in corso di infiammazione possa costituire un tentativo di feedback negativo sulla flogosi.

Quale che sia la causa dell'incremento dei livelli di SOST osservato nei nostri pazienti con CRPS-I, è possibile ipotizzare che essa sia in grado di esercitare un'azione sul tessuto osseo localmente, inibendo la mineralizzazione ossea da parte degli osteoblasti (92). Questo potrebbe spiegare, almeno in parte, l'osservazione di una "osteoporosi maculata" sulla radiografia, come quella descritta inizialmente da Sudeck in pazienti affetti da CRPS-I di lunga durata e considerata una manifestazione tipica della malattia, in assenza di riscontri biochimici ed istologici evocativi per una perdita di massa ossea osteoclasto-mediata.

Certamente interessante è l'osservazione di livelli di DKK-1 più elevati su sangue refluo dall'arto affetto da CRPS-I rispetto al controlaterale, che può costituire un elemento a sostegno dell'ipotesi di un coinvolgimento osseo locale in corso di CRPS-I. In uno studio su un modello murino di artrite indotta da TNF $\alpha$  è stato dimostrato che il TNF $\alpha$  era in grado di indurre l'espressione locale di DKK-1 e, attraverso questo mediatore, quella di SOST; l'utilizzo di anticorpi neutralizzanti il DKK-1 era in grado di inibire la perdita ossea locale conseguente al processo infiammatorio (88). Possiamo pertanto ipotizzare che l'iperpressione locale di citochine infiammatorie in corso di CRPS-I (23) sia in grado di indurre la produzione di DKK-1 a livello locale con conseguente sviluppo di osteoporosi regionale, direttamente o tramite induzione di SOST.

Non è chiaro il motivo per cui nel nostro studio DKK-1 mostri livelli più elevati nel sangue refluo dall'arto affetto rispetto al controlaterale, mentre tale riscontro non si confermi per SOST; tuttavia un differente andamento dei due inibitori del sistema Wnt è già stato documentato in altri studi ed è ipotizzabile che queste molecole non abbiano la medesima funzione, svolgendo differenti ruoli nella comune inibizione del sistema Wnt (77, 78). La mancata osservazione di un'alterazione locale di SOST potrebbe anche essere dovuta ad un limite della metodologia utilizzata, che confrontava i dosaggi sierici su sangue refluo tra i due lati di un mediatore che, anche se potenzialmente prodotto a livello locale, può

rapidamente ridistribuirsi in circolo e quindi dare un segnale rilevabile solo a livello sistemico. Tuttavia l'utilizzo di metodiche di indagine più invasive, come per esempio l'esecuzione di biopsie ossee o cutanee nei pazienti affetti da CRPS-I, è di difficile attuazione per motivi etici in pazienti che a livello locale lamentano un'intensa sintomatologia dolorosa.

Per quanto riguarda NGF, nonostante il forte razionale di una sua valutazione basata sui ripetuti riscontri di un'elevata espressione del mediatore a livello locale in modelli sperimentali di CRPS-I (50), i livelli sierici da noi misurati non hanno mostrato un'associazione con il lato affetto o con la presenza di malattia. Tuttavia la valutazione statistica nel nostro campione è stata notevolmente inficiata dalla scarsa numerosità di pazienti in cui la concentrazione di NGF è risultata rilevabile. Inoltre l'elevato numero di campioni in cui il mediatore è risultato indosabile ci porta a ipotizzare che i livelli sierici di NGF siano estremamente ridotti o fugaci, o che vi sia un difetto di rilevazione del kit sperimentale da noi utilizzato, differente da quello impiegato nei pochi altri lavori in cui NGF è stato testato sull'uomo in differenti patologie (93). In un recente studio su modelli animali di CRPS-I inoltre è stato dimostrato che l'iperespressione locale di NGF è un evento molto precoce, non rilevabile nelle fasi avanzate di malattia, tanto che il trattamento sistemico con inibitori dell'NGF si associava ad una significativa riduzione del dolore solo a 4 settimane e non a 16 settimane dall'esordio di malattia (23): a questo proposito è importante sottolineare che nella nostra popolazione non vi erano pazienti con durata dei sintomi inferiore al mese.

