

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E
CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

Direttore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

TESI DI LAUREA

Utilizzo dei marcatori di turnover osseo nella
diagnosi di Ipofosfatasia dell'adulto

RELATORE: Ch.mo Sandro Giannini

CORRELATORE: Dott. Gaetano Paride
Arcidiacono

Laureanda: Rachele Sanna

Anno Accademico: 2022/2023

SOMMARIO

ABSTRACT	6
RIASSUNTO	7
I. IL PROCESSO DI MINERALIZZAZIONE OSSEA E PATOLOGIE ASSOCIATE	11
1. MODELLAMENTO E RIMODELLAMENTO OSSEO	11
1.1 VIE DI SEGNALE BIOCHIMICHE	13
1.2 FASI DEL RIMODELLAMENTO OSSEO	14
2. RIMODELLAMENTO OSSEO ANORMALE	15
2.1 MASSA OSSEA AUMENTATA.....	15
2.2 MASSA OSSEA RIDOTTA.....	16
3. REGOLATORI SISTEMICI E LOCALI DELLE CELLULE DEL TESSUTO OSSEO	18
3.1 ORMONE PARATIROIDEO	18
3.2 CALCITRIOLO.....	18
3.3 STEROIDI SESSUALI.....	19
3.4 CALCITONINA	19
3.5 ORMONE DELLA CRESCITA E IGF	19
3.6 TGF-BETA.....	20
3.7 GLUCOCORTICOIDI	20
3.8 ORMONI TIROIDEI.....	20
3.9 FATTORI DI CRESCITA DEI FIBROBLASTI	20
3.10 ALTRI	20
4. PATOLOGIE ASSOCIATE AD ALTERATO RIMODELLAMENTO OSSEO	22
4.1 OSTEOPOROSI.....	22

4.2 OSTEOMALACIA.....	27
II. GENERALITA' SULL'IPOFOSFATASIA	33
1. DEFINIZIONE.....	33
2. EPIDEMIOLOGIA	38
3. MANIFESTAZIONI CLINICHE	38
3.1 FRATTURE.....	40
3.2 DOLORE MUSCOLO-SCHELETRICO	44
3.3 COMPLICANZE NEUROLOGICHE	44
3.5 COMPLICANZE RENALI.....	45
3.6 COMPLICANZE RESPIRATORIE.....	45
3.7 COMPLICANZE DENTALI.....	45
4. DIAGNOSI.....	47
4.1 INDAGINI DI LABORATORIO	47
4.2 INDAGINI RADIOGRAFICHE	55
4.3 DENSITA' MINERALE OSSEA	56
4.4 TOMOGRAFIA QUANTITATIVA COMPUTERIZZATA (QCT) E RM SPINALE	57
4.5 GENETICA DELL'IPOFOSFATASIA.....	58
5. TERAPIA DELL'IPOFOSFATASIA.....	60
III. CENNI SUI FARMACI ANTIRIASSORBITIVI E ANDAMENTO DEI MARCATORI DI RIMODELLAMENTO OSSEO IN CORSO DI TERAPIA.....	62
1. BISFOSFONATI	62
2. DENOSUMAB.....	63
3. ANDAMENTO DEI MARCATORI DI RIMODELLAMENTO OSSEO (BTM) IN CORSO DI TERAPIA CON FARMACI ANTIRIASSORBITIVI	64

IV. INTRODUZIONE ALLO STUDIO.....	69
V. OBIETTIVO.....	71
VI. PAZIENTI E METODI.....	71
VII. RISULTATI.....	75
VIII. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	85
IX. BIBLIOGRAFIA.....	87

ABSTRACT

Introduction: Hypophosphatasia (HPP) is a rare inherited disorder of bone metabolism, characterized by low serum alkaline phosphatase (ALP). However, comparable ALP levels may be observed in patients experiencing bone fragility fractures from other causes. The aim of this study was to verify if differences in well-defined bone turnover markers (BTM) may help to distinguish patients with Adult HPP from osteoporotic patients treated with potent antiresorptive drugs, with similar clinical pattern and low ALP activity.

Methods: In this multicenter observational retrospective study, we enrolled adult patients with low ALP activity (≤ 50 IU/L) which were divided into two groups: 1) patients with a confirmed diagnosis of HPP; 2) patients with osteoporosis, treated with antiresorptive drugs (zoledronic acid or denosumab). BTM, such as C-terminal telopeptide of Type I collagen (CTX), procollagen type 1 amino-terminal propeptide (P1NP), total ALP and bone ALP isoenzyme (bALP), were dosed in all patients.

Results: A total of 91 patients were included; 23 of them were classified in Group 1 and 68 in Group 2. We observed that HPP patients compared with controls had higher CTX ($p < 0.001$) and P1NP ($p < 0.001$) levels and lower ALP activity ($p < 0.001$). All the following BTM ratios were significantly lower in HPP patients as compared to control subjects: ALP/P1NP ratio (0.62 ± 0.46 vs 2.86 ± 1.35 , $p < 0.001$), bALP/P1NP ratio (0.11 ± 0.07 vs 0.44 ± 0.28 , $p < 0.001$), ALP/CTX ratio (0.19 ± 0.18 vs 0.88 ± 0.54 , $p < 0.001$) and bALP/CTX ratio (0.04 ± 0.03 vs 0.12 ± 0.08 , $p < 0.001$). In addition, in a ROC curve analysis, we observed that ALP/P1NP best performed in discriminating between HPP and control patients (AUC 0.977, $p < 0.001$), with an optimal cut-off value of 1.114.

Conclusions: In the setting of low serum ALP levels, BTM ratios may be useful to distinguish between patients with HPP and osteoporotic patients treated with antiresorptive drugs, thus improving the diagnostic process for HPP.

RIASSUNTO

Introduzione: L'ipofosfatasia (HPP) è una rara malattia ereditaria metabolica dell'osso, caratterizzata da una bassa attività di fosfatasi alcalina totale sierica (ALP). Tuttavia, livelli analoghi di ALP possono osservarsi in pazienti che presentano fragilità scheletrica da altre cause. L'obiettivo di questo studio è di verificare se differenze di specifici marcatori di rimodellamento scheletrico (BTM) possano aiutare a distinguere pazienti adulti con HPP da soggetti osteoporotici in terapia con potenti farmaci antiriassorbitivi, con caratteristiche cliniche simili e bassi valori di ALP.

Pazienti e Metodi: In questo studio retrospettivo osservazionale multicentrico, sono stati arruolati pazienti adulti con bassi valori di ALP (≤ 50 IU/L) e sono stati divisi in 2 gruppi: 1) pazienti con diagnosi confermata di HPP; 2) pazienti con osteoporosi, trattati con farmaci antiriassorbitivi (acido zoledronico o denosumab). Alcuni BTM, quali telopeptide C-terminale del collagene di tipo I (CTX), il propeptide amino-terminale del procollagene tipo 1 (P1NP), ALP totale e l'isoenzima osseo di ALP (bALP), sono stati dosati in tutti i pazienti.

Risultati: Sono stati inclusi un totale di 91 pazienti; 23 fanno parte del Gruppo 1 e 68 del Gruppo 2. Abbiamo osservato che i soggetti con HPP confrontati con i controlli avevano valori più elevati di CTX ($p < 0.001$) e di P1NP ($p < 0.001$) ed una minore attività di ALP totale ($p < 0.001$). Tutti i seguenti rapporti tra marcatori di rimodellamento scheletrico erano significativamente più bassi nei pazienti con HPP rispetto ai controlli: ALP/P1NP ratio (0.62 ± 0.46 vs 2.86 ± 1.35 , $p < 0.001$), bALP/P1NP ratio (0.11 ± 0.07 vs 0.44 ± 0.28 , $p < 0.001$), ALP/CTx ratio (0.19 ± 0.18 vs 0.88 ± 0.54 , $p < 0.001$) e bALP/CTx ratio (0.04 ± 0.03 vs 0.12 ± 0.08 , $p < 0.001$). Inoltre, in una analisi con curve ROC, abbiamo osservato che il rapporto migliore per discriminare tra soggetti con HPP e controlli è quello tra ALP/P1NP (AUC 0.977, $p < 0.001$), con un valore ottimale di cut-off di 1.114.

