

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E  
SPERIMENTALI

XXV CICLO/ANNO 2010

LA RISPOSTA DI ADATTAMENTO DEI SISTEMI DI CONTROLLO DEL  
REMODELING OSSEO A DIVERSE INTENSITA' DI SOPPRESSIONE  
DELL'ATTIVITA' OSTEOCLASTICA

S.S.D. MED 09

Coordinatore: Prof. Enzo Bonora

Tutor: Prof. Francesco Bertoldo

Dottoranda: Dott.ssa Serena Pancheri

*Il successo è l'abilità  
di passare da un fallimento all'altro  
senza perdere l'entusiasmo.*

*Winston Churchill*

# **Indice**

|                                                                  |              |
|------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Capitolo 1: Introduzione</b>                                  | <b>Pg 4</b>  |
| 1.1 La sclerostina                                               | Pg 4         |
| 1.2 Il sistema Wnt/ $\beta$ catenina                             | Pg 7         |
| 1.3 Il Dkkopf 1 (DKK1)                                           | Pg 8         |
| 1.4 Il rimodellamento osseo                                      | Pg 11        |
| 1.5 Le cellule dell'osso                                         | Pg 13        |
| 1.6 Effetto dei bisfosfonati sugli osteoclasti                   | Pg 15        |
| 1.7 Effetto dei bisfosfonati sugli osteoblasti e sugli osteociti | Pg 15        |
| 1.8 Effetto dei bisfosfonati sulla sclerostina e sul DKK1        | Pg 17        |
| <br>                                                             |              |
| <b>Capitolo 2: Razionale e scopo dello studio</b>                | <b>Pg 19</b> |
| <br>                                                             |              |
| <b>Capitolo 3: Materiale e metodi</b>                            | <b>Pg 21</b> |
| 3.1 Popolazione studiata                                         | Pg 21        |
| 3.2 Disegno dello studio e procedure utilizzate                  | Pg 21        |
| 3.3 Analisi statistica                                           | Pg 22        |
| <br>                                                             |              |
| <b>Capitolo 4: Risultati</b>                                     | <b>Pg 25</b> |
| <br>                                                             |              |
| <b>Capitolo 5: Discussione</b>                                   | <b>Pg 34</b> |
| <br>                                                             |              |
| <b>Capitolo 6: Conclusioni</b>                                   | <b>Pg 42</b> |
| <br>                                                             |              |
| <b>Capitolo 7: Bibliografia</b>                                  | <b>Pg 43</b> |

## ***Introduzione***

### **LA SCLEROSTINA:**

Negli ultimi anni lo studio di alcune rare patologie del metabolismo minerale scheletrico ha portato all'identificazione di alcune importanti vie di segnale che regolano la formazione dell'osso. In particolare si è scoperto che la Sclerosteosi e il Morbo di van Buchem sono dovuti alla mancanza della sclerostina, una proteina secreta dagli osteociti che inibisce la neoformazione ossea da parte degli osteoblasti. Queste due patologie sono state descritte per la prima volta nel 1950 e presentano un fenotipo molto simile (1). Sono infatti caratterizzate da una progressiva osteosclerosi generalizzata come risultato di una iperostosi endostale (2-7). Le manifestazioni cliniche sono più marcate a livello della mandibola e del cranio con un caratteristico allargamento delle ossa facciali, della mandibola e della mascella che porta ad una distorsione dei lineamenti, ad aumentata pressione intracranica e all'intrappolamento dei nervi cranici con conseguente possibile perdita dell'udito e dell'olfatto (Fig 1).

Il difetto genetico che porta alla sclerosteosi è stato identificato all'interno del gene SOST, sul cromosoma 17q12-21, che codifica la proteina detta sclerostina (8-11). Per quanto riguarda il morbo di van Buchem invece il difetto si trova a valle del gene SOST e interessa una zona regolatoria per la trascrizione del gene stesso (12). Durante l'embriogenesi l'mRNA del gene SOST è espresso in molti tessuti mentre la sclerostina viene prodotta solo dopo la nascita e solo da cellule con differenziazione terminale alloggiate all'interno di una matrice minerale quali gli osteociti, i condrociti e i cementociti (13-16). Nell'osso umano adulto la produzione di sclerostina avviene unicamente ad opera degli osteociti, mentre gli osteoclasti, gli osteoblasti e le bone lining cells non la producono (13-17).

Nei pazienti affetti da sclerosteosi la combinazione di una elevata massa ossea e della mutazione genetica a livello del gene SOST hanno suggerito un effetto inibitorio della sclerostina sulla neoformazione ossea. Questo è supportato anche dall'osservazione che l'aggiunta di sclerostina a colture cellulari osteogeniche inibisce la proliferazione e la differenziazione degli osteoblasti murini e umani (13,15,18). Inoltre è stato dimostrato che la sclerostina riduce "l'aspettativa di vita" degli osteoblasti stimolandone l'apoptosi (18). L'iperespressione di sclerostina nel modello murino portava ad osteopenia, con una neoformazione ridotta ma un riassorbimento osseo inalterato. Inoltre l'analisi di topi knock out per il gene SOST ha evidenziato un aumento significativo della densità minerale scheletrica, del volume osseo sia trabecolare che corticale, del rate di neoformazione ossea e della resistenza ossea (19). Pertanto dall'analisi di tutti questi dati si evince un effetto negativo della sclerostina sulla neoformazione ossea.

Da un punto di vista molecolare la sclerostina agisce interferendo con la via di segnale Wnt/beta catenina, in particolare si lega alla proteina LRP5 prevenendone così il legame con le proteine Wnt e portando pertanto all'inibizione della via di segnale. Poiché la sclerostina è prodotta dagli osteociti, principali responsabili della sensibilità al carico e dell'inizio della risposta anabolica conseguente ad esso, e inibisce la neoformazione, essa potrebbe giocare un ruolo nel regolare il pathway Wnt in risposta proprio al carico meccanico. In coerenza con tale ipotesi i dati in vivo dimostrano che il carico fa diminuire i livelli di mRNA SOST e di sclerostina mentre l'assenza di carico ne causa l'iperespressione (Fig 2) (20,21,22). E' interessante evidenziare che la riduzione di produzione della sclerostina era più marcata nelle aree a più elevato carico, suggerendo una risposta locale alle condizioni di carico. Infine i topi knock out per SOST non mostrano né una perdita di massa ossea dopo riduzione del carico né una alterazione della canonica via di segnale Wnt (20).



Fig 1: immagini in ordine cronologico relative ad una paziente affetta da sclerosteosi a partire dall'età di 3 anni. La paziente è deceduta all'età di 54 anni per eccessiva pressione intracranica nonostante un intervento di craniotomia.

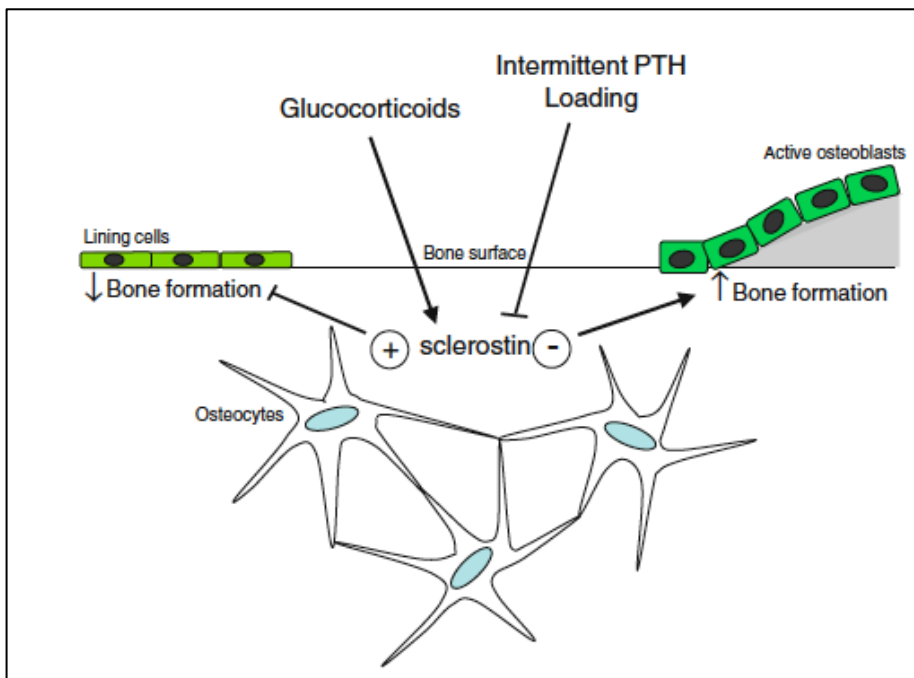


Fig 2: rappresentazione schematica del controllo della neoformazione ossea esercitato dalla sclerostina

## **IL SISTEMA WNT/ $\beta$ -CATENINA:**

Le proteine Wnt sono una famiglia di 19 fattori di crescita solubili che regolano funzioni cellulari chiave (23). Sono in grado di legarsi a complessi corecettori localizzati sulla superficie cellulare, in particolare si legano alle proteine LRP5 e 6 (Low density lipoprotein receptor related 5 and 6) e ai membri della superfamiglia delle proteine frizzled (Fz). L'attivazione della via di segnale è strettamente correlata ai livelli citoplasmatici di beta catenina (Fig 3). Quando le proteine Wnt si legano al complesso recettoriale LRP/FZ, il pathway viene attivato e il complesso di degradazione della beta catenina viene destabilizzato. La beta catenina si accumula nel citoplasma e successivamente migra nel nucleo dove può legarsi a diversi fattori di trascrizione modificando l'espressione genica. La via di segnale Wnt è finemente regolata a multipli livelli includendo la sua inibizione ad opera di molecole solubili quali la sclerostina e il DKK-1.

Il sistema Wnt è stato descritto per la prima volta più di 20 anni fa ma il suo ruolo all'interno del metabolismo osseo è stato dipanato solo recentemente (24,25). Esso regola infatti aspetti chiave di alcune funzioni cellulari quali la crescita, la differenziazione e la morte (26) ed in particolare ha un ruolo critico nel regolare molti aspetti legati alla fisiologia dell'osso e delle articolazioni come si è capito dall'analisi di alcune rare patologie genetiche che presentano un fenotipo di severa osteoporosi o di elevata massa ossea causato dalla ridotta o aumentata funzione del sistema Wnt stesso (27-29). Il sistema Wnt/beta catenina stimola la neoformazione ossea in diversi modi: 1) stimolando la differenziazione degli osteoblasti e la loro attività e bloccando la differenziazione delle cellule mesenchimali verso i condrociti e gli adipociti; 2) aumentando il tasso di crescita degli osteoblasti e inibendone l'apoptosi e infine 3) inibendo l'osteoclastogenesi (30). Studi in vitro suggeriscono inoltre un complesso interplay tra il sistema Wnt e l'asse RANK-RANKL-OPG, la via finale comune dell'osteoclastogenesi, suggerendo che l'attivazione

del sistema Wnt aumenti la massa ossea non solo stimolando l'osteoblastogenesi ma almeno in parte inibendo anche l'osteoclastogenesi (31).

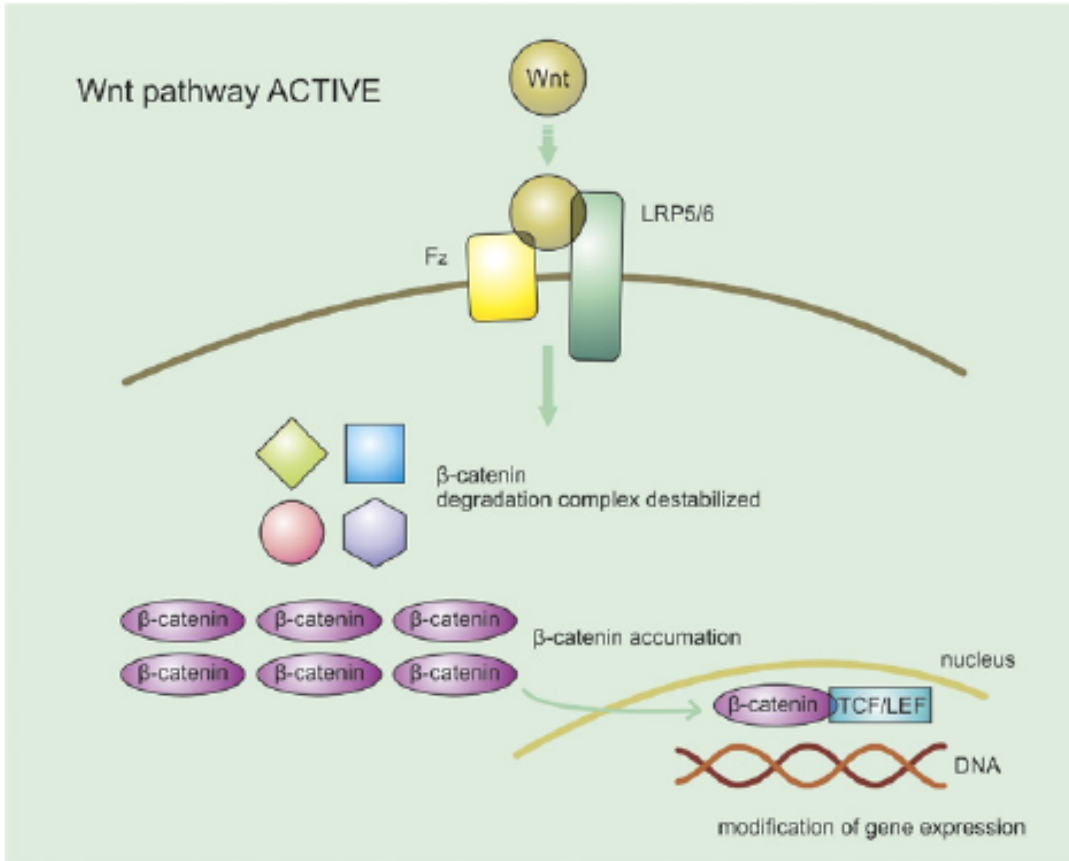


Fig 3: Via di segnale Wnt.