L'originalità del nostro studio è rappresentata dal fatto che esso fornisce dati esplorativi sull'uomo riguardanti mediatori mai testati nella CRPS-I, ma con un potenziale ruolo nella patogenesi di alcuni aspetti della malattia. La valutazione dei pazienti in un centro dedicato, con provata esperienza nella gestione di questa patologia rara, fornisce maggiori garanzie sull'attendibilità della diagnosi dei soggetti reclutati, basata unicamente su dati clinici secondo i criteri diagnostici attualmente utilizzati (1). Inoltre il confronto con soggetti sani appaiati per età e sesso permette di eliminare i possibili bias nel confronto con la popolazione di riferimento, legati alla variabilità dei livelli sierici dei mediatori testati in diverse

fasce d'età e tra i diversi sessi (94). La metodica utilizzata per il dosaggio di SOST e DKK-1 inoltre è stata già testata in diversi studi, su popolazioni differenti (77). Tuttavia il disegno dello studio *cross-sectional* non ci ha permesso di valutare l'andamento nel singolo paziente dei diversi mediatori nel tempo, ma solo di effettuare un'unica valutazione trasversale della concentrazione e di stratificare i risultati in base alla durata dei sintomi. Inoltre l'inclusione nella nostra casistica di pazienti con interessamento unicamente dell'arto superiore non ci permette di stabilire se i nostri risultati possano essere estesi anche alle forme di CRPS-I dell'arto inferiore. Infine l'elevata percentuale di CRPS-I esordite in seguito a frattura nel nostro campione ci fa ipotizzare che i nostri pazienti appartengano ad un sottogruppo con prevalente interessamento del tessuto osseo, diversamente dai soggetti con esordio di malattia in seguito ad eventi di natura non traumatica (come ictus, infarto miocardico, infezioni) in cui la componente neurogena o legata a disturbi del microcircolo potrebbe prevalere da un punto di vista patogenetico.

## CAPITOLO 6: CONCLUSIONI

I risultati delle nostre osservazioni portano un ulteriore sostegno all'ipotesi di un coinvolgimento del tessuto osseo nella patogenesi della CRPS-I.

Sulla base dell'osservazione nella nostra casistica retrospettiva di una maggiore risposta alla terapia nei soggetti con precedente frattura, è ipotizzabile che possa esistere un sottogruppo di pazienti con un ruolo primario del tessuto osseo rispetto ad altri gruppi in cui la componente neurogena o microvascolare potrebbe risultare preponderante (come per esempio nelle forme di CRPS-I insorte sine trauma); questi soggetti con una maggiore componente ossea potrebbero essere più facilmente responsivi alla terapia con bisfosfonati. Inoltre l'osservazione di una maggiore efficacia di tale trattamento nei pazienti con malattia in fase "calda" e con breve durata dei sintomi permette di ipotizzare un effetto antiflogistico dei bisfosfonati, più rilevante nelle fasi iniziali di malattia in cui un'incrementata produzione di citochine pro-infiammatorie è ben documentata nei modelli animali.

La fase trasversale del nostro studio fornisce dati esplorativi sul ruolo degli inibitori del sistema Wnt in corso di CRPS-I: il riscontro di valori di DKK-1 più elevati su sangue refluo dall'arto affetto rispetto al controlaterale potrebbe indicare un'azione locale di tale regolatore del metabolismo osseo, mentre l'incremento della concentrazione di SOST osservato nei nostri pazienti rispetto ai controlli sani non ha significato univoco, ma potrebbe essere correlato all'immobilizzazione, alla frattura e alla flogosi locale ed essere implicato nella genesi dell'osteoporosi locale osservata nei soggetti affetti da CRPS-I. La valutazione dei livelli sierici di NGF non ha fornito risultati significativi per la limitata numerosità di soggetti in cui il mediatore è risultato dosabile: successivi studi, effettuati anche con differenti metodiche, potranno fornire ulteriori evidenze relative al ruolo di tale mediatore in corso di CRPS-I. In prospettiva, inoltre, potrebbe essere interessante dosare i mediatori oggetto della nostra indagine prima e dopo il trattamento con i bisfosfonati, per valutare l'impatto di tale terapia su di essi e fornire eventuali nuove informazioni relative al meccanismo di azione di queste molecole in corso di CRPS-I.