Conclusioni: Tra i pazienti con fragilità scheletrica che presentano bassi valori di ALP totale, i rapporti tra i marcatori di rimodellamento scheletrico, possono rappresentare un valido ausilio per distinguere pazienti affetti da HPP da quelli

osteoporotici trattati con farmaci antiriassorbitivi. Ciò può migliorare il processo diagnostico dei pazienti con HPP.

PAROLE CHIAVE:

Ipofosfatasia, ALP, bALP, P1NP, CTX

ABBREVIAZIONI:

ALP:	Fosfatasi alcalina totale
bALP:	Fosfatasi alcalina ossea
BMD:	Densità minerale ossea (bone mineral density)
BP:	Bisfosfonati
BTM:	Marcatori di rimodellamento osseo (bone turnover marker)
CI:	Intervallo di confidenza
CTX:	Telopeptide C-terminale
DEXA:	Densitometria ossea (Dual Energy X-ray Absorptiometry)
e.v.:	Endovena
GABA:	Acido GammaAmminoButirrico
Gene ALPL:	Gene che codifica per fosfatasi alcalina non tessuto specifica
GFR:	Velocità di filtrazione glomerulare (Glomerular Filtration Rate)
HPP:	Ipofosfatasia
IU:	Unità internazionali
μSV:	Millisievert
OR:	Odds Ratio
P1NP:	Propeptide Aminoterminale Procollagene Tipo 1
PEA:	Fosfoetanolamina
PL:	Piridossale
PLP:	Piridossal 5- fosfato
PPi:	Pirofosfato inorganico
PTH:	Paratormone
QCT:	Tomografia computerizzata quantitativa
QUS:	Ultrasonometria ossea quantitativa
RANK	Receptor activator of nuclear factor k B
RANKL	Ligand of receptor activator of nuclear factor k B
s.c:	Sottocutanea
SD:	Deviazione standard

TNSALP: Isoenzima tessuto non specifico della fosfatasi alcalina
UAC Area sotto la curva

I. IL PROCESSO DI MINERALIZZAZIONE OSSEA E PATOLOGIE ASSOCIATE

1. MODELLAMENTO E RIMODELLAMENTO OSSEO

L'osso è costituito da una matrice ordinata di collagene su cui si depositano calcio e fosfato sotto forma di cristalli di idrossiapatite. Il collagene viene depositato a strati e rafforzato da più legami incrociati all'interno e tra le molecole di collagene a triplo filamento.

La matrice contiene anche proteine non collagene che sono importanti per controllare la mineralizzazione e rafforzare l'impalcatura del collagene (1). Le proteine leganti il calcio includono l'osteocalcina (proteina Gla dell'osso) e la proteina Gla della matrice che contengono gamma-carbossiglutamato e, come molti fattori della coagulazione, dipendono dalla vitamina K. L'osteocalcina migliora la qualità e la forza ossea modulando l'allineamento dei cristalli biologici di apatite paralleli alle fibrille di collagene. Tuttavia, non svolge alcun ruolo nella formazione ossea, nel riassorbimento o nell'acquisizione di massa ossea (2). La scialoproteina ossea e l'osteopontina legano sia il calcio che il collagene e possono svolgere un ruolo nell'adesione degli osteoclasti alla superficie ossea.

La componente minerale ossea è composta da cristalli di idrossiapatite complessi, spesso incompleti. I cristalli possono contenere carbonati, fluoruri e vari oligoelementi, a seconda dell'ambiente in cui cresce lo scheletro. Sono relativamente piccoli, il che è appropriato per una struttura capace di subire sollecitazioni riportando microdanni minimi. La mineralizzazione è probabilmente limitata non solo dall'impaccamento delle fibre di collagene, ma anche da sostanze presenti sulla superficie dei cristalli ossei come il pirofosfato.

Durante lo sviluppo e la crescita, lo scheletro progressivamente ottiene la sua forma e dimensione mediante la rimozione dell'osso da un sito e la deposizione in un altro; questo processo è chiamato modellamento. Dopo che lo scheletro ha raggiunto la maturità, la rigenerazione continua sotto forma di

sostituzione periodica del vecchio osso con il nuovo nella stessa posizione. Questo processo è chiamato rimodellamento ed è responsabile della completa rigenerazione dello scheletro adulto ogni 10 anni.

La maggior parte dello scheletro adulto è costituita da osso che viene periodicamente rimodellato da unità anatomiche contenenti osteoclasti e osteoblasti chiamate unità ossee multicellulari (*Bone Multicellular Units* o BMU) (3). Il rimodellamento dello scheletro in crescita richiede la coordinazione spaziale e temporale di osteoclasti e osteoblasti di diverse BMU, nonostante ciascuna di queste possa trovarsi in uno stato funzionale diverso rispetto alle BMU circostanti.

Una singola BMU è lunga circa 1-2 mm e larga 0,2-0,4 mm ed è composta da gruppi di osteoclasti anteriormente e posteriormente, capillari vascolari centralmente, infine da nervi e tessuto connettivo associato. Negli adulti sani, ogni anno vengono attivate 3-4 milioni di BMU, con circa 1 milione in esecuzione alla volta. Ogni BMU inizia in una posizione e in un momento specifici, progredisce verso il target, ovvero l'area dell'osso che necessita di sostituzione, e infine si ferma a una distanza variabile oltre il target.

Nell'osso corticale, le BMU migrano attraverso l'osso stesso, scavando e sostituendo tunnel (denominati "canali di Havers"). Nell'osso spongioso, invece, le BMU migrano attraverso la superficie trabecolare, scavando e spostando i solchi (formando i cosiddetti "osti di Howship"). In entrambe le situazioni, le componenti cellulari del BMU mantengono relazioni spaziali e temporali ben coordinate tra loro. Gli osteoclasti si attaccano all'osso e lo rimuovono mediante processi di acidificazione e digestione proteolitica. Man mano che il BMU progredisce, gli osteoclasti lasciano il sito di riassorbimento e gli osteoblasti migrano per coprire l'area esposta e iniziano la nuova formazione ossea secernendo materiale osteoide, che alla fine viene mineralizzato e diventa nuova matrice ossea. Nell'individuo adulto sano, il riassorbimento osseo e la formazione ossea sono strettamente bilanciati e la quantità di osso formato nel nuovo BMU è uguale alla quantità di osso riassorbito.

In prossimità di gruppi di osteoclasti e osteoblasti che rimodellano l'osso si trovano vari capillari, che possono essere la via attraverso la quale i precursori degli osteoclasti raggiungono i siti bersaglio per il rimodellamento. Nell'osso

spongioso, i vasi sanguigni si trovano adiacenti a un “baldacchino cellulare” piatto che separa il BMU dal midollo osseo (4). L'ipossia prodotta dall'espansione della matrice ossea stimola l'espressione del fattore di crescita endoteliale da parte degli osteoblasti, innescando un programma angiogenico (5–7).