### IL DICKKOPF-1 (DKK-1):

Il Dkk-1 è uno dei principali inibitori secretori del sistema Wnt/beta catenina, pertanto è abbastanza intuitivo attendersi un suo ruolo sulla massa ossea. E' stata studiata in modelli murini l'iperespressione di DKK-1 ed è stato evidenziato che questa portava ad una severa osteopenia. La riduzione della massa ossea era causata da una significativa riduzione di almeno il 50% nel numero degli osteoblasti (32,33). Al contrario nei topi in cui veniva inibita l'espressione di DKK-1 il volume osseo era correlato inversamente con l'espressione di DKK-1, in particolare una riduzione del DKK-1 del 25% portava ad un



importante aumento della massa ossea. Inoltre in vitro è stato dimostrato che l'espressione retrovirale di DKK-1 portava ad una completa inibizione della differenziazione osteoblastica mentre i topi *dkk+/-* mostravano un aumento della massa ossea confermando che il DKK-1 è un regolatore della massa ossea. In particolare il DKK1 si lega alle proteine LRP5/6 e a Kremen, un recettore che non trasduce il segnale intracellulare, e il loro complesso viene internalizzato. Questo porta alla deplezione dei recettori sulla superficie cellulare che quindi non possono più legarsi alle proteine Wnt e di conseguenza alla inibizione della via di segnale. All'interno della cellula rimane quindi attiva la via di degradazione della betacatenina, che è costitutivamente attiva, e questo porta alla sua fosforilazione e alla sua degradazione proteosomica. Così facendo i livelli citoplasmatici di beta catenina rimangono molto bassi e la beta catenina non può traslare verso il nucleo dove svolge delle funzioni di modificazione dell'espressione genica (Fig 4). In particolare il DKK-1 per l'osso è sia anabolico che anticatabolico. L'aumentata secrezione di DKK-1 inibisce l'osteoblastogenesi a partenza dalle cellule mesenchimali e riduce i livelli di osteoprotegerina (OPG), risultando in una riduzione della crescita ossea. Inoltre il DKK-1 fa aumentare i livelli di RANKL e l'aumentato rapporto RANKL-OPG fa aumentare l'attività osteoclastica portando ad un aumento del riassorbimento osseo (Fig 5) (34).

L'espressione del DKK-1 è ubiquitaria nell'embrione di topo mentre nel topo adulto esso è espresso quasi esclusivamente dagli osteoblasti e dagli osteociti in maturazione (32). In alcune condizioni patologiche però il DKK-1 è espresso anche da altre cellule. Ad esempio nel mieloma multiplo il DKK-1 è espresso dalle plasma cellule e i suoi livelli correlano con la presenza di lesioni ossee (35,36). Inoltre nei pazienti con gammopatia monoclonale, una condizione precursore al mieloma multiplo in cui i pazienti sono ad aumentato rischio fratturativo, è stato evidenziato un aumento dei livelli di DKK-1 e una riduzione della massa ossea (37).

Nei pazienti affetti da morbo di Paget, una patologia caratterizzata da una disregolazione dell'osteoclastogenesi, i livelli di DKK-1 sono risultati significativamente aumentati rispetto ai controlli fino a 4 volte (38). Infine negli ultimi anni è stato ipotizzato che il DKK-1 giochi un ruolo anche nel coinvolgimento osseo in corso di neoplasia prostatica. In particolare i livelli di DKK-1 sono aumentati nelle fasi iniziali della malattia e poi si riducono durante la progressione della stessa. E' stato postulato che questo fenomeno agisca come switch molecolare nel passaggio fenotipico delle metastasi scheletriche di carcinoma prostatico da osteolitiche, come avvien nelle prime fasi della malattia, a osteoblastiche, come diventano in genere in fasi più avanzate di malattia (39).

I dati riguardanti gli effetti del DKK sul metabolismo minerale scheletrico normale nell'uomo sono purtroppo ancora pochi. In particolare un piccolo studio ha dimostrato che i livelli di DKK-1 erano aumentati nelle donne affette da osteoporosi rispetto ai controlli (40), un dato che potrebbe avere molte implicazioni patogenetiche e cliniche.

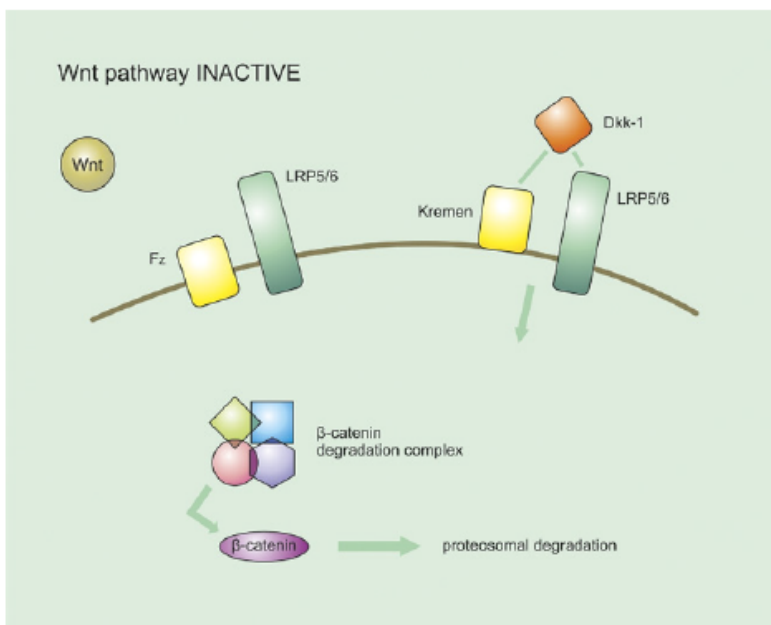


Fig 4: L'inibizione del sistema Wnt ad opera del DKK-1

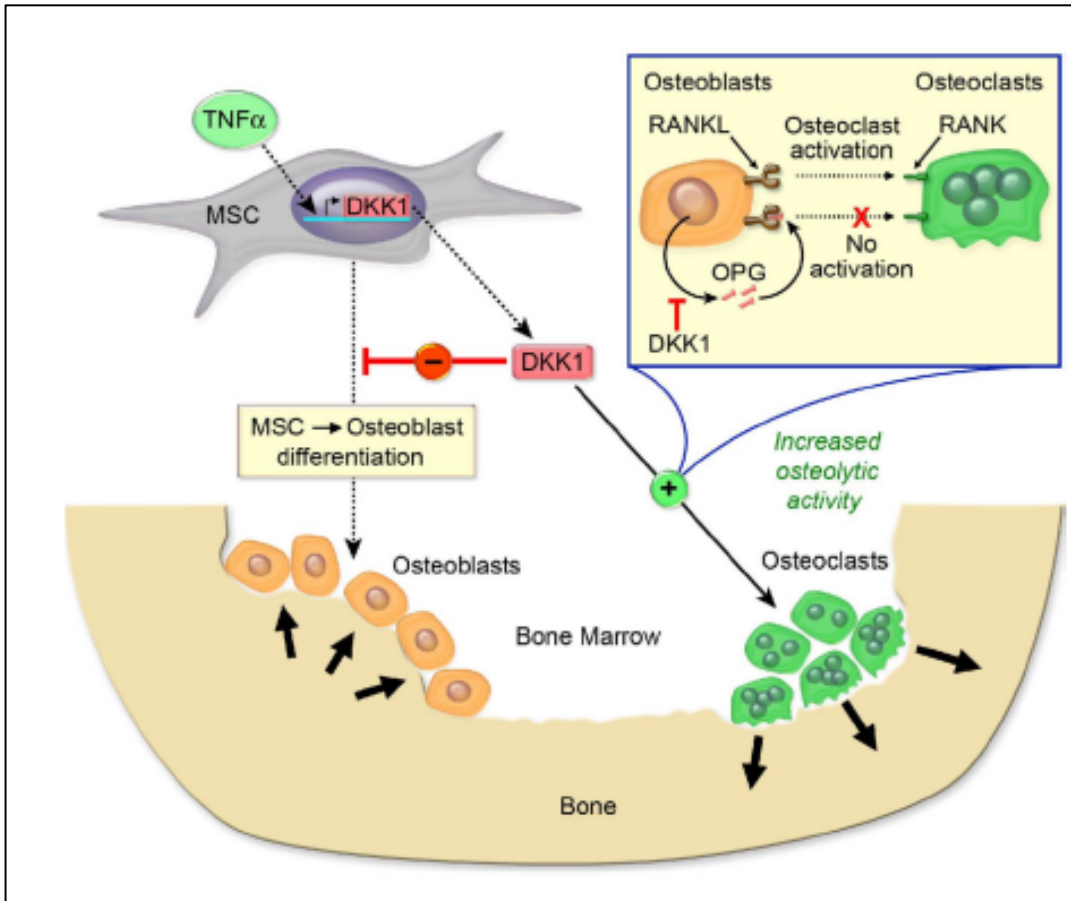


Fig 5: Il DKK-1 per l'osso è sia anabolico che anticatabolico. Il TNFalfa aumenta la secrezione di DKK-1 che inibisce l'osteoblastogenesi a partenza dalle cellule mesenchimali e riduce i livelli di osteoprotegerina (OPG), risultando in una riduzione della crescita ossea. Inoltre il DKK-1 fa aumentare i livelli di RANKL e l'aumentato rapporto RANKL-OPG fa aumentare l'attività osteoclastica portando ad un aumento del riassorbimento osseo.

## IL RIMODELLAMENTO OSSEO:

L'osso è un organo rigido ma dinamico. Da un punto di vista biochimico è caratterizzato da un misto di elementi inorganici e matrice organica. E' inoltre una riserva di fattori di crescita, quali l'insulin like growth factor (IGF) il fibroblast growth factor (FGF), il platele derived growth factor (PDGF) e di varie proteine morfogenetiche (BMP). Per mantenere la sua integrità strutturale e per adempiere al suo ruolo nell'omeostasi minerale, l'osso viene continuamente riparato e riformato, un processo chiamato rimodellamento. Il rimodellamento osseo è il processo metabolico predominante che regola la struttura e le

funzioni dell'osso nell'età adulta (41,42). Il rimodellamento è un processo complesso e finemente regolato gestito da due gruppi di cellule: gli osteoblasti e gli osteoclasti. Il riassorbimento osseo aumenta con l'età con l'osso trabecolare che viene rimodellato più rapidamente di quello corticale, e che pertanto è più rapidamente interessato da condizioni associate ad un aumentato turnover osseo (43). Il rimodellamento osseo all'interno dell'Unità Multicellulare di Base (BMU) permette al tessuto osseo di rispondere al carico meccanico e di prevenire i microdanni, mantenendo il controllo della qualità dell'osso e permettendo il rilascio dei fattori di crescita e dei minerali in esso contenuti. Il rimodellamento osseo comincia con la differenziazione dei precursori ematopoietici a formare osteoclasti, sostenuti dall'azione degli osteoblasti. L'accoppiamento tra riassorbimento e neoapposizione è reso possibile dal cross-talk intercellulare attraverso diversi fattori di crescita e citochine. Il principale regolatore della differenziazione osteoclastica è il RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand), una proteina di membrana e solubile che si lega al suo recettore (RANK), espresso dalle cellule della linea osteoclastica (44). Il RANKL è prodotto dagli osteoblasti e dalle cellule T attivate (45). La formazione di osteoclasti è limitata dall'osteoprotegerina (OPG) un recettore solubile che si lega al RANKL e che è prodotto dagli osteoblasti e dalle cellule stromali (46). La formazione di nuovo osso è sostenuta da vari fattori di crescita (IGF-I, IGF-II, FGF, TGF e PDGF) rilasciati dalla matrice ossea tramite l'attività di riassorbimento osteoclastico e che agiscono sugli osteoblasti (41) (Fig 6).

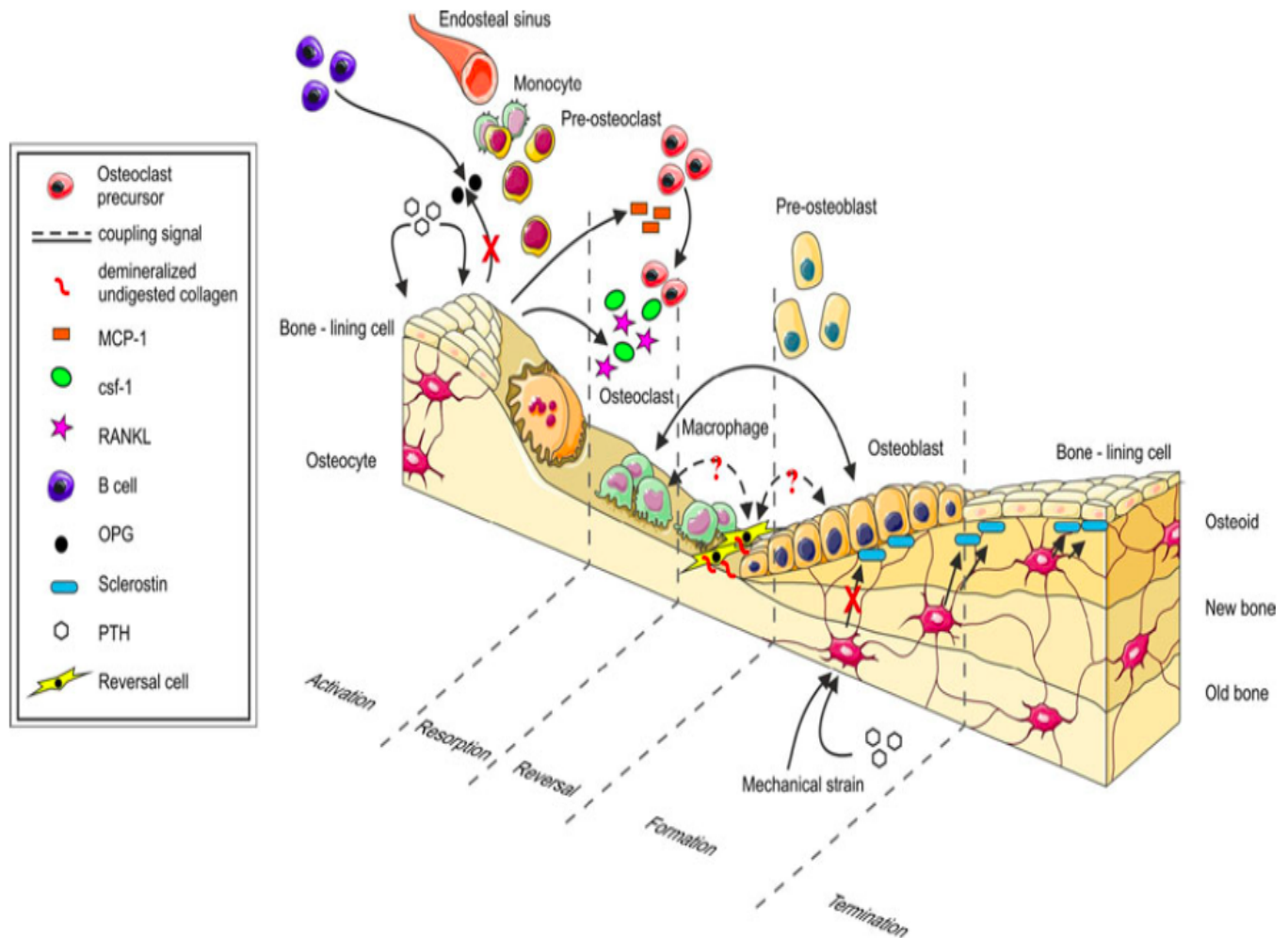


Fig 6: L'Unità Multicellulare di Base con le cellule e i mediatori coinvolti nel processo di rimodellamento osseo.