## BIBLIOGRAFIA

1. Harden RN, Oaklander AL, Burton AW, Perez RS, Richardson K, Swan M, et al. Complex regional pain syndrome: practical diagnostic and treatment guidelines, 4th edition. *Pain medicine*. 2013;14(2):180-229.
2. Iolascon G, de Sire A, Moretti A, Gimigliano F. Complex regional pain syndrome (CRPS) type I: historical perspective and critical issues. *Clinical cases in mineral and bone metabolism*. 2015;12(Suppl 1):4-10.
3. Mitchell SW. *Injuries of nerves and their consequences*. JB Lippincott, Philadelphia. 1872.
4. Sudeck P. Über die akute entzündliche Knochenatrophie. *Arch Klin Chir*. 1900;62:147-56.
5. Nonne M. Über radiographisch nachweisbare akute und kronisch "Knochenatrophie" (Sudek) bei Nerve-Erkrankungen. *Fortschr Geb Roentgenstr*. 1901;5:293-7.
6. Leriche R. De la causalgie envisagée comme une nevríte due sympathique et de son traitement par la dénudation et l'excision des plexus nerveux peri-arteriels *Presse Medicale*. 1916;24:178-80.
7. Evans JA. Reflex sympathetic dystrophy: report of 57 cases *Ann Intern Med*. 1947;26:417-26.
8. Foisie PS. Traumatic arterial vasospasm. *The New England journal of medicine*. 1947;237:295- 302.
9. Merskey H, Bogduk N. International Association for the Study of Pain. Task Force on Taxonomy: classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2nd edition. Seattle (WA): IASP Press. 1994.
10. Ratti C, Nordio A, Resmini G, Murena L. Post-traumatic complex regional pain syndrome: clinical features and epidemiology. *Clinical cases in mineral and bone metabolism*. 2015;12(Suppl 1):11-6.
11. Sandroni P, Low PA, Ferrer T, Opfer-Gehrking TL, Willner CL, Wilson PR. Complex regional pain syndrome I (CRPS I): prospective study and laboratory evaluation. *The Clinical journal of pain*. 1998;14(4):282-9.
12. de Mos M, de Bruijn AG, Huygen FJ, Dieleman JP, Stricker BH, Sturkenboom MC. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. *Pain*. 2007;129(1-2):12-20.

13. Jellad A, Salah S, Ben Salah Frih Z. Complex regional pain syndrome type I: incidence and risk factors in patients with fracture of the distal radius. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2014;95(3):487-92.
14. Savas S, Inal EE, Yavuz DD, Uslusoy F, Altuntas SH, Aydin MA. Risk factors for complex regional pain syndrome in patients with surgically treated traumatic injuries attending hand therapy. *Journal of hand therapy*. 2017. Epub 2017/05/16.
15. Bonica JJ. *The Management of Pain*. Lea & Febiger, Philadelphia. 1953.
16. Bruehl S, Harden RN, Galer BS, Saltz S, Backonja M, Stanton-Hicks M. Complex regional pain syndrome: are there distinct subtypes and sequential stages of the syndrome? *Pain*. 2002;95(1-2):119-24.
17. Harden RN, Bruehl S, Stanton-Hicks M, Wilson PR. Proposed new diagnostic criteria for complex regional pain syndrome. *Pain medicine*. 2007;8(4):326-31.
18. Wertli MM, Brunner F, Steurer J, Held U. Usefulness of bone scintigraphy for the diagnosis of Complex Regional Pain Syndrome 1: A systematic review and Bayesian meta-analysis. *PloS one*. 2017;12(3):e0173688.
19. Manara M, Varena M. A clinical overview of bone marrow edema. *Reumatismo*. 2014;66(2):184-96.
20. Guo TZ, Offley SC, Boyd EA, Jacobs CR, Kingery WS. Substance P signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. *Pain*. 2004;108(1-2):95-107.
21. Coderre TJ, Bennett GJ. A hypothesis for the cause of complex regional pain syndrome-type I (reflex sympathetic dystrophy): pain due to deep-tissue microvascular pathology. *Pain medicine*. 2010;11(8):1224-38.
22. Varena M, Zucchi F. Algodystrophy: recent insight into the pathogenic framework. *Clinical cases in mineral and bone metabolism*. 2015;12(1):27-30.
23. Wei T, Guo TZ, Li WW, Kingery WS, Clark JD. Acute versus chronic phase mechanisms in a rat model of CRPS. *Journal of neuroinflammation*. 2016;13:14.
24. Groeneweg JG, Huygen FJ, Heijmans-Antonissen C, Niehof S, Zijlstra FJ. Increased endothelin-1 and diminished nitric oxide levels in blister fluids of patients with intermediate cold type complex regional pain syndrome type 1. *BMC musculoskeletal disorders*. 2006;7:91.
25. O'Connell NE, Wand BM, Gibson W, Carr DB, Birklein F, Stanton TR. Local anaesthetic sympathetic blockade for complex regional pain syndrome. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2016;7:CD004598.