1.1 VIE DI SEGNALE BIOCHIMICHE

I condrociti e gli osteociti ipertrofici sono le principali fonti di attivazione di RANKL (Ligand of receptor activator of nuclear factor κ B), deputato a regolare il riassorbimento della cartilagine mineralizzata e il rimodellamento osseo (8,9). La velocità nel riassorbimento della matrice è influenzata da cellule in grado di rilevare lo stress meccanico o il danno alla matrice stessa (10,11), nonché dalle capacità di scavo e riparazione di specifiche regioni ossee. Allo stesso modo, i condrociti ipertrofici possono percepire segnali che avviano la trasformazione della struttura cartilaginea nell'osso trabecolare. In entrambi i casi, si è osservato come le cellule che meglio riconoscono la necessità di rimozione della matrice sono adibite al controllo diretto del processo.

Negli ultimi anni, è stato dimostrato che le cellule ossee hanno la capacità di generare RANKL e sclerostina, che rivestono diverse funzioni: rilevano l'osso usurato, indirizzano gli osteoclasti (e possibilmente gli osteoblasti) nei siti in cui è necessario il rimodellamento e regolano rispettivamente la formazione di osteoclasti e osteoblasti. Inoltre, se da un lato le forze meccaniche supportano la sopravvivenza degli osteociti, una loro diminuzione porta alla perdita dei segnali necessari al supporto della sopravvivenza degli osteociti, determinandone quindi l'apoptosi.

Inoltre, gli osteociti sono mediatori chiave dell'adattamento omeostatico dell'osso alle forze meccaniche. La rottura dell'integrità della rete degli osteociti porta a un rimodellamento inappropriato, influenzando la forza ossea indipendentemente dai cambiamenti nella massa ossea (12). Oltre a ciò, gli osteociti controllano e regolano la mineralizzazione della matrice generata dagli osteoblasti secernendo fattori come la fosfoglicoproteina della matrice extracellulare (MEPE) e il fattore di crescita dei fibroblasti 23 (FGF23).

1.2 FASI DEL RIMODELLAMENTO OSSEO

1. Riassorbimento: il ciclo di rimodellamento osseo inizia con la formazione e il reclutamento di osteoclasti in siti specifici. In condizioni fisiologiche, questo sito può richiedere una riparazione, ma in condizioni patologiche può essere attaccato accidentalmente e in modo inappropriato.
2. Inversione: dopo che il riassorbimento degli osteoclasti è completo, c'è una fase di inversione in cui le cellule mononucleate, presumibilmente della linea cellulare di monociti/macrofagi, compaiono sulla superficie ossea. Queste cellule preparano la superficie affinché nuovi osteoblasti possano iniziare la formazione ossea: uno strato di materiale ricco di glicoproteine si deposita sulla superficie riassorbita (la cosiddetta "linea di cemento"), su cui possono attaccarsi nuovi osteoblasti. L'osteopontina è una proteina chiave in questo processo (13). Le cellule nel sito di inversione possono anche fornire segnali per la differenziazione e la migrazione degli osteoblasti.
3. Formazione: la fase di formazione procede con varie successioni di osteoblasti che si depositano nell'osso, fino a quando l'osso riassorbito non viene completamente sostituito e le nuove unità strutturali ossee sono completamente formate. Una volta completata questa fase, la superficie è ricoperta da cellule di rivestimento appiattite; segue un lungo periodo di riposo di bassa attività cellulare sulla superficie ossea prima dell'inizio di un nuovo ciclo di rimodellamento.
4. Mineralizzazione: gli osteoidi di nuova formazione iniziano a mineralizzarsi dopo circa due settimane. Questo processo comporta l'accumulo di molecole di matrice; il processo di mineralizzazione è molto rapido all'inizio per poi rallentare. Per la completa mineralizzazione delle diverse unità strutturali dell'osso possono essere necessari anni.
bALP ha un ruolo nella normale mineralizzazione scheletrica. I substrati naturali del TNSALP sembrano includere almeno tre composti del fosforo: fosfoetanolamina (PEA), pirofosfato inorganico (PPi) e piridossal-5'-fosfato (PLP), come evidenziato dall'aumento dei livelli plasmatici e/o urinari di ciascuno nei soggetti con ipofosfatasi (14,15).

2. RIMODELLAMENTO OSSEO ANORMALE

Negli adulti normali, il riassorbimento osseo e la formazione ossea sono strettamente bilanciati in modo che la quantità di osso formato nelle nuove BMU sia uguale alla quantità di osso riassorbito. Il meccanismo del normale equilibrio è sconosciuto, ma può coinvolgere molteplici fattori rilasciati dalla matrice ossea durante il riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti, tra cui TGF-beta (16,17) e fattori prodotti dalle cellule ossee come la sclerostina e richieste meccaniche o cambiamenti ormonali. Tassi di rimodellamento alti e bassi dovuti allo squilibrio tra riassorbimento e formazione possono essere associati a perdita o guadagno osseo.

Il tasso di turnover durante la crescita ossea è molto elevato e la formazione ossea sistemica supera il riassorbimento; successivamente rallenta in modo significativo e la quantità di osso formato da ciascun BMU diminuisce con l'età (18). La normale produzione di ormone paratiroideo (PTH) è un fattore importante nella velocità basale del rimodellamento e i pazienti con ipoparatiroidismo congenito, autoimmune o chirurgico hanno tassi inferiori di rimodellamento (19). Anche altri cambiamenti ormonali, come la menopausa e la perdita di androgeni nei maschi castrati, l'ipertiroidismo e l'iperparatiroidismo primario, accelerano il tasso di rimodellamento. Nel caso della perdita di steroidi sessuali, l'aumento del tasso di rimodellamento è transitorio e ritorna al valore basale entro 5-10 anni (a meno che non vi sia carenza di vitamina D o iperparatiroidismo secondario), probabilmente a causa di meccanismi compensatori. Un eccesso di offerta di osteoclasti rispetto alla necessità di rimodellamento, o un'offerta insufficiente di osteoblasti rispetto alla necessità di riparazione della cavità, sono cambiamenti fisiopatologici negli spermatidi nelle più comuni malattie ossee, inclusa l'osteoporosi.

1.1 MASSA OSSEA AUMENTATA

Lo squilibrio di rimodellamento può anche verificarsi a causa del fallimento del processo di riassorbimento. Ciò può portare a ispessimento osseo (condizione definita come "petrosi" o "osteosclerosi") e ridotta formazione di elementi

ematopoietici. Per avviare la differenziazione degli osteoclasti è necessario il fattore stimolante le colonie di macrofagi (M-CSF, CSF-1).

La mutazione più comune nell'uomo che determina osteosclerosi è un difetto nella subunità della pompa protonica specifica per gli osteoclasti (TCIRG1). Un'ulteriore mutazione clinicamente significativa è stata identificata in CLCN7, gene che codifica per un canale del cloruro specifico per gli osteoclasti. Di minore incidenza si ritrovano mutazioni di OSTM1 (coinvolto nella segnalazione Wnt) e il gene dell'anidrasi carbonica (CA2); tutte queste mutazioni sono associate a un numero elevato di osteoclasti normali o funzionanti in modo anomalo (20,21).

Al contrario, le mutazioni che coinvolgono RANKL causano una osteopetrosi di tipo osteoclastico (22): in questa condizione, all'aumento della densità ossea dovuto al malassorbimento e alla maggiore stimolazione della formazione ossea si può osservare un aumento della densità ossea (malattia nota come osteopetrosi autosomica dominante di tipo I). In questa malattia, le mutazioni attivanti nel gene della proteina 5 correlata al recettore delle lipoproteine a bassa densità (LRP5) attivano la segnalazione Wnt e sono efficaci nel promuovere l'osteoblastogenesi (23,24).