### LE CELLULE DELL'OSSO:

Gli osteoclasti sono grandi cellule plurinucleate che riassorbono l'osso e derivano dalla fusione di cellule ematopoietiche della linea monocito macrofagica che si trovano tipicamente nelle lacune di riassorbimento e sono caratterizzati da una elevata espressione di proteasi e di pompe H-ATPasi. La fisiologia degli osteoclasti è controllata da due regolatori principali prodotti dalle cellule stromali midollari e dagli osteoblasti: il RANKL e il Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) (47). Gli osteoblasti derivano dalle cellule staminali mesenchimali pluripotenti e sintetizzano e organizzano la matrice ossea (osteoid). Il loro reticolo endoplasmico altamente sviluppato e l'apparato di Golgi

producono una grande quantità di colagene di tipo I e di proteine leganti il calcio (48). Gli osteoblasti diminuiscono costantemente di numero con l'età (49). Gli osteociti rappresentano il 90% delle cellule dell'osso nello scheletro adulto, possono vivere fino a 50 anni, e il loro numero nell'osso profondo diminuisce con l'età (50). Gli osteociti sono osteoblasti completamente differenziati che sono rimasti intrappolati nella matrice ossea. Gli osteociti maturi hanno la forma di cellule dendritiche con lunghe protrusioni citoplasmatiche e giunzioni cellulari costituite da emicanali di connexina 43, che consentono l'interconnessione tra osteociti adiacenti e con altre cellule della superficie ossea (51). Gli osteociti sono gli orchestratori che registrano il carico meccanico e i microdanni e lanciano l'appropriata risposta di riassorbimento o neoapposizione (52). Gli osteociti esprimono sia promotori della mineralizzazione che inibitori della mineralizzazione e della neoformazione ossea, quali sclerostina e DKK-1, allo scopo di mantenere l'equilibrio e di preservare la massa ossea. . Gli osteociti inoltre sembrano giocare un ruolo importante nella regolazione degli osteoclasti, sia inibendo che attivando il riassorbimento osteoclastico. E' stato dimostrato che con il carico gli osteociti inviano segnali che inibiscono l'attivazione osteoclastica in specifiche circostanze (53). Il carico meccanico agisce comprimendo i fluidi extracellulari, causando lo scorrere dei fluidi che attiva delle vie di segnale a valle quali le MAP kinasi e le vie di segnale di calcio e ossido nitrico (54). Il carico meccanico è fondamentale per la definizione della forma e della salute dell'osso, come viene dimostrato dalla perdita di osso che subiscono gli immobilizzati e gli astronauti (52). Al contrario osteociti danneggiati, apoptotici o morenti, soprattutto in assenza di carico, sembrano inviare segnali non identificati ai preosteoclasti e agli osteoclasti sulla superficie dell'osso per avviare il riassorbimento osseo.

## **EFFETTO DEI BISFOSFONATI SUGLI OSTEOLASTI:**

I bisfosfonati sono analoghi stabili del pirofosfato inorganico e agiscono legandosi all'idrossiapatite. Essi agiscono quasi esclusivamente a livello dell'osso per via della loro elevata affinità per questo tessuto dove si depositano sia al di sotto degli osteoclasti sia nell'osso neoformato. Questi agenti bloccano selettivamente l'attività degli osteoclasti bloccando in punti critici la sintesi del colesterolo o causandone l'apoptosi. In particolare gli aminobisfosfonati inibiscono la farnesil pirfosfato sintetasi causando così una inibizione della via del mevalonato che fa ridurre la prenilazione posttraslazionale di alcune proteine tra cui le proteine GTP leganti Rho, Ras, Rac e Rab. Queste proteine sono dei costituenti essenziali per molte funzioni cellulari e la loro mancata prenilazione porta alla perdita di alcune funzioni cellulari e in ultima analisi all'induzione dell'apoptosi cellulare stessa (55). Pertanto i bisfosfonati esercitano gran parte del loro effetto causando l'apoptosi degli osteoclasti e quindi il blocco del riassorbimento osseo.

## **EFFETTO DEI BISFOSFONATI SUGLI OSTEOLASTI E SUGLI OSTEOCITI:**

L'effetto dei bisfosfonati sulla BMD può spiegare solo parzialmente la riduzione osservata nell'incidenza fratturativa dopo trattamento con tali farmaci. Pertanto sono state studiate possibili attività di questi composti su altri determinanti della qualità ossea (ad es. l'architettura trabecolare, la matrice ossea e la composizione minerale, il coinvolgimento di altre cellule dell'osso).

Al di là del potente effetto inibitorio esercitato sul riassorbimento osseo, il trattamento con risedronato e alendronato ha dimostrato di preservare la microarchitettura ossea (Dufresne, Recker) e le proprietà della matrice (56,57). Ci sono dati che evidenziano in vitro una aumentata proliferazione e differenziazione degli osteoblasti e in vivo una promozione dell'osteoblastogenesi dopo trattamento con bisfosfonati (58,59) ma anche dati che dimostrano l'esatto contrario, cioè un effetto inibitorio sulla proliferazione e la

differenziazione degli osteoblasti (60). Questa apparente incongruenza è stata spiegata sulla base di un diverso effetto esercitato a seconda della dose di bisfosfonato utilizzato: in particolare a basse concentrazioni i bisfosfonati sembrano aumentare la proliferazione degli osteoblasti mentre a concentrazioni maggiori ( $<10^{-5}$ ) sembrano esercitare un effetto inibitorio. E' interessante notare che un trattamento con acido zoledronico per 3 anni è stato associato con un incremento nel mineral apposition rate (tasso di deposizione minerale) (61) mentre questo effetto non è stato dimostrato in studi che valutavano gli effetti di alendronato e pamidronato (62,63). Questo potrebbe verosimilmente essere spiegato sulla base della diversa dose e potenza dei composti utilizzati. In ogni caso tutti questi studi evidenziano un possibile ruolo dei bisfosfonati nella neoformazione ossea anche a fronte di una netta riduzione del rimodellamento osseo.

Vi sono inoltre evidenze che suggeriscono che parte dell'effetto benefico degli aminobisfosfonati sia dovuto alla prevenzione da essi esercitata a basse concentrazioni farmacologiche dell'apoptosi di osteoblasti e osteociti, mediata dall'attivazione di una chinasi extracellulare (ERK) (64). E' stato dimostrato che tale effetto antiapoptotico è dipendente dall'espressione di connexina 43, la principale proteina costituente le gap junction negli osteociti. Gli aminobisfosfonati causano l'apertura dei canali connexina 43 seguita dall'attivazione di Src chinasi ed ERK (65) con la successiva fosforilazione del target citoplasmatico di ERK, la chinasi p90RSK, che esita nell'inibizione dell'apoptosi (66). Va sottolineato che l'azione antiapoptotica degli aminobisfosfonati sugli osteoblasti e sugli osteociti in vitro è presente anche utilizzando un analogo dei bisfosfonati che non inibisce il riassorbimento osteoclastico, suggerendo che alla base degli opposti effetti esercitati dagli aminobisfosfonati vi siano meccanismi molecolari o cellulari diversi (67,68). Un recente studio ha evidenziato la penetrazione dei bisfosfonati all'interno del network di canalicoli osteocitari in vivo, suggerendo che il legame, e verosimilmente l'effetto, dei bisfosfonati non sia limitato alla sola superficie ossea (69). Inoltre la distribuzione dei



bisfosfonati all'interno di questo network osteocitario sembra essere diversa tra i diversi composti con i bisfosfonati a minor affinità per l'idrossiapatite che sembrano avere una migliore penetrazione nella rete e quindi potenzialmente con effetti diversi esercitati sugli osteociti a seconda del bisfosfonato utilizzato (70).

**EFFETTO DEI BISFOSFONATI SULLA SCLEROSTINA E SUL DKK-1:** Un recente lavoro di Gatti et al ha analizzato l'effetto del trattamento con bisfosfonati per l'osteoporosi post menopausale sui livelli di DKK-1 e sclerostina. In particolare sono state valutate 107 donne in terapia con neridronato per via intramuscolare a diversi dosaggi (placebo, 12,5, 25 e 50 mg) per 12 mesi. Nel periodo di osservazione i livelli ematici di DKK-1 sono rimasti stabili in tutta la popolazione in studio. Per quanto riguarda i livelli di sclerostina non sono state osservate variazioni significative nel gruppo placebo. Nel gruppo trattato con 12,5 mg di neridronato i livelli di sclerostina sono aumentati transitoriamente ma significativamente rispetto al basale solo a 3 mesi di terapia, mentre negli altri due gruppi si è osservato un incremento stabile dei livelli ematici di sclerostina (Fig 7). E' stata inoltre rilevata una correlazione negativa significativa ( $p=0,001$ ) tra i livelli di sclerostina e le variazioni percentuali della fosfatasi alcalina e tale correlazione rimaneva significativa ( $p=0,019$ ) anche analizzando i singoli gruppi separatamente e aggiustando per i livelli di CTX. Il meccanismo attraverso il quale i bisfosfonati agiscono sui livelli di sclerostina rimane oscuro ma, tenendo conto dell'effetto anti-anabolico della sclerostina sulla neoformazione ossea l'associazione tra il trattamento con neridronato e l'incremento dei livelli di sclerostina suggerisce che l'inibizione della neoformazione ossea che si osserva dopo prolungato trattamento con bisfosfonati potrebbe almeno in parte essere mediata proprio dall'aumento della sclerostina (71).

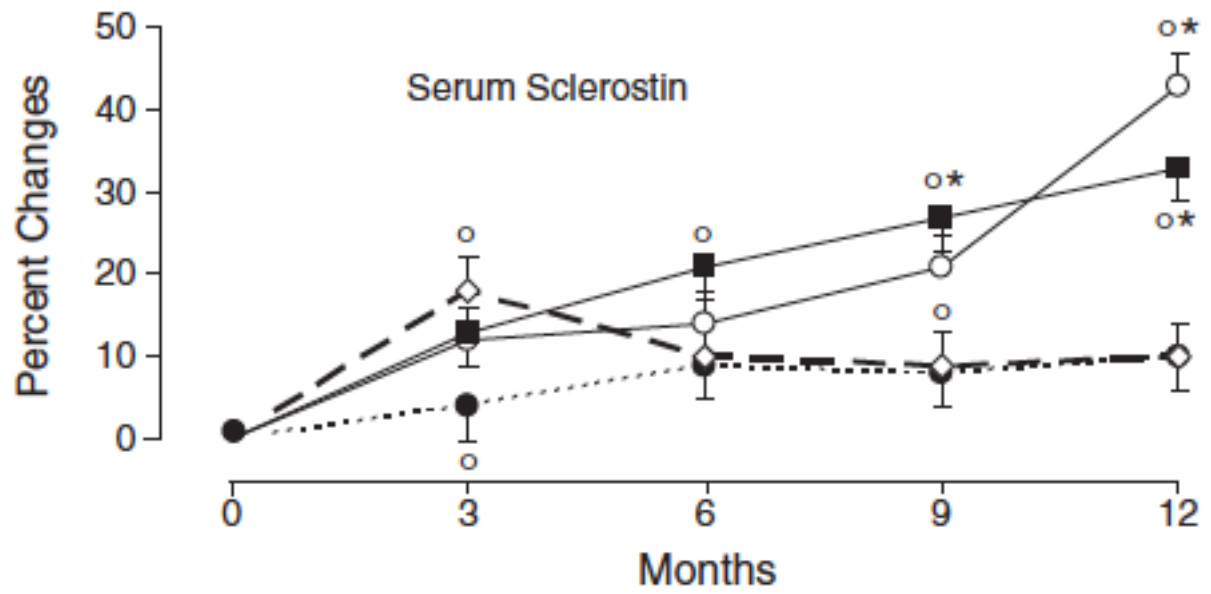


Fig 7: Variazioni percentuali dei livelli di sclerostina nei 4 gruppi in studio (Placebo cerchio nero, Gruppo 12,5 mg rombo bianco, Gruppo 25 mg quadrato nero, Gruppo 50 mg cerchio bianco).

## ***Razionale e Scopo dello Studio***

Il ruolo del sistema Wnt/DKK-1 e sclerostina nella modulazione fisiologica del rimodellamento osseo è oggi piuttosto ben definito. E' inoltre verosimile ipotizzare che farmaci che interferiscono con i processi di rimodellamento osseo, come ad esempio i bisfosfonati, possano determinare risposte di adattamento/attivazione di tale sistema. L'impatto dei bisfosfonati, e potenzialmente di tutti i farmaci che influenzano il rimodellamento osseo, sul sistema Wnt/DKK-1 e sclerostina può essere diretto per azione del farmaco sugli osteociti e/o indiretto attraverso il blocco del riassorbimento osteoclastico e la successiva risposta osteocitaria. Recenti studi hanno dimostrato che il trattamento con bisfosfonati ai dosaggi utilizzati per la terapia dell'osteoporosi può influire effettivamente sui livelli sierici di sclerostina e che tale effetto potrebbe essere dose dipendente, mentre per il momento non sono stati osservati effetti significativi sui livelli di DKK-1 (71).

Recentemente è stato inoltre dimostrato che gli aminobisfosfonati non agiscono solo sulla popolazione osteoclastica ma anche sugli osteoblasti e sugli osteociti, principali responsabili della produzione di sclerostina. In particolare è stato recentemente osservato che gli aminobisfosfonati sono in grado di esercitare un effetto antiapoptotico sulla popolazione osteoblastica e osteocitaria e che riescono a penetrare nel network dei canalicoli osteocitari e ad influire così direttamente sulla popolazione osteocitaria alla quale appartiene l'esclusiva capacità di esprimere sclerostina e Dkk-1(69,70). Poiché i pazienti con malattia metastatica vengono trattati con dosaggi di potenti bisfosfonati circa 10 volte maggiori delle posologie utilizzate nell'osteoporosi con una più persistente e profonda inibizione del turnover osseo, lo scopo del presente studio è quello di valutare l'effetto di diverse dosi e di una diversa schedula di somministrazione di uno stesso

aminobisfosfonato, in particolare l'acido zoledronico, sui livelli sierici di sclerostina e di DKK-1 in relazione all'effetto di inibizione sul turnover osseo.

## ***Materiali e Metodi***

### **POPOLAZIONE STUDIATA**

Tra gennaio e dicembre 2011 abbiamo arruolato in maniera consecutiva 50 donne suddivise in due gruppi:

-Gruppo AI+META: 25 donne affette da carcinoma mammario con metastasi ossee (età media  $64,5 \pm 8,5$  anni) in corso di terapia con inibitori dell'aromatasi.

-Gruppo AI: 25 donne affette da carcinoma mammario ma prive di metastasi ossee (età media  $66 \pm 5$  anni) in corso di terapia con inibitori dell'aromatasi.

Le pazienti del gruppo AI+META necessitavano di terapia con aminobisfosfonati per la prevenzione degli eventi scheletrici correlati. Le pazienti del gruppo AI necessitavano di trattamento con aminobisfosfonati perché affette da osteoporosi. Sono stati esclusi dall'arruolamento soggetti con anamnesi di malattie autoimmuni o deficit immunitari, abuso alcolico, terapia corticosteroidea cronica o eseguita recentemente, in corso di trattamento con statine, immunoterapia o con altri farmaci che potessero interferire con il sistema immunitario. Sono stati inoltre esclusi dallo studio soggetti precedentemente trattati con aminobisfosfonati sia per os che per via endovenosa. Tra gli altri fattori potenzialmente interferenti sul metabolismo osseo abbiamo indagato la concomitante supplementazione con calcio e vitamina D.