26. Maihofner C, Forster C, Birklein F, Neundorfer B, Handwerker HO. Brain processing during mechanical hyperalgesia in complex regional pain syndrome: a functional MRI study. *Pain*. 2005;114(1-2):93-103.
27. Kalita J, Vajpayee A, Misra UK. Comparison of prednisolone with piroxicam in complex regional pain syndrome following stroke: a randomized controlled trial. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2006;99(2):89-95.
28. Christensen K, Jensen EM, Noer I. The reflex dystrophy syndrome response to treatment with systemic corticosteroids. *Acta Chir Scand* 1982;148:653-5.
29. Goebel A, Baranowski A, Maurer K, Ghiai A, McCabe C, Ambler G. Intravenous immunoglobulin treatment of the complex regional pain syndrome: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2010;152(3):152-8.
30. Zuurmond WW, Langendijk PN, Bezemer PD, Brink HE, de Lange JJ, van loenen AC. Treatment of acute reflex sympathetic dystrophy with DMSO 50% in a fatty cream. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 1996;40(3):364-7.
31. Gaspar M, Bovaira M, Carrera-Hueso FJ, Querol M, Jimenez A, Moreno L. [Efficacy of a topical treatment protocol with dimethyl sulfoxide 50% in type 1 complex regional pain syndrome]. *Farmacia hospitalaria*. 2012;36(5):385-91.
32. Perez RS, Zuurmond WW, Bezemer PD, Kuik DJ, van Loenen AC, de Lange JJ, et al. The treatment of complex regional pain syndrome type I with free radical scavengers: a randomized controlled study. *Pain*. 2003;102(3):297-307.
33. Sigtermans MJ, van Hilten JJ, Bauer MC, Arbous MS, Marinus J, Sarton EY, et al. Ketamine produces effective and long-term pain relief in patients with Complex Regional Pain Syndrome Type 1. *Pain*. 2009;145(3):304-11.
34. Schwartzman RJ, Alexander GM, Grothusen JR, Paylor T, Reichenberger E, Perreault M. Outpatient intravenous ketamine for the treatment of complex regional pain syndrome: a double-blind placebo controlled study. *Pain*. 2009;147(1-3):107-15.
35. Gatti D, Rossini M, Adami S. Management of patients with complex regional pain syndrome type I. *Osteoporosis international*. 2016;27(8):2423-31.
36. Birklein F, Schlereth T. Complex regional pain syndrome-significant progress in understanding. *Pain*. 2015;156 Suppl 1:S94-103.
37. Aim F, Klouche S, Frison A, Bauer T, Hardy P. Efficacy of vitamin C in preventing complex regional pain syndrome after wrist fracture: A systematic review and meta-analysis. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*. 2017;103(3):465-70.