Inoltre, sono state segnalate mutazioni con perdita di funzione nel gene della sclerostina (uno dei principali antagonisti della segnalazione Wnt) che sono quindi associate a una maggiore massa ossea.(25,26)

1.2 MASSA OSSEA RIDOTTA

Un eccesso di osteoclasti può causare un eccessivo riassorbimento in profondità, fino alla perdita (anche completa) dell'architettura trabecolare. Le risultanti perforazioni e discontinuità trasformano le normali strutture della piastra trabecolare in sistemi di aste molto più deboli e troncate ai margini.

Non vi è alcun modello di osteogenesi nelle perforazioni e nessuna formazione nelle estremità libere delle trabecole, presumibilmente perché non sono soggette a carico meccanico. Anche la rimozione completa del modello avviene fisiologicamente. Man mano che l'osso lungo cresce, il corpo cavernoso secondario viene completamente riassorbito e la cavità midollare si espande, determinando una diminuzione dell'area dell'osso trabecolare

metafisario. Anche senza perforazione, l'assottigliamento osseo può verificarsi se aumenta l'entità del riassorbimento o il numero di siti di riassorbimento. Normalmente, gli osteoblasti riempiono completamente le cavità di riassorbimento (27). In caso contrario, il BMU sarà incompleto, con conseguente riduzione dello "spessore della parete" dell'osso spongioso. Questo è un segno istologico dell'osteoporosi nei pazienti anziani o in quelli trattati con glucocorticoidi ed è il risultato di una diminuzione della massa ossea formata da gruppi di osteoblasti all'interno di ciascun BMU (28).

3. REGOLATORI SISTEMICI E LOCALI DELLE CELLULE DEL TESSUTO OSSEO

Molti ormoni sistemici, citochine, fattori di crescita e segnali locali influenzano la formazione, la morte e la funzione delle cellule ossee. I regolatori sistemici più importanti sono la regolazione del calcio esercitata dall'ormone paratiroideo (PTH), dal calcitriolo, dall'ormone della crescita (GH) e dal fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1), dai glucocorticoidi, infine dagli ormoni tiroidei e dagli ormoni sessuali.

Altri fattori hanno effetti sia sistemici che locali, come le prostaglandine, TGF beta, le proteine morfogenetiche ossee (BMP) e le citochine. Verranno di seguito analizzati più nel dettaglio gli elementi classicamente ritenuti fondamentali nell'omeostasi del calcio.

3.1 ORMONE PARATIROIDEO

L'ormone paratiroideo (PTH) è un regolatore chiave dell'omeostasi del calcio. Mantiene i livelli sierici di calcio stimolando il riassorbimento osseo, aumenta il riassorbimento tubulare del calcio e aumentando la produzione renale di calcitriolo. Il PTH stimola la formazione ossea quando somministrato in modo intermittente, ma inibisce la sintesi del collagene ad alte concentrazioni (29). La somministrazione continua (o la secrezione endogena) stimola il riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti. Inoltre, stimola l'espressione genica in queste cellule e aumenta la produzione di diversi fattori locali come IL-6, l'IGF-1, la proteina legante l'IGF (IGF-BP-5) e le prostaglandine.

3.2 CALCITRIOLO

Il calcitriolo migliora l'assorbimento di calcio e fosforo nell'intestino e favorisce la mineralizzazione ossea. Ad alte concentrazioni, stimola il riassorbimento osseo nelle carenze di calcio e fosfato e aiuta a mantenere un apporto costante di questi ioni ad altri tessuti. È stato osservato infine come in modelli animali carenti di vitamina D il calcitriolo mantenga nei livelli di norma la ed il

rimodellamento osseo durante lo sviluppo se il calcio e il fosfato sono preservati (12).

3.3 STEROIDI SESSUALI

Gli estrogeni e gli androgeni hanno entrambi effetti importanti sull'omeostasi ossea. Gli estrogeni agiscono direttamente sulle cellule di origine sia osteoblastica e osteoclastica (30–32), influenzando lo sviluppo scheletrico indipendentemente dall'età. Dopo la pubertà, gli estrogeni riducono il turnover osseo inibendo il riassorbimento osseo, e tale processo è necessario per la chiusura epifisaria in entrambi i sessi. È stato dimostrato come uomini con difetti genetici nel recettore degli estrogeni o nell'enzima aromatasi (che converte gli androgeni in estrogeni) hanno un'età ossea ritardata, una crescita ossea ridotta e una chiusura epifisaria ritardata (33).

3.4 CALCITONINA

La calcitonina inibisce gli osteoclasti e quindi il riassorbimento osseo a dosi farmacologiche; tuttavia, svolgono ruoli fisiologici minimi nello scheletro umano adulto. I suoi effetti farmacologici sono transitori e probabilmente dovuti alla regolazione inibitoria del recettore. Pertanto, è efficace solo temporaneamente nel trattamento dell'ipercalcemia dovuta all'eccessivo riassorbimento osseo.

3.5 ORMONE DELLA CRESCITA E IGF

Il sistema che include l'ormone della crescita (GH) congiuntamente al fattore di crescita simile all'insulina 1 (IGF-1) e l'IGF-2 è di fondamentale importanza per la crescita scheletrica, in particolare per lo sviluppo della placca terminale della cartilagine e per la formazione ossea endocondrale. Gli effetti degli IGF sono in parte determinati dalla disponibilità di vari IGF-BP. L'IGF-BP-3 è il principale determinante delle concentrazioni sieriche di IGF, mentre l'IGF-BP-5 promuove gli effetti locali dell'IGF e inibisce l'IGF-BP-4.

3.6 TGF-BETA

Il fattore di crescita trasformante (TGF- β) e la famiglia di proteine BMP sono composti da almeno 10 proteine prodotte da molte cellule diverse e hanno effetti diversi sulla crescita e sullo sviluppo (34,35). TGF- β inibisce il riassorbimento osseo e stimola la formazione ossea.

3.7 GLUCOCORTICOIDI

L'inibizione della formazione ossea è una delle principali cause di osteoporosi indotta da glucocorticoidi, probabilmente a causa dell'apoptosi accelerata degli osteoblasti e degli osteociti (36).

3.8 ORMONI TIROIDEI

Gli ormoni tiroidei stimolano sia il riassorbimento osseo che la formazione ossea. Pertanto, è evidente come l'ipertiroidismo possa portare ad un aumento del turnover osseo e alla perdita ossea.

3.9 FATTORI DI CRESCITA DEI FIBROBLASTI

I fattori di crescita dei fibroblasti (FGF) sono un'altra famiglia di proteine coinvolte nello sviluppo scheletrico. Le mutazioni nei recettori di questi fattori causano fenotipi scheletrici anormali come l'acondroplasia (34). Anche altri fattori di crescita come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) sono prodotti nell'osso e possono svolgere un ruolo nel rimodellamento osseo.

3.10 ALTRI

Molti altri fattori svolgono un ruolo importante nel metabolismo osseo. Ad esempio, le prostaglandine, i leucotrieni e l'ossido nitrico possono essere importanti per la rapida risposta degli osteociti all'infiammazione e alle forze meccaniche. Le prostaglandine hanno effetti bifasici sul riassorbimento e sulla formazione ossea, ma il loro principale effetto in vivo è stimolante (37). La produzione di prostaglandine può essere aumentata dal carico d'urto e dalle

citochine infiammatorie. L'ossido nitrico può inibire la funzione degli osteoclasti (38), mentre i leucotrieni stimolano il riassorbimento osseo (39).