### **DISEGNO DELLO STUDIO E PROCEDURE UTILIZZATE**

Tutte le donne esaminate erano in stato menopausale. Le pazienti del gruppo AI+META sono state trattate con acido zoledronico e.v. 4 mg diluito in soluzione fisiologica allo 0,9% e infuso in 15 minuti ogni 28 giorni, mentre le pazienti del gruppo AI sono state trattate con una sola infusione di acido zoledronico 4 mg. Tutte le pazienti sono state supplementate con colecalciferolo 3000 UI/die circa in dosi refratte di 100000 UI/mese. I parametri

ematochimici riguardanti il metabolismo minerale osseo che sono stati analizzati in questo studio sono: PTH sierico (Diasorin Liaison, N-tact PTH, CV<10%, Diasorin Inc Stillwater USA), 25(OH)D sierico (Diasorin Liaison 25(OH) vitamina D, CV<15%, Diasorin Inc Stillwater USA), peptide C-terminale del collagene di tipo I (Elecsys B-crossLaps/serum assay, CV<20%, Roche Diagnostics Mannheim). Sclerostina e DKK-1 sono stati misurati con kit ELISA (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien, Austria) con una sensibilità di 0,89 pmol/L e 8,9 pmol/L e un coefficiente di variazione intra-assay di 7-8% e 5-6% rispettivamente. La variabilità inter-assay è stata misurata in 4 momenti separati su 4 campioni di siero e il coefficiente di variazione è risultato di 8,2 e 6,9% per DKK-1 e sclerostina rispettivamente. Tutti i campioni di DKK e sclerostina sono stati dosati nella stessa seduta analitica per limitare la variabilità inter-assay.

I campioni ematici sono stati raccolti al basale, prima della prima infusione di aminobisfosfonati. Successivamente i campioni sono stati raccolti a 28 giorni e a 3, 6, 9 e 12 mesi dalla prima infusione. Per quanto riguarda il gruppo AI+META, che è stato trattato con multiple infusioni, i campioni ematici sono sempre stati raccolti prima dell'infusione di acido zoledronico prevista per il timing specificato.

I parametri ematochimici sono stati analizzati in cieco da un laboratorio indipendente.

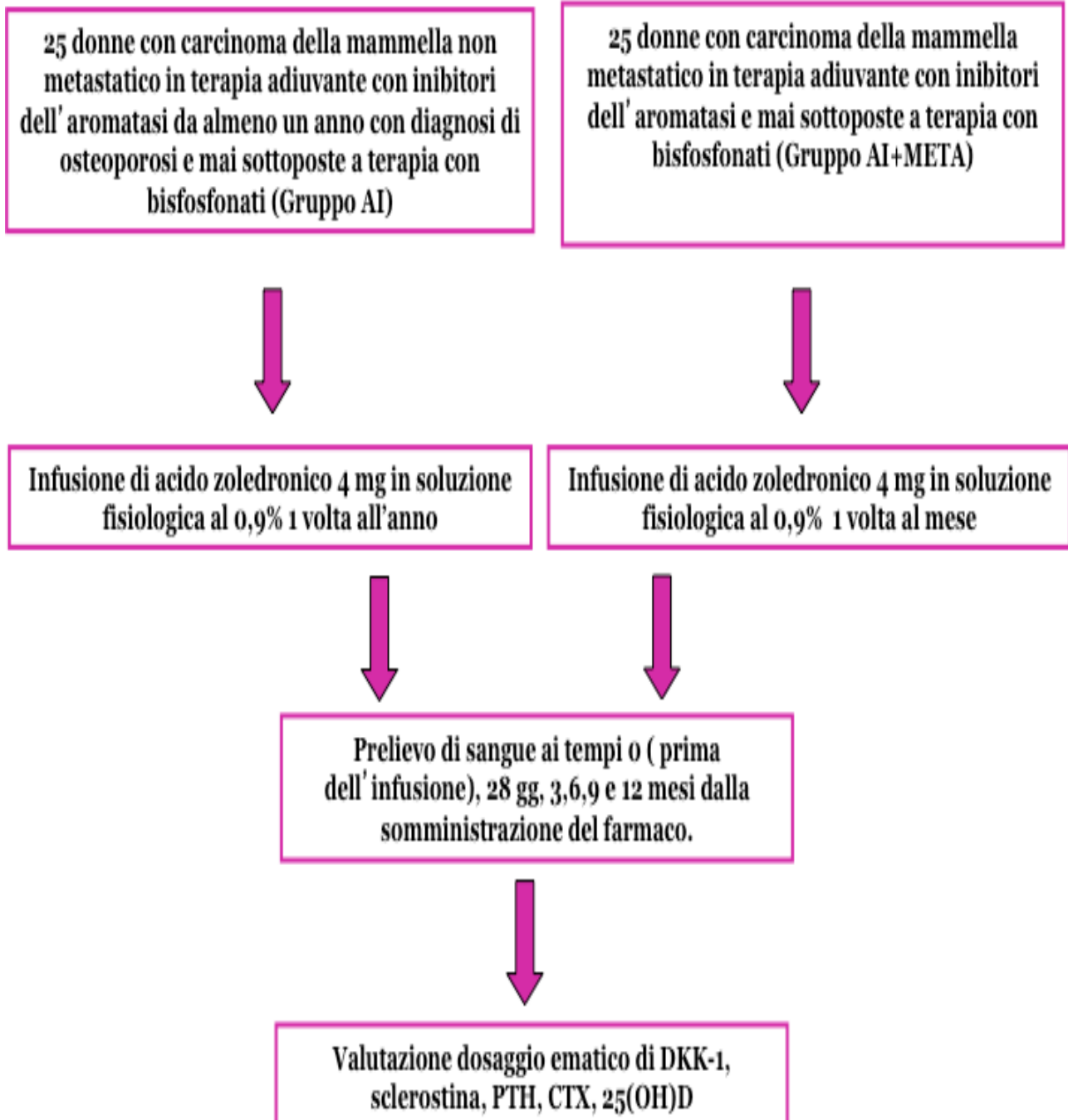
## **ANALISI STATISTICA**

Le misurazioni basali sono state analizzate in maniera descrittiva. I dati sono espressi come media e deviazione standard (media  $\pm$  DS). Sono state comparate le caratteristiche demografiche e i parametri biochimici del turnover osseo con analisi di varianza e con Wilcoxon Rank Test per variabili continue. Le variabili categoriche e le proporzioni sono state analizzate utilizzando il test del Chi-quadrato. Per correggere i valori per ogni parametro confondente è stata utilizzata l'analisi di covarianza (ANCOVA).

L'associazione tra variabili continue è stata esaminata con i coefficienti di correlazione di Pearson's e con la regressione lineare multivariata. Le differenze sono state considerate significative per valori di  $p < 0,05$ .

Tutte le procedure statistiche sono state eseguite tramite il programma di statistica Statgraphics Centurion Version XV.

## ***Flow-chart dello studio***





## ***Risultati***

Le caratteristiche demografiche, cliniche e biochimiche di tutti i pazienti al basale sono riportate nella tabella 1. I due gruppi non erano significativamente diversi per valori basali di CTX, sclerostina e DKK-1.

Il Gruppo AI+META presentava al basale un livello di CTX di  $0,35 \pm 0,18$  ng/ml. A distanza di 28 giorni dalla prima infusione di acido zoledronico è stato osservato un calo significativo dei livelli di CTX ( $-53,53 \pm 27,87\%$ ;  $p=0,000$ ) raggiungendo il nadir ad un valore di  $0,14 \pm 0,06$  ng/ml. Nei prelievi successivi il valore di CTX è rimasto sostanzialmente stabile senza variazioni significative rispetto al valore a 28 giorni (Fig 8 e 9, Tab 2)

Il gruppo AI partiva da un valore di CTX di  $0,48 \pm 0,15$  ng/ml. Anche in questo gruppo si è osservato a 28 giorni un calo significativo dei valori di CTX ( $-54,02 \pm 35,94\%$ ,  $p=0,000$ ), della stessa entità di quello osservato nel gruppo AI+META, raggiungendo il medesimo valore di nadir del gruppo AI, pari a  $0,19 \pm 0,13$  (Fig 8 e 9, Tab 2).

Si è poi osservata una lenta ripresa del turnover osseo che a 6 e 12 mesi risultava significativamente superiore rispetto al valore rilevato a 28 giorni (rispettivamente  $0,30 \pm 0,11$   $p=0,000$  e  $0,34 \pm 0,15$   $p=0,000$ ) con un incremento rispetto al valore nadir dei 28 giorni del 23% a 6 mesi e del 29% a 12 mesi. I valori a 12 mesi rimanevano comunque significativamente inferiori ai valori basale (Fig 8 e 9, Tab 2).

Non sono state osservate correlazioni significative tra i livelli di CTX e quelli di sclerostina e di DKK-1 né al basale né negli altri time points in nessuno dei due gruppi analizzati.

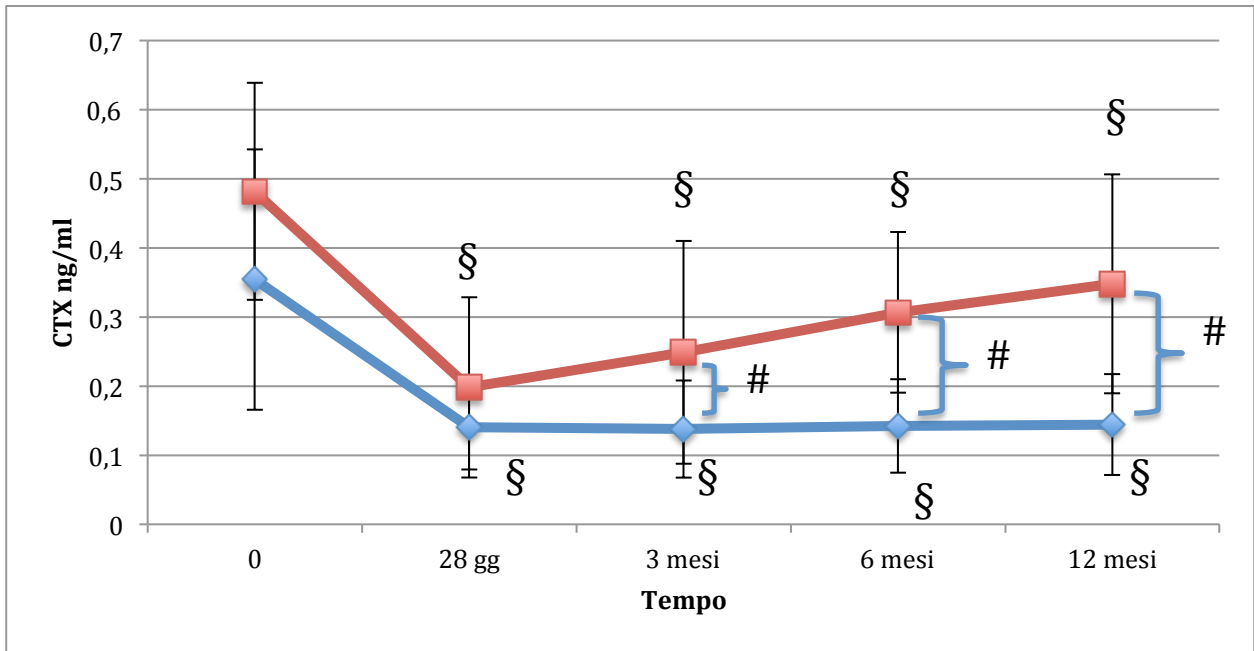


Fig 8: variazioni assolute valori di CTX nei due gruppi. Legenda: Gruppo AI+META azzurro, gruppo AI rosso, § p=0,0001 vs basale, # p=0,0001 vs gruppo AI+META

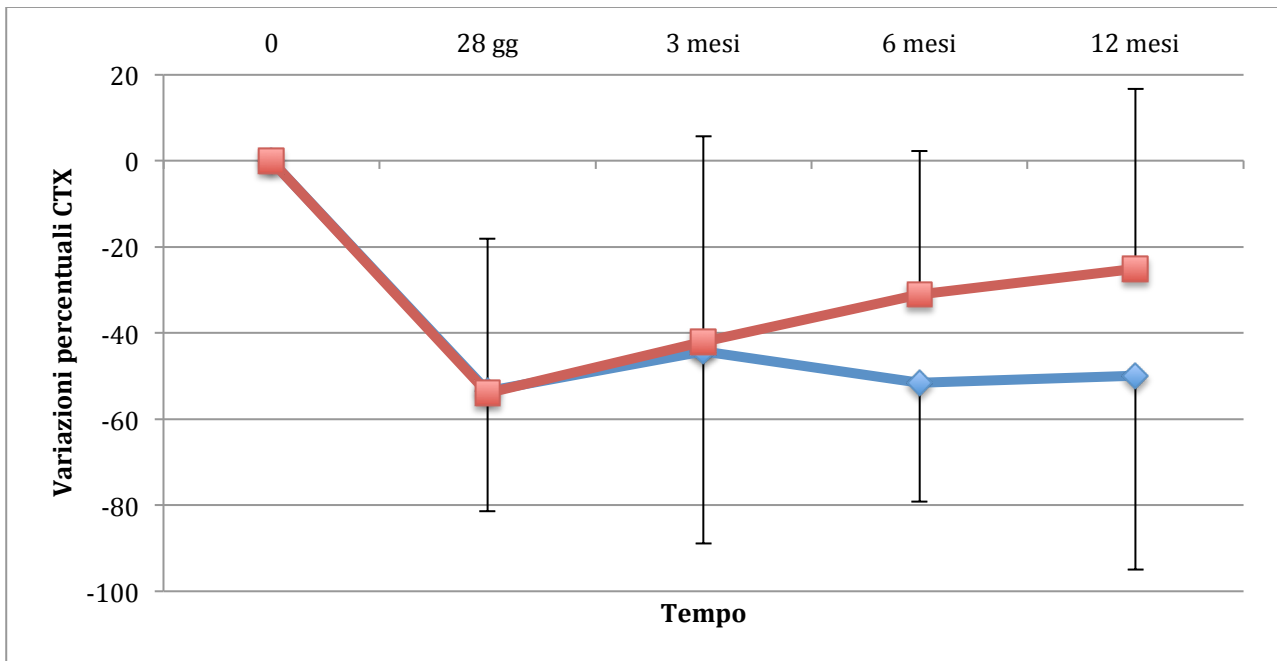


Fig 9: variazioni percentuali valori di CTX nei due gruppi. Legenda: Gruppo AI+META azzurro, gruppo AI rosso.