38. Varenna M, Adami S, Rossini M, Gatti D, Idolazzi L, Zucchi F, et al. Treatment of complex regional pain syndrome type I with neridronate: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Rheumatology*. 2013;52(3):534-42.
39. Adami S, Fossaluzza V, Gatti D, Fracassi E, Braga V. Bisphosphonate therapy of reflex sympathetic dystrophy syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*. 1997;56(3):201-4.
40. Varenna M, Zucchi F, Ghiringhelli D, Binelli L, Bevilacqua M, Bettica P, et al. Intravenous clodronate in the treatment of reflex sympathetic dystrophy syndrome. A randomized, double blind, placebo controlled study. *The Journal of rheumatology*. 2000;27(6):1477-83.
41. Manicourt DH, Brasseur JP, Boutsen Y, Depreux G, Devogelaer JP. Role of alendronate in therapy for posttraumatic complex regional pain syndrome type I of the lower extremity. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(11):3690-7.
42. Robinson JN, Sandom J, Chapman PT. Efficacy of pamidronate in complex regional pain syndrome type I. *Pain medicine*. 2004;5(3):276-80.
43. Chevreau M, Romand X, Gaudin P, Juvin R, Baillet A. Bisphosphonates for treatment of Complex Regional Pain Syndrome type 1: A systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials versus placebo. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2017;84(4):393-9.
44. McKiernan FE. Musculoskeletal manifestations of mild osteogenesis imperfecta in the adult. *Osteoporosis international*. 2005;16(12):1698-702.
45. Varenna M, Adami S, Sinigaglia L. Bisphosphonates in Complex Regional Pain syndrome type I: how do they work? *Clinical and experimental rheumatology*. 2014;32(4):451-4.
46. Wei T, Li WW, Guo TZ, Zhao R, Wang L, Clark DJ, et al. Post-junctional facilitation of Substance P signaling in a tibia fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. *Pain*. 2009;144(3):278-86.
47. Wei T, Guo TZ, Li WW, Hou S, Kingery WS, Clark JD. Keratinocyte expression of inflammatory mediators plays a crucial role in substance P-induced acute and chronic pain. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:181.
48. Wei T, Sabsovich I, Guo TZ, Shi X, Zhao R, Li W, et al. Pentoxifylline attenuates nociceptive sensitization and cytokine expression in a tibia fracture rat model of complex regional pain syndrome. *European journal of pain*. 2009;13(3):253-62.

49. Sabsovich I, Guo TZ, Wei T, Zhao R, Li X, Clark DJ, et al. TNF signaling contributes to the development of nociceptive sensitization in a tibia fracture model of complex regional pain syndrome type I. *Pain*. 2008;137(3):507-19.
50. Sabsovich I, Wei T, Guo TZ, Zhao R, Shi X, Li X, et al. Effect of anti-NGF antibodies in a rat tibia fracture model of complex regional pain syndrome type I. *Pain*. 2008;138(1):47-60.
51. Guo TZ, Wei T, Shi X, Li WW, Hou S, Wang L, et al. Neuropeptide deficient mice have attenuated nociceptive, vascular, and inflammatory changes in a tibia fracture model of complex regional pain syndrome. *Molecular pain*. 2012;8:85.
52. Guo TZ, Wei T, Li WW, Li XQ, Clark JD, Kingery WS. Immobilization contributes to exaggerated neuropeptide signaling, inflammatory changes, and nociceptive sensitization after fracture in rats. *The journal of pain*. 2014;15(10):1033-45.
53. Dohke T, Iba K, Hanaka M, Kanaya K, Abe Y, Okazaki S, et al. Regional osteoporosis due to osteoclast activation as a trigger for the pain-like behaviors in tail-suspended mice. *Journal of orthopaedic research*. 2017;35(6):1226-36.
54. Li WW, Guo TZ, Liang D, Shi X, Wei T, Kingery WS, et al. The NALP1 inflammasome controls cytokine production and nociception in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. *Pain*. 2009;147(1-3):277-86.
55. Li WW, Guo TZ, Shi X, Czirr E, Stan T, Sahbaie P, et al. Autoimmunity contributes to nociceptive sensitization in a mouse model of complex regional pain syndrome. *Pain*. 2014;155(11):2377-89.
56. Li WW, Sabsovich I, Guo TZ, Zhao R, Kingery WS, Clark JD. The role of enhanced cutaneous IL-1beta signaling in a rat tibia fracture model of complex regional pain syndrome. *Pain*. 2009;144(3):303-13.
57. Wang L, Guo TZ, Wei T, Li WW, Shi X, Clark JD, et al. Bisphosphonates Inhibit Pain, Bone Loss, and Inflammation in a Rat Tibia Fracture Model of Complex Regional Pain Syndrome. *Anesthesia and analgesia*. 2016;123(4):1033-45.
58. Birklein F, Weber M, Ernst M, Riedl B, Neundorfer B, Handwerker HO. Experimental tissue acidosis leads to increased pain in complex regional pain syndrome (CRPS). *Pain*. 2000;87(2):227-34.
59. Evans JR, Robertson WG, Morgan DB, Fleisch H. Effect of pyrophosphate and diphosphonates on the dissolution of hydroxyapatites using a flow system. *Calcified tissue international*. 1980;31:153-9.