4. PATOLOGIE ASSOCIATE AD ALTERATO RIMODELLAMENTO OSSEO

4.1 OSTEOPOROSI

4.1.1 FISIOPATOLOGIA

Il turnover osseo è un processo continuo che vede generalmente bilanciarsi la formazione e la disgregazione ossea. Gli osteoblasti (cellule che producono matrice ossea organica ed eseguono la mineralizzazione ossea) e gli osteoclasti (cellule che riassorbono l'osso) producono tossine come PTH, calcitonina, estrogeni, vitamina D, varie citochine e prostaglandine, controllate da altri fattori locali.

La massa ossea raggiunge il suo apice intorno ai 30 anni sia negli uomini che nelle donne, con l'importante differenza che negli uomini la massa ossea è maggiore. Dopo il picco di massa ossea, essa rimane stabile ai livelli massimi per circa 10 anni, durante i quali la formazione ossea si avvicina al riassorbimento osseo. Dopo questo periodo, la perdita ossea si verifica a un tasso annuo di circa lo 0,3-0,5%. Una volta iniziata la menopausa, la perdita ossea nelle donne aumenta a un livello di circa il 3-5% all'anno per circa 5-7 anni, dopodiché il tasso di perdita diminuisce.

La perdita ossea dovuta all'osteoporosi colpisce sia l'osso corticale che quello spongioso. Lo spessore dell'osso corticale, il numero e le dimensioni delle trabecole diminuiscono mentre la porosità aumenta. Le trabecole possono essere interrotte o del tutto assenti. La perdita di osso spugnoso si verifica più rapidamente della perdita di osso corticale: ciò è dovuto all'elevata porosità dell'osso spongioso e all'elevato turnover osseo. Tuttavia, è la perdita di entrambe le specie a determinare l'aumento della fragilità scheletrica.

4.1.2 FRATTURE DA FRAGILITÀ

Per sua definizione, una frattura da fragilità si verifica dopo un trauma meno grave di quanto previsto per una frattura normale. Ad esempio, le fratture determinate da una caduta da una posizione eretta o da una posizione supina dal letto sono considerate fratture da fragilità. Le sedi più comuni di fratture da

fragilità sono radio distale, colonna vertebrale (si tratta di fratture da compressione lombare e toracica, e sono le più comunemente dovute all'osteoporosi), collo femorale, grande trocantere. Altre sedi possono includere l'omero prossimale e il bacino. Le fratture in siti come il naso, le costole, la clavicola e i metatarsi non sono considerate fratture correlate all'osteoporosi.

4.1.3 CLASSIFICAZIONE

L'osteoporosi può svilupparsi come malattia primitiva o secondaria ad altri fattori. I siti di frattura sono simili nell'osteoporosi primitiva e secondaria.

Osteoporosi primitiva

Più del 95% dell'osteoporosi nelle donne e circa l'80% negli uomini sono primarie, ovvero non hanno una causa identificabile. La maggior parte dei casi si verifica nelle donne in menopausa e negli uomini anziani. Tuttavia, alcune malattie possono accelerare la perdita ossea nei pazienti con osteoporosi primitiva: l'insufficienza gonadica è un fattore importante sia negli uomini sia nelle donne (40), in aggiunta ad altri fattori come la diminuita assunzione di calcio, i bassi livelli di vitamina D, determinati farmaci e l'iperparatiroidismo. Alcuni pazienti hanno un insufficiente apporto di calcio durante lo sviluppo osseo durante l'adolescenza e, pertanto, non raggiungono mai il picco di massa ossea.

Il principale meccanismo di perdita ossea è dato da un aumentato riassorbimento osseo, che risulta nella diminuzione della massa ossea e nel deterioramento della microarchitettura (9). In più rari casi, ad essere compromessa è la formazione ossea in primis. I meccanismi che possono comportare perdita ossea sono diversi:

- I cambiamenti locali nella produzione delle citochine, in particolare quelli che coinvolgono le citochine come l'attivatore di NfKB che aumenta il riassorbimento osseo, promuovendo la differenziazione e la maturazione degli osteoclasti.
- L'alterata risposta degli osteoblasti durante il rimodellamento osseo, probabilmente causata dal declino relativo all'età del numero e dell'attività di

queste cellule, ed in parte correlata agli effetti citochino-mediati della sclerostina.

- Altri fattori che influenzano il riassorbimento osseo includono il paratormone e la vitamina D.

L'osteoporosi idiopatica si riferisce ai rari casi di fratture da fragilità in bambini, adolescenti, donne in premenopausa o uomini < 50 anni con normale funzione gonadica e senza causa secondaria rilevabile. Oltre a ciò, vengono così definiti anche i soggetti con ridotta massa ossea, individuata con basso punteggio Z nelle scansioni DXA.

Osteoporosi secondaria

L'osteoporosi secondaria è responsabile di meno del 5% dei casi di osteoporosi nelle donne e del 20% circa negli uomini. Le sue cause possono accelerare ulteriormente la perdita ossea nei pazienti con osteoporosi primitiva e possono anche aumentare il rischio di fratture.

Tra le cause si annoverano neoplasie, BPCO, nefropatia cronica, farmaci (per esempio l'uso cronico di glucocorticoidi, anticonvulsivanti, medrossiprogesterone, inibitori dell'aromatasi, rosiglitazone, pioglitazone, la terapia sostitutiva con ormoni tiroidei, eparina, etanolo, tabacco, inibitori della pompa protonica, anti-H2), malattie endocrine (per esempio eccesso di glucocorticoidi, iperparatiroidismo, ipertiroidismo, ipogonadismo, iperprolattinemia, diabete), ipercalciuria, ipervitaminosi A, ipovitaminosi D, malattie epatiche, malassorbimento, immobilizzazione, artrite reumatoide.

Ci sono diverse condizioni patologiche che possono determinare una ridotta massa ossea, in particolare nei pazienti con malattia renale cronica si ha una combinazione di iperparatiroidismo secondario, livelli elevati di fosfato sierico, carenza di calcitriolo, livelli sierici anormali di calcio e vitamina D, osteomalacia e basso metabolismo osseo.

4.1.4 FATTORI DI RISCHIO

Dal momento che la crescita ossea richiede sollecitazioni meccaniche come il carico, l'immobilizzazione e lunghi periodi di inattività comportano inevitabilmente perdita ossea. Inoltre, anche un basso indice di massa corporea può significare una ridotta massa ossea.

Un apporto dietetico insufficiente di calcio, fosfato, magnesio e vitamina D favorisce la perdita ossea, simile all'acidosi endogena. Il consumo di tabacco e alcol influiscono negativamente sulla massa ossea (41), così come una storia familiare di osteoporosi (in particolare fratture dell'anca nei genitori). I pazienti che hanno subito una frattura da fragilità sono a maggior rischio di altre fratture cliniche (sintomatiche) e clinicamente asintomatiche (tipicamente, fratture da compressione vertebrale).

4.1.5 SINTOMATOLOGIA

Le persone con osteoporosi sono spesso asintomatiche, a meno che non si verifichi una frattura. Le fratture non vertebrali sono solitamente sintomatiche, ma circa due terzi delle fratture vertebrali da compressione sono asintomatiche (sebbene i pazienti possano manifestare lombalgia cronica da altre cause, come l'artrosi). Le fratture vertebrali da compressione sintomatiche di solito iniziano con un dolore acuto, non radiativo che peggiora con lo sforzo e può essere accompagnato da punti vertebrali dolenti che di solito iniziano a diminuire entro una settimana. Il dolore residuo può persistere per mesi o rimanere costante. In questo caso, si deve sospettare un'ulteriore frattura o una malattia spinale sottostante.