Per quanto riguarda i valori di PTH si è osservato un andamento simile nei due gruppi con un incremento percentuale importante ma non significativo a 28 giorni seguito poi da un progressivo decremento. In particolare nel gruppo AI+META si è passati da un valore

basale di  $59,37 \pm 33,43$  pg/ml ad un valore a 28 giorni di  $111,18 \pm 75,61$  pg/ml con un incremento percentuale del 213%. Si è poi assistito ad un progressivo decremento dei valori di PTH raggiungendo a 12 mesi il valore medio di  $74,64 \pm 58,85$  pg/ml. Le variazioni descritte sia nei valori assoluti che percentuali non raggiungevano la significatività statistica tranne che per l'incremento percentuale tra il basale e il valore a 28 giorni (Fig 10 e 11, Tab 3).

Nel gruppo AI si è passati da un valore basale medio di PTH di  $39,35 \pm 29,57$  pg/ml a  $79,59 \pm 50,69$  pg/ml a 28 giorni ( $P=0,005$ ) con un incremento percentuale del 154%. Si è poi osservato un progressivo costante calo dei valori di PTH che a 12 mesi raggiungevano il valore medio di  $44,34 \pm 23,26$  pg/ml ( $p=0,005$  vs 28 gg) (Fig 10 e 11, Tab 3).

Non sono state osservate differenze significative nei valori di PTH nelle due popolazioni in studio.

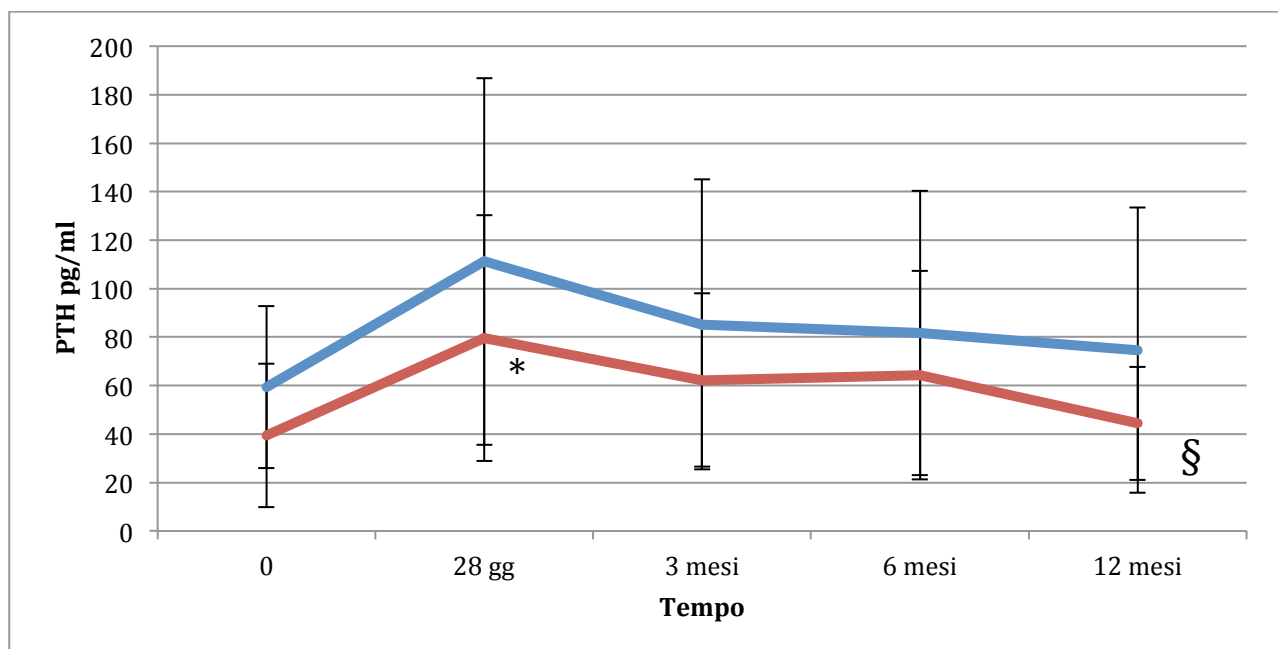


Fig 10: variazioni valori assoluti PTH. Legenda: Gruppo AI+META azzurro, gruppo AI rosso, significatività gruppo AI: \*  $p=0,005$  vs basale, §  $p=0,005$  vs 28 gg.

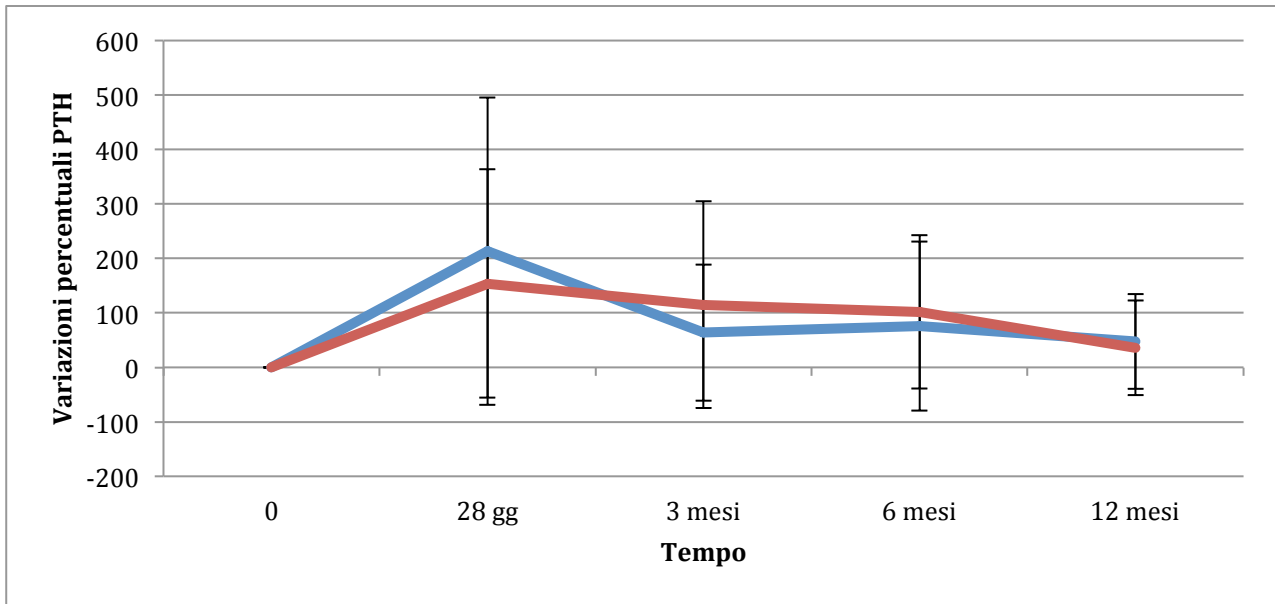


Fig 11: variazioni valori percentuali PTH. Legenda: Gruppo AI+META azzurro, gruppo AI rosso.

Entrambe le popolazioni in studio presentavano livelli insufficienti di vitamina D al basale (Tab 1 e 4). In particolare il gruppo AI+META presentava un valore medio basale di 25(OH)D di  $19,27 \pm 8,19$  ng/ml. Le pazienti sono state poi supplementate con 3000 UI/die circa di colecalciferolo a partire dal giorno della prima infusione e questo ha portato ad un progressivo aumento dei valori di 25(OH)D raggiungendo a 12 mesi il valore medio di  $28,36 \pm 10,60$  ng/ml ( $p=0,017$ ) (Fig 12 e 13, Tab 4). Il gruppo AI presentava al basale valori medi di  $21,69 \pm 11,80$  ng/ml. Nonostante la supplementazione raccomandata di 1000 UI/die di colecalciferolo non si è assistito ad una variazione significativa dei livelli di 25(OH)D che a 12 mesi erano di  $23,94 \pm 13,35$  ng/ml (Fig 12 e 13, Tab 4).

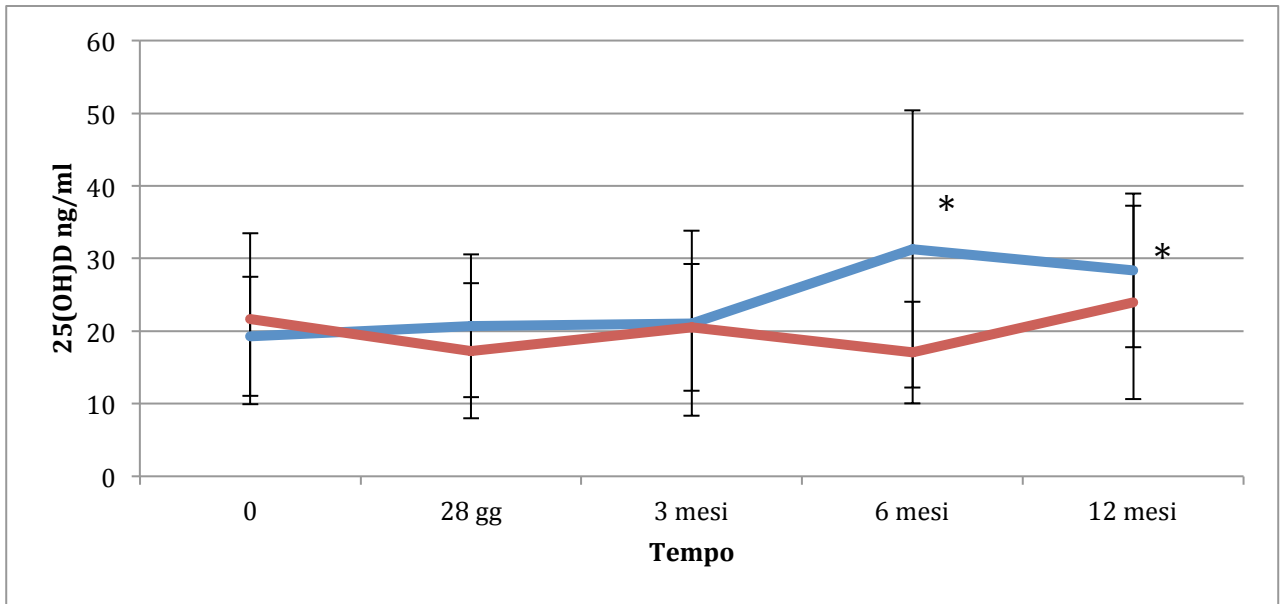


Fig 12: variazioni valori assoluti vitamina D. Legenda: Gruppo AI+META azzurro, gruppo AI rosso, \* p=0,017 vs basale.

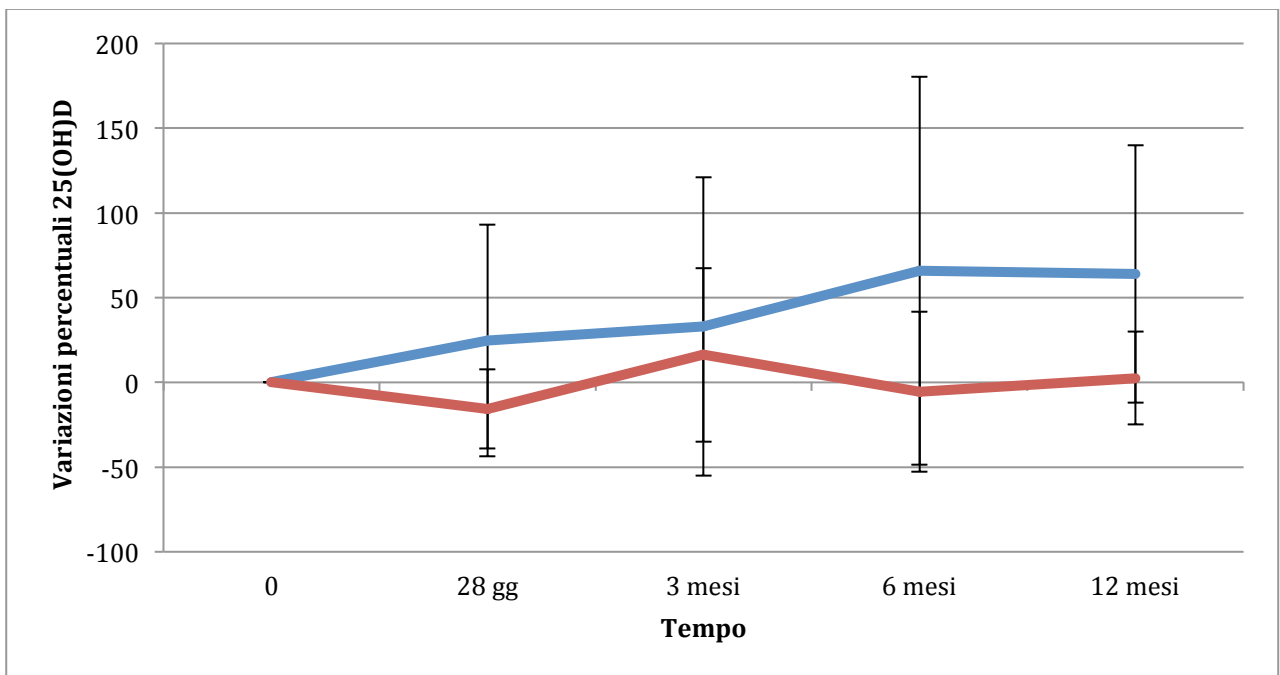


Fig 13: variazioni valori percentuali vitamina D. Legenda: Gruppo AI+META azzurro, gruppo AI rosso.

Sono stati inoltre valutati i valori ematici di sclerostina e DKK. I valori di CTX, sclerostina e DKK-1 nelle due popolazioni in studio sono riportati nelle tabelle 1,5 e 6.

Il gruppo AI+META partiva da livelli di sclerostina di  $23,26 \pm 5,84$  pmol/L. Si assisteva poi nel corso dei 12 mesi di trattamento ad un graduale ma costante aumento dei livelli di sclerostina fino a  $30,29 \pm 7,81$  pmol/L, corrispondente ad un incremento percentuale del 30% a 12 mesi. L'incremento a 6 e a 12 mesi risultava significativo rispetto al basale ( $p=0,03$ ) (Fig 14, Tab 5).

Per quanto riguarda il gruppo AI invece i livelli di sclerostina rimanevano sostanzialmente stabili fino a 28 giorni. A 3 mesi si assisteva ad un transitorio aumento dei livelli di sclerostina seppur non significativo fino a valori di  $28,31 \pm 14,60$  pmol/L per ritornare a 6 mesi ai livelli basali. Tra i 6 e i 12 mesi non si sono osservate ulteriori variazioni (Fig 14, Tab 5).

I livelli di sclerostina tra i due gruppi divergono significativamente a 6 mesi (nel gruppo AI+META  $28,41 \pm 6,71$  pmol/L e nel gruppo AI  $23,81 \pm 6,69$  pmol/L  $p=0,03$ ) mantenendo tale differenza anche a 12 mesi ( $p=0,03$ ) (Fig 14).