60. Cecchini MG, Felix R, Fleisch H, Cooper PH. Effect of bisphosphonates on proliferation and viability of mouse bone marrow-derived macrophages. *Journal of bone and mineral research*. 1987;2:135-42.
61. Cecchini MG, Fleisch H. Bisphosphonates in vitro specifically inhibit, among the hematopoietic series, the development of the mouse mononuclear phagocyte lineage. *Journal of bone and mineral research*. 1990;5:1019-27.
62. Reszka AA, Halasy-Nagy J, Rodan GA. Nitrogen-bisphosphonates block retinoblastoma phosphorylation and cell growth by inhibiting the cholesterol biosynthetic pathway in a keratinocyte model for esophageal irritation. *Molecular pharmacology*. 2001;59(2):193-202.
63. Karacan I, Aydin T, Ozaras N. Bone loss in the contralateral asymptomatic hand in patients with complex regional pain syndrome type 1. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2004;22(1):44-7.
64. Kumar V, Kalita J, Gujral RB, Sharma VP, Misra UK. A study of bone densitometry in patients with complex regional pain syndrome after stroke. *Postgraduate medical journal*. 2001;77(910):519-22.
65. Otake T, Ieshima H, Ishida H, Ushigome Y, Saito S. Bone atrophy in complex regional pain syndrome patients measured by microdensitometry. *Canadian journal of anaesthesia*. 1998;45(9):831-8.
66. Renier JC, Basle M, Arlet J. L'os et le métabolisme phosphocalcique dans l'allogostrophie. *Rev Rhum Mal Osteoartic*. 1983;50:23-31.
67. Kramer HH, Hofbauer LC, Szalay G, Breimhorst M, Eberle T, Zieschang K, et al. Osteoprotegerin: a new biomarker for impaired bone metabolism in complex regional pain syndrome? *Pain*. 2014;155(5):889-95.
68. Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(9):5866-75.
69. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, et al. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *American journal of human genetics*. 2001;68(3):577-89.
70. Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Lacza C, et al. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *Journal of medical genetics*. 2002;39(2):91-7.
71. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(29):26770-5.