Le fratture multiple della colonna vertebrale toracica possono infine portare a cifosi dorsale con peggioramento della lordosi cervicale. In queste condizioni, lo stress insolito sui muscoli e sui legamenti della colonna vertebrale può causare dolore cronico e duraturo, specialmente nella parte bassa della schiena. I pazienti possono avvertire mancanza di respiro a causa del volume intratoracico ridotto e sazietà precoce dovuta alla compressione della cavità addominale quando il torace si avvicina al bacino.

Le fratture di anca e bacino sono relativamente comuni nell'osteoporosi e colpiscono il 15% delle donne e il 5% degli uomini ultra 80enni.

4.1.6 DIAGNOSI

La diagnosi di osteoporosi si basa su due pilastri di imaging: l'assorbimetria a raggi X a doppia energia (DXA) e la radiografia standard (diretta), raramente utilizzata per la diagnostica (42,43).

La ridotta densità ossea (e l'associato aumento del rischio di fratture) può essere sospettata sulle radiografie standard, ma deve essere confermata dalla misurazione della densità ossea. Di solito viene utilizzata la DXA. La TC quantitativa può fornire una misura simile della densità minerale ossea, ma attualmente non è ampiamente disponibile.

All'Rx standard le ossa affette da osteoporosi mostrano una riduzione della radiodensità e la perdita di struttura trabecolare, ma ciò risulta solo quando la perdita ossea supera il 30% di tessuto; nonostante ciò, le RX standard (dirette) mantengono una rilevanza clinica e diagnostica fondamentale. La perdita di altezza del corpo vertebrale e l'aumento della biconcavità caratterizzano le fratture vertebrali da compressione. In particolare, le fratture delle vertebre toraciche possono causare una cuneizzazione anteriore dell'osso.

Ai fini di escludere le varie diagnosi differenziali, è importante valutare il tipo delle vertebre colpite: le fratture vertebrali a livello di T4 o superiori suggeriscono una patologia neoplastica piuttosto che l'osteoporosi primitiva. Le RX standard della colonna vertebrale per la ricerca di fratture asintomatiche da fragilità vertebrale devono essere prese in considerazione nei pazienti anziani con grave dolore alla schiena e dolorabilità vertebrale localizzata e nei pazienti che riferiscono una perdita di altezza > 3 cm. L'osteoporosi indotta da corticosteroidi è più probabile che causi fratture da compressione vertebrale, ma può anche causare fratture in altri siti in cui le fratture osteoporotiche sono comuni. L'iperparatiroidismo può essere differenziato quando causa riassorbimento subperiostale o raramente lesioni ossee cistiche. L'osteomalacia può causare anomalie nei test di imaging simili a quelle di osteoporosi.

Si deve considerare una valutazione per cause secondarie di osteoporosi in un paziente con uno Z-score $\leq -2,0$. I test di laboratorio utilizzati solitamente includono:

- Calcio sierico, magnesio e fosforo
- Livello di 25-idrossi vitamina D
- Test epatici, che comprendono test per una fosfatasi alcalina (per effettuare diagnosi di ipofosfatemia)

- Livello di paratormone intatto (per effettuare diagnosi di iperparatiroidismo)
- Testosterone sierico negli uomini (per effettuare diagnosi di ipogonadismo)
- Urine di 24 h per calcio e creatinina (per effettuare diagnosi di ipercalciuria)

In aggiunta, test più specifici possono aiutare nella valutazione di un ipertiroidismo (mediante la misurazione dell'ormone tireostimolante o della tiroxina libera) o del rischio di neoplasie, in particolare il mieloma (mediante la misurazione del cortisolo libero nelle urine, emocromo, elettroforesi delle proteine sieriche, elettroforesi delle catene leggere libere sieriche, proteinuria) ovviamente da considerare a seconda delle manifestazioni cliniche.

I pazienti con perdita di peso devono essere sottoposti a screening per i disturbi gastrointestinali (per esempio malassorbimento, celiachia, malattia infiammatoria intestinale), nonché per il cancro. La biopsia ossea è riservata ai casi insoliti (per esempio giovani pazienti con fratture da fragilità e senza causa apparente, pazienti con insufficienza renale cronica che possono avere altri disturbi ossei, pazienti con livelli persistentemente bassi di vitamina D con sospetto di osteomalacia).

I livelli sierici a digiuno di C-telopeptide cross-link o urinari di N-telopeptide cross-link riflettono l'aumentato riassorbimento osseo. Anche se l'affidabilità varia per uso clinico di routine, elevati livelli di C-telopeptide cross-link e di N-telopeptide cross-link possono essere utili nel predire il rischio di frattura in un paziente non trattato, nel monitoraggio della risposta alla terapia o con la temporanea astensione alla terapia farmacologica (2). Nei pazienti in terapia farmacologica antiriassorbitiva, i livelli devono risultare marcatamente soppressi. In caso contrario, si deve sospettare un assorbimento anomalo o una scarsa aderenza al regime terapeutico.

4.2 OSTEOMALACIA

L'osteomalacia (OM) è la conseguenza di una difettosa mineralizzazione dell'osteoidi neoformata. Tra le malattie metaboliche delle ossa, è al secondo posto per prevalenza, anche se i progressi nella sua conoscenza sono stati tradizionalmente relegati alla sua sorella maggiore, l'osteoporosi. Nell'ultimo decennio, tuttavia, c'è stata una notevole crescita nella frequenza

e nella qualità degli studi volti a comprendere meglio la fisiopatologia dei disturbi della biomineralizzazione come l'OM (44).

Esistono diverse forme cliniche di OM che possono manifestarsi negli adulti, la cui origine può essere congenita, carente o associata a determinati tumori o farmaci. L'analisi di un'ampia varietà di entità cliniche associate all'OM nell'attuale letteratura scientifica è ampia, sebbene venga rilevata una tendenza ad affrontare aspetti molto parziali della malattia, quindi manca una visione più completa dell'OM.

4.2.1 FISIOPATOLOGIA

L'OM è la conseguenza di un'alterazione della mineralizzazione dell'osteotide neoformato durante la modellazione o il rimodellamento osseo.

La disponibilità di substrati, cioè calcio e fosfato presenti nel tratto intestinale, che vengono assorbiti attivamente da una quantità sufficiente di vitamina D attiva, cioè 1,25(OH)₂D, che a sua volta è prodotta nel rene dall'ormone paratiroideo (PTH) mediante stimolazione della 1-alfa idrossilasi, è preliminare all'ottimizzazione del processo di mineralizzazione. Questi ormoni e metaboliti sono interconnessi e controregolati in una rete complessa per ripristinare l'omeostasi minerale in risposta a stimoli fisiologici o patologici. La carenza di calcio e/o fosfato, l'eccesso di inibitori della mineralizzazione o l'eccesso/i difetti ormonali possono portare a una mineralizzazione alterata (45).

La carenza prolungata e grave di vitamina D porta sia all'insufficienza di calcio che di fosfato. Altre forme di difettosità di calcio e fosfato, che possono essere almeno in parte vitamina D-dipendenti, potrebbero derivare da malattie croniche da malassorbimento, come la celiachia o le malattie infiammatorie intestinali, o essere il risultato a medio e lungo termine di chirurgia bariatrica resettiva o malattie epatiche e renali croniche (46–48). Alcuni farmaci come gli antiepilettici e i glucocorticoidi possono interrompere il metabolismo della vitamina D e, in alcuni casi, anche causare un ridotto assorbimento del calcio e un aumento delle perdite renali, contribuendo all'ipomineralizzazione.