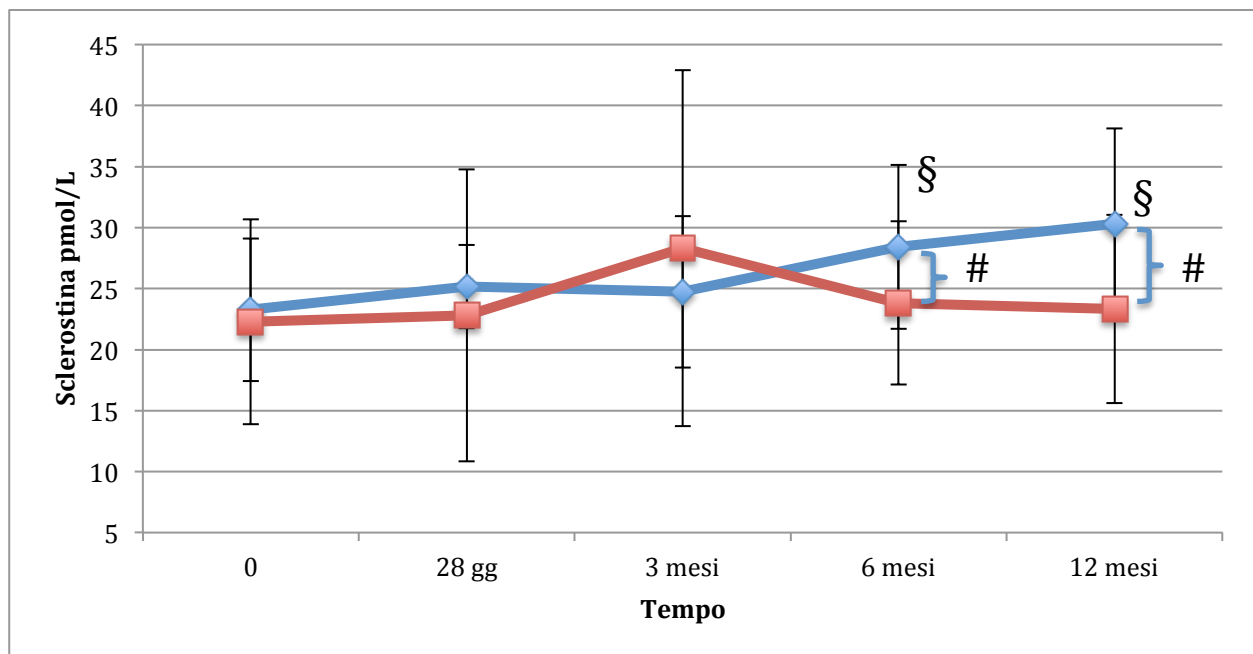


Fig 14: variazioni assolute livelli di sclerostina. Legenda: Gruppo AI+META azzurro, gruppo AI rosso, §  $p=0,03$  vs basale, #  $p=0,03$  vs gruppo AI+META.

Non si osservavano variazioni significative per quanto riguarda l'andamento dei livelli di DKK-1 né all'interno dei singoli gruppi né confrontando i due gruppi tra di loro, verosimilmente anche a causa dell'ampia variabilità dei dati. In particolare il gruppo AI+META presentava valori basali di DKK-1 di  $20,43 \pm 13,62$  pmol/L e a 12 mesi di  $15,18 \pm 5,76$  pmol/L. Nel gruppo AI i valori basali di DKK-1 erano di  $23,11 \pm 20,77$  pmol/L e a 12 mesi di  $19,82 \pm 15,77$  pmol/L (Fig 15, Tab 6).

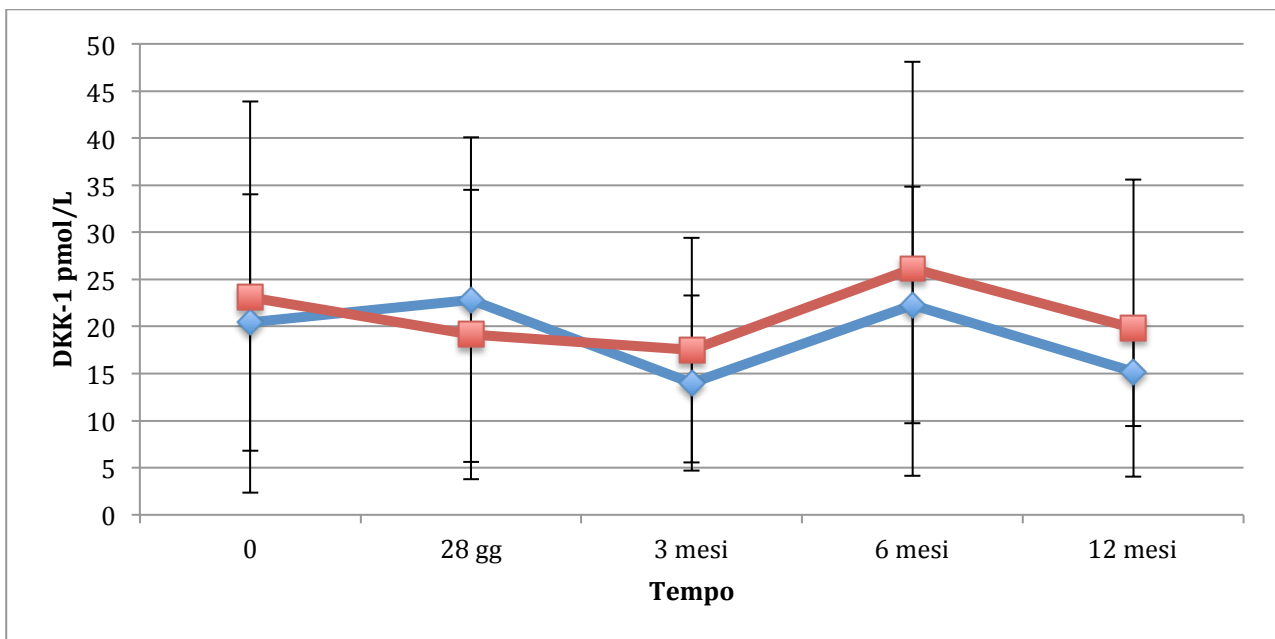


Fig 15: variazioni assolute livelli di DKK-1. Legenda: Gruppo AI+META azzurro, gruppo AI rosso.

| Tab 1                            | Gruppo AI+META | Gruppo AI   | p    |
|----------------------------------|----------------|-------------|------|
| Età (anni)                       | 64,50±8,5      | 66±5        | n.s. |
| Altezza (cm)                     | 157,6±6,3      | 157±8,5     | n.s. |
| Peso (Kg)                        | 66±8           | 63±5,5      | n.s. |
| Età della menopausa (anni)       | 51±4,2         | 50±5,39     | n.s. |
| CTX (ng/ml)                      | 0,35±0,18      | 0,48±0,15   | n.s. |
| PTH (pg/ml)                      | 59,37±33,43    | 39,35±29,57 | n.s. |
| 25(OH)D (ng/ml)                  | 19,27±8,19     | 21,69±11,80 | n.s. |
| DKK-1 (pmol/L)                   | 20,43±13,62    | 23,11±20,77 | n.s. |
| Sclerostina (pmol/L)             | 23,26±5,84     | 22,27±8,38  | n.s. |
| BMD colonna (g/cm <sup>2</sup> ) | 0,86±0,12      | 0,87±0,16   | n.s. |
| Tsc colonna (SD)                 | -1,86±1,05     | -2,27±1,18  | n.s. |
| BMD neck (g/cm <sup>2</sup> )    | 0,73±0,12      | 0,75±0,13   | n.s. |
| Tsc neck (SD)                    | -1,45±0,74     | -1,57±0,96  | n.s. |
| BMD total (g/cm <sup>2</sup> )   | 0,83±0,11      | 0,80±0,13   | n.s. |
| Tsc total (SD)                   | -1,16±0,84     | -1,31±0,94  | n.s. |
| SDI                              | 2,8±1,8        | 2,3±1,5     | n.s. |

| Tab 2       | Gruppo AI+META |           | Gruppo AI   |          |
|-------------|----------------|-----------|-------------|----------|
|             | Media ng/ml    | DS        | Media ng/ml | DS       |
| CTX 0       | 0,3544         | 0,188619  | 0,481833    | 0,156913 |
| CTX 28 gg   | 0,140286       | 0,0609785 | 0,198318    | 0,130578 |
| CTX 3 mesi  | 0,138063       | 0,0704656 | 0,248944    | 0,161554 |
| CTX 6 mesi  | 0,142111       | 0,0677208 | 0,3065      | 0,116184 |
| CTX 12 mesi | 0,144579       | 0,0731538 | 0,348187    | 0,15873  |

| Tab 3       | Gruppo AI+META |         | Gruppo AI   |         |
|-------------|----------------|---------|-------------|---------|
|             | Media pg/ml    | DS      | Media pg/ml | DS      |
| PTH 0       | 59,3745        | 33,4383 | 39,3513     | 29,5766 |
| PTH 28 gg   | 111,181        | 75,6191 | 79,5995     | 50,6919 |
| PTH 3 mesi  | 85,2233        | 59,798  | 62,2806     | 35,7085 |
| PTH 6 mesi  | 81,7006        | 58,7143 | 64,2914     | 42,9941 |
| PTH 12 mesi | 74,6453        | 58,8503 | 44,3429     | 23,2602 |



| Tab 4         | Gruppo AI+META |         | Gruppo AI   |         |
|---------------|----------------|---------|-------------|---------|
|               | Media ng/ml    | DS      | Media ng/ml | DS      |
| VIT D 0       | 19,2785        | 8,19687 | 21,6933     | 11,8014 |
| VIT D 28 gg   | 20,7243        | 9,83035 | 17,26       | 9,30959 |
| VIT D 3 mesi  | 21,0812        | 12,7544 | 20,5144     | 8,74529 |
| VIT D 6 mesi  | 31,2872        | 19,0932 | 17,0464     | 7,00176 |
| VIT D 12 mesi | 28,3679        | 10,6086 | 23,9488     | 13,3514 |

| Tab 5         | Gruppo AI+META |         | Gruppo AI    |         |
|---------------|----------------|---------|--------------|---------|
|               | Media pmol/L   | DS      | Media pmol/L | DS      |
| scler 0       | 23,2671        | 5,84434 | 22,2717      | 8,38949 |
| scler 28 gg   | 25,1667        | 3,41554 | 22,8045      | 11,9868 |
| scler 3 mesi  | 24,7327        | 6,20395 | 28,3129      | 14,6066 |
| scler 6 mesi  | 28,41          | 6,71702 | 23,8129      | 6,69328 |
| scler 12 mesi | 30,2986        | 7,81682 | 23,3206      | 7,71304 |

| Tab 6       | Gruppo AI+META |         | Gruppo AI    |         |
|-------------|----------------|---------|--------------|---------|
|             | Media pmol/L   | DS      | Media pmol/L | DS      |
| dkk 0       | 20,4329        | 13,6263 | 23,1158      | 20,7722 |
| dkk 28 gg   | 22,8522        | 17,2575 | 19,1386      | 15,3782 |
| dkk 3 mesi  | 13,9991        | 9,30223 | 17,4882      | 11,9234 |
| dkk 6 mesi  | 22,3           | 12,5732 | 26,1305      | 21,9856 |
| dkk 12 mesi | 15,1879        | 5,76332 | 19,8265      | 15,779  |

## ***Discussione***

Lo scopo del presente studio è quello di valutare le variazioni di sclerostina e DKK1 in risposta a diversi dosaggi e ad una diversa schedula di somministrazione di acido zoledronico. E' infatti emerso dalla analisi della letteratura il ruolo fondamentale di queste due molecole per il coupling tra riassorbimento e neoapposizione ossea e quindi un loro potenziale ruolo in risposta ad una terapia antiriassorbitiva. Un recente lavoro di Gatti et al. ha analizzato l'effetto del trattamento con bisfosfonati per l'osteoporosi post menopausale sui livelli di DKK-1 e sclerostina. In particolare sono state valutate 107 donne in terapia con neridronato per via intramuscolare a diversi dosaggi (placebo, 12,5, 25 e 50 mg) per 12 mesi. Per quanto riguarda i livelli di sclerostina si è osservato un incremento stabile e significativo dei livelli ematici nei due gruppi trattati con dosi più elevate (25 e 50 mg). E' stata inoltre rilevata una correlazione negativa significativa ( $p=0,001$ ) tra i livelli di sclerostina e le variazioni percentuali della fosfatasi alcalina e tale correlazione rimaneva significativa ( $p=0,019$ ) anche analizzando i singoli gruppi separatamente e aggiustando per i livelli di CTX. Tenendo conto dell'effetto anti-anabolico della sclerostina sulla neoformazione ossea l'associazione tra il trattamento con neridronato e l'incremento dei livelli di sclerostina suggerisce che l'inibizione della neoformazione ossea che si osserva dopo prolungato trattamento con bisfosfonati potrebbe almeno in parte essere mediata proprio dall'aumento della sclerostina (71). Nel periodo di osservazione i livelli ematici di DKK-1 sono rimasti stabili in tutta la popolazione studiata. Il meccanismo attraverso il quale i bisfosfonati influenzano i livelli di sclerostina rimane ancora non ben definito ma un recente studio ha evidenziato la penetrazione dei bisfosfonati all'interno del network di canalicoli osteocitari in vivo, suggerendo che il legame, e verosimilmente l'effetto, dei bisfosfonati non sia limitato alla sola superficie ossea (69). In particolare si può ipotizzare un loro effetto diretto sulla popolazione osteocitaria. Gli osteociti sono gli orchestratori che

registrano il carico meccanico e i microdanni e lanciano l'appropriata risposta di riassorbimento o neoapposizione (52). Gli osteociti esprimono sia promotori della mineralizzazione che inibitori della mineralizzazione e della neoformazione ossea, sclerostina e DKK-1, allo scopo di mantenere l'equilibrio e di preservare la massa ossea. Gli osteociti inoltre sembrano giocare un ruolo importante nella regolazione degli osteoclasti, sia inibendo che attivando il riassorbimento osteoclastico. E' stato dimostrato che con il carico gli osteociti inviano segnali che inibiscono l'attivazione osteoclastica in specifiche circostanze (53). Al contrario osteociti danneggiati, apoptotici o morenti, soprattutto in assenza di carico, sembrano inviare segnali non identificati ai preosteoclasti e agli osteoclasti sulla superficie dell'osso per avviare il riassorbimento osseo. E' pertanto lecito ipotizzare che i bisfosfonati, agendo sulla popolazione osteocitaria, possano influenzare direttamente i livelli di sclerostina e DKK-1. E' peraltro possibile che l'inibizione del rimodellamento osseo indotto dai bisfosfonati attraverso un'inibizione più o meno persistente e completa dell'attività osteoclastica moduli una risposta da parte degli osteociti intesa a ripristinare un equilibrio tra neoformazione e riassorbimento osseo, riattivando quest'ultimo, verosimilmente attraverso un'iperespressione della sclerostina e/o del DKK-1. Ciò potrebbe spiegare alcune differenze rilevate con diverse dosi di bisfosfonati, con bisfosfonati di diversa potenza o, come nel nostro studio, con schedule di somministrazione, e quindi dosi cumulative, diverse. Ciò pertanto potrebbe spiegare anche la rapida, e in qualche modo inattesa, risposta del turnover osseo quando i bisfosfonati vengono somministrati in maniera intermittente o sospesi. Probabilmente i livelli di sclerostina accumulatisi spingono verso la rapida ripresa dell'attività osteoclastica. Infine è verosimile che l'effetto degli aminobisfosfonati sui livelli di DKK-1 e sclerostina sia dose dipendente e che possa essere influenzato dal tipo di bisfosfonato utilizzato, in particolare dall'affinità per l'idrossiapatite del bisfosfonato stesso che ne condiziona la

possibilità di penetrazione nel network dei canalicoli osteocitari e quindi la possibile interazione con gli osteociti stessi (69,71).