72. Goldring SR, Goldring MB. Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides. *Nature medicine*. 2007;13(2):133-4.
73. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, et al. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *The New England journal of medicine*. 2014;370(5):412-20.
74. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, et al. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *The New England journal of medicine*. 2016;375(16):1532-43.
75. Wehmeyer C, Frank S, Beckmann D, Bottcher M, Cromme C, Konig U, et al. Sclerostin inhibition promotes TNF-dependent inflammatory joint destruction. *Science translational medicine*. 2016;8(330):330ra35.
76. Ke HZ, Richards WG, Li X, Ominsky MS. Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases. *Endocrine reviews*. 2012;33(5):747-83.
77. Viapiana O, Fracassi E, Troplini S, Idolazzi L, Rossini M, Adami S, et al. Sclerostin and DKK1 in primary hyperparathyroidism. *Calcified tissue international*. 2013;92(4):324-9.
78. Gifre L, Ruiz-Gaspa S, Monegal A, Nomdedeu B, Filella X, Guanabens N, et al. Effect of glucocorticoid treatment on Wnt signalling antagonists (sclerostin and Dkk-1) and their relationship with bone turnover. *Bone*. 2013;57(1):272-6.
79. Gow JM, Tsuji WH, Williams GJ, Mytych D, Sciberras D, Searle SL, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and efficacy of AMG 403, a human anti-nerve growth factor monoclonal antibody, in two phase I studies with healthy volunteers and knee osteoarthritis subjects. *Arthritis research & therapy*. 2015;17:282.
80. Varenna M, Zucchi F, Failoni S, Becciolini A, Berruto M. Intravenous neridronate in the treatment of acute painful knee osteoarthritis: a randomized controlled study. *Rheumatology*. 2015;54(10):1826-32.
81. Varenna M, Manara M, Rovelli F, Zucchi F, Sinigaglia L. Predictors of Responsiveness to Bisphosphonate Treatment in Patients with Complex Regional Pain Syndrome Type I: A Retrospective Chart Analysis. *Pain medicine*. 2017;18(6):1131-8.
82. Yanow J, Pappagallo M, Pillai L. Complex regional pain syndrome (CRPS/RSD) and neuropathic pain: role of intravenous bisphosphonates as analgesics. *The Scientific World Journal*. 2008;8:229-36.
83. Bean DJ, Johnson MH, Kydd RR. The outcome of complex regional pain syndrome type 1: a systematic review. *The journal of pain*. 2014;15(7):677-90.

84. Wertli M, Bachmann LM, Weiner SS, Brunner F. Prognostic factors in complex regional pain syndrome 1: a systematic review. *Journal of rehabilitation medicine*. 2013;45(3):225-31.
85. Vaneker M, Wilder-Smith OH, Schrombges P, de Man-Hermsen I, Oerlemans HM. Patients initially diagnosed as 'warm' or 'cold' CRPS 1 show differences in central sensory processing some eight years after diagnosis: a quantitative sensory testing study. *Pain*. 2005;115(1-2):204-11.
86. Beerthuizen A, Stronks DL, Van't Spijker A, Yaksh A, Hanraets BM, Klein J, et al. Demographic and medical parameters in the development of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS1): prospective study on 596 patients with a fracture. *Pain*. 2012;153(6):1187-92.
87. Chen XX, Baum W, Dwyer D, Stock M, Schwabe K, Ke HZ, et al. Sclerostin inhibition reverses systemic, periarticular and local bone loss in arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(10):1732-6.
88. Heiland GR, Zwerina K, Baum W, Kireva T, Distler JH, Grisanti M, et al. Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(12):2152-9.
89. Sarahrudi K, Thomas A, Albrecht C, Aharinejad S. Strongly enhanced levels of sclerostin during human fracture healing. *Journal of orthopaedic research*. 2012;30(10):1549-55.
90. Li C, Ominsky MS, Tan HL, Barrero M, Niu QT, Asuncion FJ, et al. Increased callus mass and enhanced strength during fracture healing in mice lacking the sclerostin gene. *Bone*. 2011;49(6):1178-85.
91. McDonald MM, Morse A, Mikulec K, Peacock L, Yu N, Baldock PA, et al. Inhibition of sclerostin by systemic treatment with sclerostin antibody enhances healing of proximal tibial defects in ovariectomized rats. *Journal of orthopaedic research*. 2012;30(10):1541-8.
92. Atkins GJ, Rowe PS, Lim HP, Welldon KJ, Ormsby R, Wijenayaka AR, et al. Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism. *Journal of bone and mineral research*. 2011;26(7):1425-36.
93. Montagnoli C, Tiribuzi R, Crispolti L, Pistilli A, Stabile AM, Manfreda F, et al. beta-NGF and beta-NGF receptor upregulation in blood and synovial fluid in osteoarthritis. *Biological chemistry*. 2017.



94. Modder UI, Hoey KA, Amin S, McCready LK, Achenbach SJ, Riggs BL, et al. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *Journal of bone and mineral research*. 2011;26(2):373-9.