Negli stadi precedenti alla fusione epifisaria, osteomalacia e rachitismo possono manifestarsi contemporaneamente. Tuttavia, negli adulti, possiamo osservare due tipi di alterazioni. In primo luogo, le sequele di OM (con o senza rachitismo) se l'alterazione della mineralizzazione è avvenuta prima della fusione delle placche epifisarie e, in secondo luogo, la presenza di un OM de novo, dove non ci saranno precedenti sequele ossee.

4.2.2 CLASSIFICAZIONE

In modo pratico, possiamo dividere le cause di OM e rachitismo in base ai livelli sierici di calcio e fosfato.

Tra le OM calciopeniche osservate nell'adulto come processi acquisiti, spicca nettamente la OM nutrizionale, anche se questa diagnosi deve essere presa in considerazione nei pazienti con malattie croniche dell'apparato digerente o in cura con farmaci che inducono il catabolismo epatico della VitD. Tra le rare cause di OM, i deficit ereditari di VitD esordiscono in età pediatrica, essendo molto improbabile che raggiungano l'età adulta senza essere diagnosticati. All'interno di quest'ultimo, possiamo distinguere due forme, entrambe causate da difetti autosomici recessivi, e manifestate dalla resistenza alla VitD, o dalla perdita di funzione dell'1-alfa-idrossilasi renale o da una risposta carente del recettore VitD (VDR) al calcitriolo segnalazione. In caso di OM, in cui il principale fattore determinante è la carenza di fosfati, è eccezionale che la causa sia nutrizionale poiché le diete abituali contengono abbastanza fosforo. Il resto del gruppo può essere diviso in base alla loro dipendenza da FGF23, che facilita l'approccio diagnostico (49). Tra le forme fosfopeniche ereditarie e FGF23-dipendenti, spicca XLH, con altre forme ereditarie di sovrapproduzione ossea diretta di FGF23 o difetti nella sua degradazione molto rari. Esiste una forma acquisita di iperproduzione di FGF23 che è oncogenica o OM indotta da tumore (TIO) e, infine, esistono forme non FGF23, tra le quali spiccano le sindromi tubolari fosfato-perdenti, che a loro volta possono essere ereditarie o acquisite, essendo in quest'ultimo caso quasi sempre indotta da farmaci.

4.2.3 SINTOMATOLOGIA

I sintomi con cui i pazienti con OM si presentano sono aspecifici, in quanto consistono in dolore pleomorfo, generalmente cronico, che può ricordare quello riferito da pazienti con polimialgia reumatica o miopatie infiammatorie. Tuttavia, il dolore acuto causato da una frattura da fragilità può essere il sintomo guida che ci aiuta nella diagnosi (50).

L'OM conclamata è solitamente sintomatica con caratteristiche muscoloscheletriche distintive. In quest'ultimo caso, i pazienti affetti possono presentare dolore osseo e dolorabilità generalizzati, che spesso possono portare a un uso eccessivo e/o abuso di farmaci antinfiammatori. Il dolore osseo sordo e diffuso nell'osteomalacia è dovuto all'idratazione della matrice non mineralizzata nel periostio, che stimola i nocicettori periferici. Il dolore è presente anche a riposo, ma peggiora sotto carico e in piedi. La dolorabilità scheletrica si riferisce alla capacità di evocare dolore con la pressione sulle ossa superficiali, come lo sterno, le tibie anteriori, i polsi e le costole. L'aspecificità di questi segni e sintomi, che possono anche essere correlati a disturbi reumatologici (polimialgia, fibromialgia e spondilite anchilosante), può ritardare significativamente la diagnosi e il trattamento appropriato (51,52).

Poiché l'osso non mineralizzato è più fragile, possono verificarsi crepe ossee corticali spontanee, denominate anche pseudofratture. Poiché sono l'esito clinico di una malattia sistemica, le pseudofratture (chiamate anche linee di Milkman, zone di Looser o fratture da insufficienza/stress) appaiono come bande trasversali radiotrasparenti. Le pseudofratture sono più frequenti nelle principali ossa portanti quali femore prossimale e diafisario (regione sottotrocanterica), bacino e metatarsi e sono spesso simmetriche e bilaterali, anche se possono manifestarsi in modo asincrono nel tempo poiché sono espressione di una malattia sistemica.

4.2.4 DIAGNOSI

Il gold standard diagnostico è lo studio istomorfometrico di un campione osseo senza decalcificazione, in cui si osserva un aumento patologico dell'osteotide: >10% di osteotide nell'area dell'osso spongioso (normale <4%) e larghezza dell'osteotide >15 µm (normale 4– 12 µm) se usiamo parametri statici, e una diminuzione o assenza di doppia etichettatura con tetracicline se usiamo parametri dinamici (tempo di ritardo nella mineralizzazione >100 giorni, normale: 9-20 giorni) [6]

Attualmente, la valutazione istomorfometrica della biopsia ossea senza decalcificazione viene eseguita solo in alcuni centri e non è di routine disponibile per la maggior parte dei medici. Per questo motivo, la diagnosi di OM può essere ritardata o mai effettuata, rendendo necessario tenere conto di questa malattia rilevante, nonostante il gold standard diagnostico non sia solitamente disponibile per la maggior parte dei clinici. Con l'intento di ridurre la sottodiagnosi e l'assenteismo terapeutico, sono stati proposti due set di criteri "clinici" per l'OM, che possono essere utili, sebbene richiedano un alto indice di sospetto, siano poco sensibili e, frequentemente, non siano presenti nel suo complesso durante le fasi iniziali della malattia (51,53). Alcuni sono mirati alla diagnosi di rachitismo e OM in generale, altri al rachitismo nutrizionale/OM.

I criteri proposti nello studio di Fukumoto et al. sono:

- (A) ipofosfatemia o ipocalcemia;
- (B) fosfatasi alcalina ossea elevata;
- (C) Debolezza muscolare o dolore alle ossa;
- (D) BMD <80% nei giovani adulti;
- (E) Immagine: più zone ossee di captazione o fratture Looser-Milkman.

L'OM risulta definita in presenza di tutti i criteri, probabile se sono presenti A+B e 2 tra C ed E.

I criteri proposti da Uday et al. sono:

- (A) Paratormone elevato (PTH);
- (B) fosfatasi alcalina totale elevata;
- (C) Assunzione di calcio <300 mg/giorno o calcidiolo sierico <30 nmol/L;
- (D) Calcio urinario basso.

I suddetti criteri, applicati in assenza di malattie renali o epatiche, suggeriscono la diagnosi di OM. L'ulteriore presenza di sintomi e zone di Looser aiuta nelle fasi avanzate.

II. GENERALITA' SULL'IPOFOSFATASIA

1. DEFINIZIONE

L'ipofosfatasi (HPP) è una rara ed eterogenea malattia metabolica ereditaria dello scheletro, causata da mutazioni con perdita di funzione del gene ALPL, che codifica per l'isoenzima tessuto non specifico della fosfatasi alcalina (TNSALP).

L'ipofosfatasi è caratterizzata da un difetto nel processo di mineralizzazione delle ossa e dei denti, che spesso si associa a complicanze scheletriche quali rachitismo, osteomalacia, fratture ricorrenti con difficile consolidazione e, più raramente, a complicanze sistemiche quali insufficienza respiratoria, convulsioni e nefrocalinosi (54).

Fu descritta per la prima volta nel 1948 da Rathbun (55), che identificò una nuova patologia scheletrica caratterizzata da reperti clinici insoliti, tra cui appunto livelli estremamente bassi di fosfatasi alcalina (ALP) e convulsioni.