Abbiamo voluto pertanto analizzare le potenziali differenze di un diverso dosaggio e schedula di somministrazione di un aminobisfosfonato molto potente e molto affine come l'acido zoledronico sui livelli ematici di DKK-1 e sclerostina.

Per valutare quanto la persistenza dell'inibizione del riassorbimento osseo condizioni la risposta della sclerostina abbiamo selezionato due gruppi di pazienti in trattamento con diverse dosi di acido zoledronico: un gruppo di donne affette da carcinoma mammario non metastatico in terapia con inibitori dell'aromatasi che sono state trattate con acido zoledronico 4 mg/anno per il trattamento dell'osteoporosi iatrogena da inibitori dell'aromatasi e un gruppo di donne affette da carcinoma mammario con metastasi ossee che hanno seguito la schedula di somministrazione tipica del paziente con metastasi ossee che prevede la somministrazione di una fiala di acido zoledronico al mese per la prevenzione degli eventi scheletrici correlati (SRE). Le due popolazioni in studio presentavano livelli di CTX, sclerostina e DKK1 non significativamente diversi (Fig 16, 17 e 18) permettendoci di considerare le due popolazioni non diverse per livello di turnover osseo nonostante la presenza in una delle due popolazioni di un coinvolgimento scheletrico di malattia. I livelli di turnover osseo tra soggetti neoplastici con o senza metastasi ossee in letteratura non sono mai stati rilevati così diversi (tanto che non è possibile utilizzare ad esempio i livelli di CTX per sospettare la presenza di malattia metastatica alle ossa) e i marcatori del turnover osseo in entrambe le popolazioni esprimono il rimodellamento scheletrico dello scheletro non metastatico. Inoltre non vi sono dati in letteratura che dimostrino differenze nei livelli ematici di sclerostina e DKK-1 in queste due popolazioni né un ruolo diretto della popolazione osteocitaria nella fisiologia della metastasi ossea.

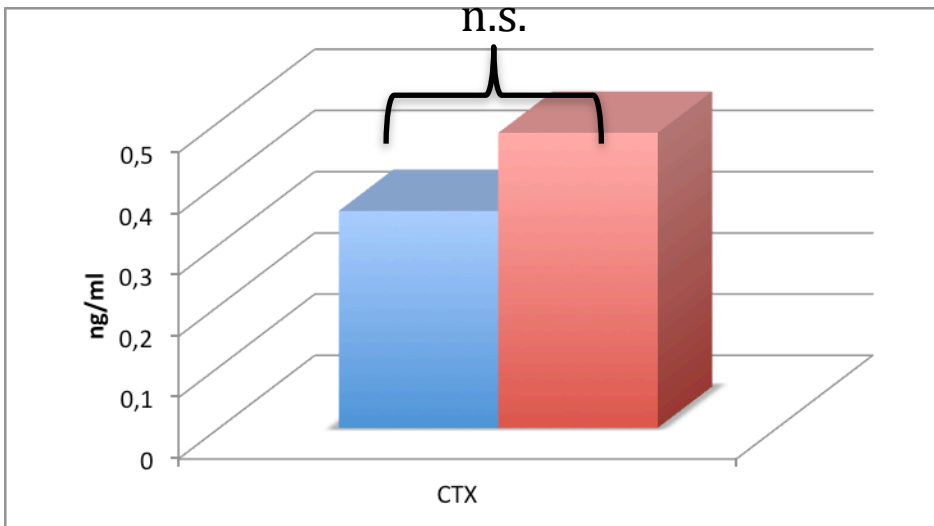


Fig 16: valori basali di CTX nei due gruppi. Gruppo AI+META azzurro, gruppo AI rosso.

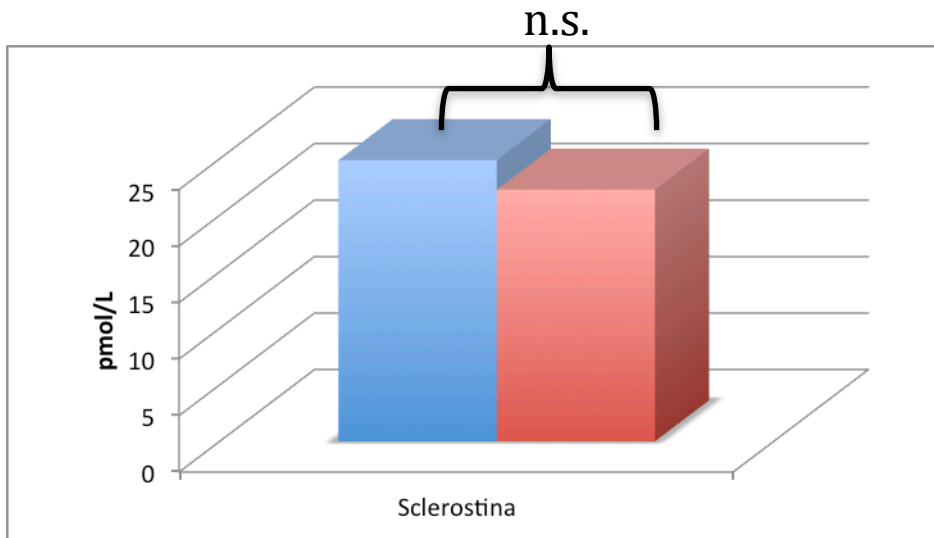


Fig 17: Valori basali di sclerostina nei due gruppi. Gruppo AI+META azzurro, gruppo AI rosso.

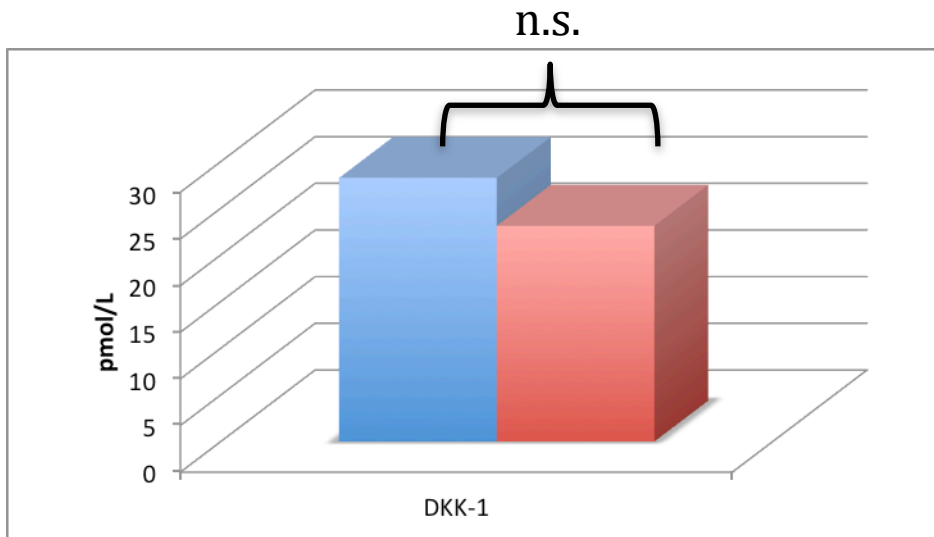


Fig 18: valori basali di DKK-1 nei due gruppi. Gruppo AI+META azzurro, gruppo AI rosso.

A conferma di tutto ciò le due popolazioni presentavano una risposta sovrapponibile in termini di inibizione del turnover osseo dopo la 1° somministrazione. In entrambi i gruppi abbiamo osservato, come atteso, un significativo calo dei valori di CTX (Fig 8) dopo la prima infusione di acido zoledronico con un calo percentuale sovrapponibile nei due gruppi e con un nadir non significativamente diverso. Pertanto, alla luce di tali risultati, possiamo considerare i due gruppi sovrapponibili per quanto riguarda l'espressione di CTX, sclerostina e DKK1 nonostante la presenza in uno dei due gruppi di metastasi ossee.

Nel nostro studio non abbiamo osservato nessuna variazione significativa dei livelli di DKK1 dopo trattamento con acido zoledronico né all'interno dei gruppi né confrontando i due gruppi tra loro. Questo dato è in linea con quanto descritto da Gatti et al. nel 2012 sebbene in un modello diverso di patologia e utilizzando il neridronato, un farmaco diverso come potenza (71)..

Per quanto riguarda i livelli di sclerostina nel nostro studio invece l'andamento è risultato significativamente diverso nei due gruppi. Nel gruppo AI abbiamo osservato un incremento dei livelli di sclerostina, seppur non significativo, a 3 mesi dalla somministrazione di

aminobisfosfonato per poi assistere ad un ritorno ai livelli basali. E' interessante accostare l'andamento dei livelli di sclerostina a quello dei livelli di CTX espressione del turnover osseo. Possiamo così ipotizzare come il transitorio aumento dei livelli di sclerostina sia conseguenza dell'inibizione del CTX a 28 giorni, tempo in cui viene raggiunto il nadir. Ciò potrebbe determinare quindi la una necessità di coupling tra neoformazione e riassorbimento o la necessità di sbloccare il rimodellamento eccessivamente inibito. L'elevazione dei livelli di sclerostina potrebbe essere determinante nel favorire la ripresa del turnover osseo, come si vede a 3 mesi dalla singola somministrazione di acido zoledronico nel gruppo AI.

Tale ipotesi viene ulteriormente rafforzata se analizziamo i dati del gruppo AI+META. In tale gruppo di pazienti i livelli ematici di sclerostina subiscono un incremento costante e significativo dal 6° mese in poi di osservazione. Una volta raggiunto il nadir del riassorbimento osseo a 28 giorni i valori di CTX rimangono stabili per tutta la durata dello studio per effetto delle somministrazioni ripetute mensili di farmaco che mantengono un costante blocco del turnover osseo. Se ipotizziamo che la sclerostina abbia un ruolo nel mantenere un certo grado di rimodellamento possiamo interpretare che l'aumento dei livelli di sclerostina sia la risposta degli osteociti alla costante inibizione osteoclastica provocata dall'acido zoledronico. Inoltre tale ipotesi è in linea con i recenti dati pubblicati da Gatti et al. (71,72) che ipotizzano un ruolo del DKK1 e della sclerostina nel creare appunto un riaccoppiamento del remodelling osseo dopo trattamento con potenti antiriassorbitivi come il denosumab o l'acido zoledronico. Pertanto l'innalzamento dei livelli di sclerostina può diventare un marker sensibile di una marcata e/o protratta soppressione del rimodellamento e di uno stimolo alla ripresa del turnover. Alla luce di queste considerazioni i livelli ematici di sclerostina potrebbero avere alcune interessanti implicazioni cliniche nei pazienti metastatici. Attualmente le linee guida internazionali prevedono il trattamento dei pazienti con metastasi ossee con acido zoledronico una fiala

al mese per almeno due anni (73). L'efficacia nella riduzione degli eventi scheletrici correlati (SRE) è infatti dimostrata nei primi due anni di trattamento mentre non vi sono dati certi sull'efficacia nella prosecuzione del trattamento a lungo termine. Inoltre il rischio di eventi avversi, in particolare di osteonecrosi della mandibola, aumenta all'aumentare della dose cumulativa di aminobisfosfonato per cui al termine dei due anni di terapia la prosecuzione è affidata al giudizio clinico. Soprattutto si ritiene comunemente che proprio per la lunga permanenza nel tessuto osseo dell'acido zoledronico e per le alte dosi somministrate in un anno o due di terapia vi sia la razionale possibilità di ridurre o sospendere il trattamento sfruttando "un effetto coda". Ciò anche stimolati da ragioni di safety come l'ONJ o le fratture atipiche, effetti indesiderati connessi alle dosi somministrate di acido zoledronico. Nello studio ZOOM una popolazione di pazienti con metastasi ossee da tumori solidi dopo un anno di schedula classica di acido zoledronico (4 mg/mese) è stata randomizzata a ricevere per un anno 4 mg ogni 3 mesi o mantenere la schedula classica (74). Sorprendentemente il turnover osseo nel gruppo con schedula ridotta già dopo soli 3 mesi aumentava significativamente rispetto alla schedula mensile indicando come anche solo riducendo la dose, lo stimolo alla ripresa del turnover è così forte da far ripartire il rimodellamento, cosa che con soppressione inferiore (4 mg/ anno) non avviene (Fig 19). E tanto più profondo e completo è stato il blocco del turnover tanto più rapida e intensa sarà al sua ripresa alla sospensione del farmaco e quindi del blocco, una specie di rebound esattamente come ci insegna l'esperienza con la terapia estrogenica sostitutiva o con il più recente denosumab (75). Tutto c'ò potrebbe essere sostenuto e guidato dalla sclerostina, che in prospettiva potrebbe diventare, se i nostri dati verranno confermati, un utile fattore predittivo di "fine effetto coda" della terapia con bisfosfonati dopo un blocco protratto.



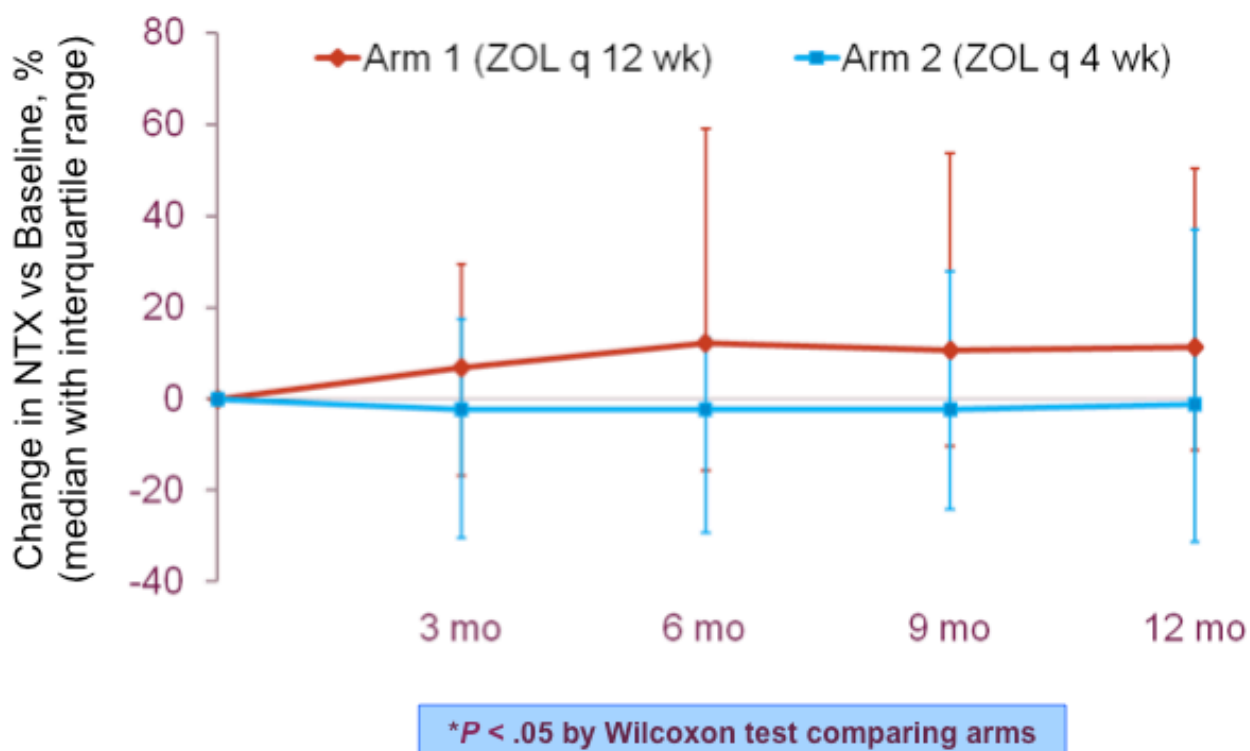


Fig 19: Variazioni percentuali dei livelli di NTX nei due gruppi di studio dello studio ZOOM. In rosso pazienti trattati con acido zoledronico ogni 3 mesi, in azzurro pazienti trattati con acido zoledronico a cadenza mensile.

L'analisi dei livelli ematici di sclerostina in questi pazienti, potrebbe permettere di definire meglio il corretto timing di somministrazione dell'antiriassorbitivo.

## ***Conclusioni***

Il nostro studio documenta una risposta significativamente divergente tra due diverse posologie/schedule di somministrazione di acido zoledronico. In altri termini un diverso comportamento dello sclerostina in base ad una diversa persistenza della soppressione del turnover osseo. In particolare nei pazienti metastatici all'osso, trattati con alte dosi di acido zoledronico vi è un significativo aumento dei livelli di sclerostina ematici a fronte di una persistente inibizione del turnover osseo. Nei pazienti trattati con una sola fiala di acido zoledronico all'anno si assiste invece ad un iniziale aumento della sclerostina che ritorna poi ai livelli basali in corrispondenza della ripresa del turnover osseo. Non abbiamo invece osservato variazioni significative nei livelli di DKK-1 né nel gruppo AI né nel gruppo AI+META.

Dai risultati emersi dal nostro studio possiamo pertanto concludere che:

- 1) La persistente inibizione del turnover osseo dovuta alla terapia ad alte dosi provoca un completo disaccoppiamento tra neoformazione e riassorbimento. Verosimilmente gli osteociti "reagiscono" facendo innalzare la sclerostina nel tentativo di controbilanciare l'inibizione osteoclastica per riportare alla normalità il processo di remodelling osseo. I nostri dati non permettono di chiarire se l'effetto possa essere diretto sugli osteociti o indiretto secondario al blocco osteoclastico.
- 2) Come ipotesi di lavoro è verosimile che l'aumento dei livelli di sclerostina sia alla base e quindi predica la ripresa del turnover osseo alla sospensione della somministrazione mensile di aminobisfosfonato o con denosumab.

## ***Bibliografia***

- 1) van Buchem FS, Hadders HN, Ubbens R. An uncommon familial systemic disease of the skeleton: hyperostosis corticalis generalisata familiaris. *Acta Radiol* 1955; 44:109–120.
- 2) Hamersma H, Gardner J, Beighton P. The natural history of sclerosteosis. *Clin Genet* 2003; 63:192–197.
- 3) Beighton P, Barnard A, Hamersma H, van der Wouden A. The syndromic status of sclerosteosis and van Buchem disease. *Clin Genet* 1984; 25:175–181.
- 4) Beighton P. Sclerosteosis. *J Med Genet* 1988; 25:200–203.
- 5) Gardner JC, van Bezooijen RL, Mervis B, Hamdy NAT, Lo`wik CWGM, Hamersma H, Beighton P, Papapoulos SE. Bone mineral density in sclerosteosis; affected individuals and gene carriers. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:6392–6395.
- 6) van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Lo`wik CWGM. SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:319–327.
- 7) van Bezooijen RL, Papapoulos SE, Hamdy NAT, Lowik CWGM. SOST/sclerostin; an osteocyte-derived inhibitor of bone formation that antagonizes canonical Wnt signaling. In: Raisz LG, Martin TJ, Bilezikian JP (eds) *Principles of bone biology*. Academic Press, New York, 2008; pp 139–152.
- 8) Balemans W, Ebeling M, Patel N, van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, van den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill SC, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dikkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foerzler D, van Hul W. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet* 2001; 10:537–543.
- 9) Brunkow ME, Gardner JC, van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE,

Zhao L, Sabo PJ, Fu Y, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P, Galas D, Hamersma H, Beighton P, Mulligan J. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 2001; 68:577–589.

10) Balemans W, Cleiren E, Siebers U, Horst J, van Hul W. A generalized skeletal hyperostosis in two siblings caused by a novel mutation in the SOST gene. *Bone* 2005; 36:943–947.

11) Kim CA, Honjo R, Bertola D, Albano L, Oliveira L, Jales S, Siqueira J, Castilho A, Balemans W, Piters E, Jennes K, van Hul W. A known SOST gene mutation causes sclerosteosis in a familial and an isolated case from Brazilian origin. *Genet Test* 2008; 12:475–479.

12) Loots GG, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, Ovcharenko D, Plajzer-Frick I, Rubin EM. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in van Buchem disease. *Genome Res* 2005; 15:928–935.

13) van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Løwik CWGM. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 2004; 199:805–814.

14) van Bezooijen RL, Bronckers AL, Gortzak RA, Hogendoorn PC, van der Wee-Pals L, Balemans W, Oostenbroek HJ, van Hul W, Hamersma H, Dijkers FG, Hamdy NAT, Papapoulos SE, Løwik CWGM. Sclerostin in mineralized matrices and van Buchem disease. *J Dent Res* 2009; 88:569–574.

15) Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 2003; 22:6267–6276.

16) Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Løwik CWGM, Reeve J. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone

formation. *FASEB J* 2005; 19:1842–1844.

17) Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, Manolagas SC, Jilka RL. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* 2005; 146:4577–4583.

18) Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, Latham JA. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 2004; 35:828–835.

19) Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Paszty C. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res* 2008; 23:860–869.

20) Lin C, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J, Li Y, Feng G, Gao X, He L. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading via antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res* 2009; 24:1651–1661.

21) Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE, Turner CH. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 2008; 283:5866–5875.

22) Moustafa A, Sugiyama T, Saxon LK, Zaman G, Sunter A, Armstrong VJ, Javaheri B, Lanyon LE, Price JS. The mouse fibula as a suitable bone for the study of functional adaptation to mechanical loading. *Bone* 2009; 44:930–935.

23) Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127:469-80.

24) Johnson ML, Kamel MA. The Wnt signaling pathway and bone metabolism. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:376-82.

- 25) Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bonemass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006;116:1202-9.
- 26) Miller JR. The Wnts. *Genome Biol* 2002;3:REVIEWS3001.
- 27) Goldring SR, Goldring MB. Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides. *Nat Med* 2007;13:133-4.
- 28) Ai M, Heeger S, Bartels CF, Schelling DK. Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Am J Hum Genet* 2005;77:741-53.
- 29) Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002;346:1513-21.
- 30) Baron R, Rawadi G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 2007;148:2635-43.
- 31) Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 2005;8:751-64.
- 32) Li J, Sarosi I, Cattley RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, Morony S, Adamu S, Geng Z, Qiu W, Kostenuik P, Lacey DL, Simonet WS, Bolon B, Qian X, Shalhoub V, Ominsky MS, Zhu Ke H, Li X, Richards WG. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone*. 2006; 39:754–66
- 33) MacDonald BT, Joiner DM, Oyserman SM, Sharma P, Goldstein SA, He X, et al. Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice. *Bone* 2007;41:331-9.
- 34) Joseph J. Pinzone, Brett M. Hall, Nanda K. Thudi, Martin Vonau, Ya-Wei Qiang, Thomas J. Rosol, John D. Shaughnessy Jr. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *BLOOD* 2009; Volume 113, Number 3.

- 35) Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy Jr JD. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2003; 349:2483–94.
- 36) Kaiser M, Mieth M, Liebisch P, Oberländer R, Rademacher J, Jakob C, Kleeberg L, Fleissner C, Braendle E, Peters M, Stover D, Sezer O, Heider U. Serum concentrations of DKK-1 correlate with the extent of bone disease in patients with multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2008; 80:490–4.
- 37) Ng AC, Khosla S, Charatchoenwithaya N, Kumar SK, Achenbach SJ, Holets MF, McCready LK, Melton LJ 3rd, Kyle RA, Rajkumar SV, Drake MT. Bone microstructural changes revealed by high-resolution peripheral quantitative computed tomography imaging and elevated DKK1 and MIP-1 levels in patients with MGUS. *Blood*. 2011; 118:6529-34.
- 38) Naot D, Bava U, Matthews B, Callon KE, Gamble GD, Black M, et al. Differential gene expression in cultured osteoblasts and bone marrow stromal cells from patients with Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 2007;22:298-309.
- 39) Hall CL, Kang S, MacDougald OA, Keller ET. Role of Wnts in prostate cancer bone metastases. *J Cell Biochem* 2006;97:661-72.
- 40) Anastasilakis AD, Polyzos SA, Avramidis A, Toulis KA, Papatheodorou A, Terpos E. The effect of teriparatide on serum Dickkopf- 1 levels in postmenopausal women with established osteoporosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010;72:752-7.
- 41) Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423:337–342.
- 42) Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289:1504–8.
- 43) Seeman E, Delmas PD. Bone quality: the material and structural basis of bone

strength and fragility. *N Engl J Med* 2006; 354:2250–2261.

44) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:3597–3602.

45) Udagawa N. The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab* 2003; 21:337–343.

46) Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93:165–176.

47) Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol* 2007; 170:427–435.

48) Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev* 2005; 19:1093–1104.

49) Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. Playing with bone and fat. *J Cell Biochem* 2006; 98:251–266.

50) Manolagas SC, Parfitt AM. What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21:369–374.

51) Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:1–8.

52) Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann NY Acad Sci* 2007;



1116:281–290.

53) Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 2008; 42:606–615.

54) Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene* 2006; 367:1–16.

55) van Beek E, Lowik C, van der Pluijm G, Papapoulos S. The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: a clue to the mechanism of action of nitrogencontaining bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 1999; 14:722–729.

56) Byrjalsen I, Leeming DJ, Qvist P, Christiansen C, Karsdal MA. Bone turnover and bone collagen maturation in osteoporosis: effects of antiresorptive therapies. *Osteoporos Int* 2008; 19:339–348.

57) Gourion-Arsiquaud S, Allen MR, Burr DB, Vashishth D, Tang SY, Boskey AL. Bisphosphonate treatment modifies canine bone mineral and matrix properties and their heterogeneity. *Bone* 2010; 46:666–672.

58) D'Aoust P, McCulloch CA, Tenenbaum HC, Lekic PC. Etidronate (HEBP) promotes osteoblast differentiation and wound closure in rat calvaria. *Cell Tissue Res* 2000; 302:353–363.

59) Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone* 1998; 22:455–461.

60) Garcia-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farre M, Diez A, Marinoso ML, Carbonell J, Mellibovsky L, Nogues X, Ballester J, Aubia J. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone* 1998; 22:233–239.

- 61) Recker RR, Delmas PD, Halse J, Reid IR, Boonen S, Garcia-Hernandez PA, Supronik J, Lewiecki EM, Ochoa L, Miller P, Hu H, Mesenbrink P, Hartl F, Gasser J, Eriksen EF. Effects of intravenous zoledronic acid once yearly on bone remodeling and bone structure. *J Bone Miner Res* 2008; 23:6–16.
- 62) Bravenboer N, Papapoulos SE, Holzmann P, Hamdy NA, Netelenbos JC, Lips P. Bone histomorphometric evaluation of pamidronate treatment in clinically manifest osteoporosis. *Osteoporos Int* 1999; 9:489–493.
- 63) Chavassieux PM, Arlot ME, Reda C, Wei L, Yates AJ, Meunier PJ. Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest* 1997; 100:1475–1480.
- 64) Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999; 104:1363–1374.
- 65) Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem* 2002; 277:8648–8657.
- 66) Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Biol Chem* 2005; 280:7317–7325.
- 67) Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone* 2006; 39:443–452.
- 68) Plotkin LI, Bivi N, Bellido T. A bisphosphonate that does not affect osteoclasts prevents osteoblast and osteocyte apoptosis and the loss of bone strength induced by glucocorticoids in mice. *Bone* 2011; 49:122–127.
- 69) Roelofs AJ, Coxon FP, Ebetino FH, Lundy MW, Henneman ZJ, Nancollas GH, Sun S, Blazewska KM, Bala JL, Kashemirov BA, Khalid AB, McKenna CE, Rogers MJ.

Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res* 2010; 25:606–616.

70) Ebetino FH, Roelofs A, Boyde A, Lundy M, McKenna C, Blazewska K, Sun S, Kashemirov B, Henneman Z, Nancollas G, Russell R, Rogers M, Coxon F. Analyzing the skeletal distribution and cellular uptake of fluorescently-labeled bisphosphonate analogues in vivo. *JBMR (ASBMR annual meeting)* 2009: A09001962.

71) Davide Gatti, Ombretta Viapiana, Silvano Adami, Luca Idolazzi, Elena Fracassi, Maurizio Rossini. Bisphosphonate treatment of postmenopausal osteoporosis is associated with a dose dependent increase in serum sclerostin. *Bone* 2012; 50: 739–742.

72) Davide Gatti, Ombretta Viapiana, Elena Fracassi, Luca Idolazzi, Carmela Dartizio, Maria Rosaria Povino, Silvano Adami, Maurizio Rossini. Sclerostin and DKK1 in postmenopausal osteoporosis treated with denosumab. *JBMR* 2012. DOI 10.1002/jbmr.1681.

73) linee guida AIOM: [WWW.AIOM.it](http://WWW.AIOM.it)

74) Dino Amadori, Massimo Aglietta, Barbara Alessi, Lorenzo Gianni, Toni Ibrahim, Gabriella Farina, Fernando Gaion, Francesco Bertoldo, Daniele Santini, Roberta Rondena, Paola Bogani, Carla Ripamonti . Efficacy and safety of quarterly versus monthly zoledronic acid for prolonged treatment in patients with bone metastases from breast cancer: results from the ZOOM randomized clinical trial. *Lancet oncology* 2013 in press.

75) Miller PD, Bolognese MA, Lewiecki EM, McClung MR, Ding B, Austin M, Liu Y, San Martin J; Amg Bone Loss Study Group. Effect of denosumab on bone density and turnover in postmenopausal women with low bone mass after long-term continued, discontinued, and restarting of therapy: a randomized blinded phase 2 clinical trial. *Bone* 2008; 43(2):222-9.