Il caso clinico in questione riguardava un bambino di tre settimane, asintomatico alla nascita, che presentava calo ponderale e crisi epilettiche. Le radiografie evidenziavano grave osteopenia, fratture e irregolarità metafisarie con livelli sierici di calcio e fosfato inorganico normali o elevati e attività sierica della fosfatasi alcalina (ALP) molto bassa. Nonostante la varietà di trattamenti tentati, inclusa la supplementazione di vitamina D, il paziente morì all'età di due mesi in seguito ad una crisi convulsiva tonica. L'analisi di tessuti ottenuti all'autopsia, inclusi campioni di osso che hanno rivelato cambiamenti istopatologici coerenti con il rachitismo, ha evidenziato la carenza di attività di ALP. Di conseguenza, nel 1948 Rathbun descrisse questa nuova "anomalia dello sviluppo" come "ipofosfatasi" (56).

La gravità della malattia è inversamente proporzionale all'età di insorgenza dei sintomi e riflette il grado di perdita di funzione della TNSALP (57).

Inoltre, è stata osservata un'imperfetta correlazione genotipo-fenotipo, che suggerisce che il fenotipo sia influenzato anche da fattori ambientali oltre che genetici. Fino ad ora, la diversità del decorso clinico dell'HPP è stata spiegata principalmente dall'ampia eterogeneità allelica nel gene ALPL con più di 270 diverse mutazioni (58). Secondo uno studio di Hofmann et al. ulteriori fattori

genetici, epigenetici o ambientali possono spiegare la variabilità clinica. I meccanismi molecolari che portano a una maggiore espressione dell'allele che ospita il difetto di ALPL potrebbero essere rilevanti. Dunque, anche la variabilità intra-familiare e inter-familiare dei fenotipi può essere osservata in pazienti con genotipi identici e all'interno della stessa famiglia possono infatti verificarsi presentazioni fenotipiche significativamente diverse della malattia (58).

L'elenco dei potenziali fattori confondenti è lungo e comprende sia i componenti regolatori della trascrizione e della traduzione dell'ALPL stesso, sia altre fosfatasi ed enzimi che metabolizzano il fosfato. Inoltre, i substrati del TNSALP come l'adenosina e i suoi derivati fosforilati ATP, ADP, AMP e il complesso schema a valle della segnalazione purinergica possono essere importanti rispetto alla variabilità del fenotipo clinico (59,60).

L'espressione clinica è dunque estremamente variabile e dipende dall'età di comparsa, dal tipo di mutazione e dall'ereditarietà (61). Vi sono forme severe che comportano morte peri- e neonatale, fino a forme lievi con perdita prematura della dentizione, prive di manifestazioni.

A seconda dell'età alla diagnosi, sono state identificate varie forme cliniche: perinatale (letale), benigna perinatale, neonatale, infantile, adulta e odonto-ipofosfatasi (Figura 1).

Nella forma perinatale letale, i pazienti presentano severe anomalie della mineralizzazione in utero con polidramnios e morte intrauterina.

Nella forma neonatale con insorgenza fino ai 6 mesi di età, per via della diffusa ipomineralizzazione possono riscontrarsi: deformità del torace con ipoplasia polmonare e frequenti complicanze respiratorie, fratture costali, tracheomalacia, craniosinostosi prematura con incremento della pressione intracranica, proptosi, brachicefalia, deficit di crescita.

La forma infantile, con insorgenza dopo i 6 mesi di età, ha manifestazioni variabili dalla perdita prematura della dentizione decidua, al rachitismo con deformità scheletriche, bassa statura, andatura a base allargata, debolezza muscolare.

La forma adulta, invece, è caratterizzata da fratture da stress in particolare a livello metatarsale, del bacino, pseudofratture, fratture femorali in regione subtrocantaria, condrocalcinosi. Frequenti sono i depositi di cristalli di

idrossiapatite a livello della cuffia dei rotatori, del gomito e del tendine di Achille (62).

L'Odonto-Ipofosfatasi è caratterizzata dall'esfoliazione prematura dei denti decidui a radici integre e/o da gravi carie dentali, spesso in assenza di sintomi scheletrici. Quest'ultima forma è quella maggiormente prevalente con perdita della dentizione, spesso prima dei 5 anni di età, in assenza di dolore o sanguinamento (63).

Poiché, in particolare, nelle forme dell'adulto, i sintomi di esordio quali artralgie, mialgie, dolore osseo ed articolare, fratture ricorrenti sono comuni anche ad altre patologie scheletriche e reumatologiche, l'Ipofosfatasi è spesso sottodiagnosticata o erroneamente diagnosticata. Le principali patologie da considerare in diagnostica differenziale sono l'Osteoporosi, l'Osteomalacia e l'Osteogenesi imperfetta.

In presenza di fragilità scheletrica e livelli persistentemente bassi di ALP agli esami di laboratorio è utile investigare la presenza di HPP.

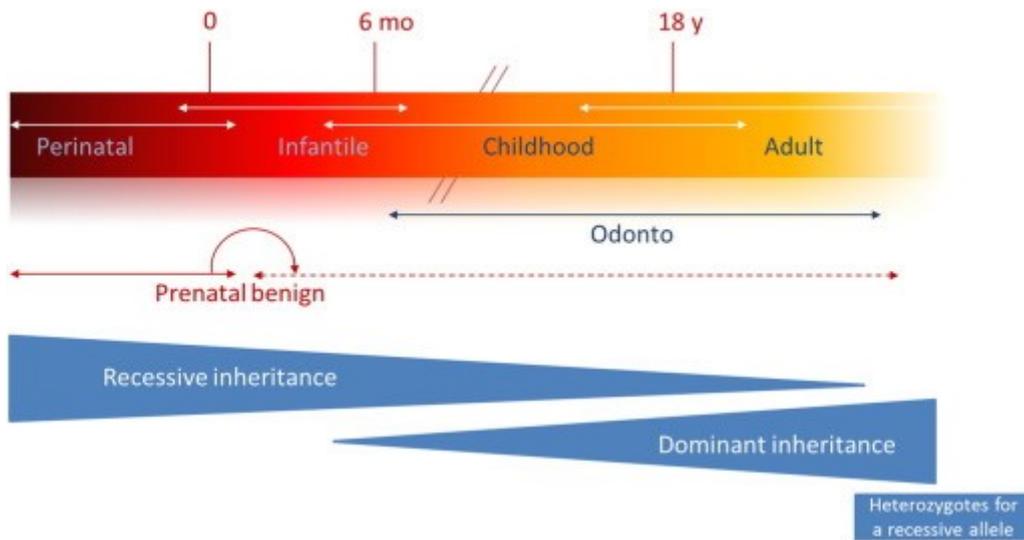


Figura 1: Classificazione delle forme di Ipofosfatasia in base a età di comparsa dei sintomi e all'ereditarietà (Adattata da Mornet E. (2018). Hypophosphatasia. *Metabolism: clinical and experimental*, 82, 142–155).

Tabella 1: Cause di Ipofosfatemia (Modificata da Gennero, I. et al., (2017). Laboratory diagnosis of hypophosphatasia. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*, 24(5S2), 5S57–5S60).

Cause tecniche
Campionamento inadeguato (ossalato, EDTA)
Range normali inappropriate
Cause primarie
Ipofosfatemia
Displasia cleidocranica
Osteogenesi imperfetta
Cause secondarie
Celiachia, malnutrizione
Deficienza di vitamina C
Deficienza di zinco
Deficienza di magnesio
Morbo di Wilson
Ipercorticismo, terapia corticosteroidea
Ipotiroidismo, ipoparatiroidismo
Ipervitaminosi D
Osteodistrofia renale
Trasfusione recente

2. EPIDEMIOLOGIA

Come spesso accade per le patologie rare, è difficile stimare la reale prevalenza dell'HPP; anche perché la frequenza della malattia varia a seconda delle aree geografiche (64). In Canada, la prevalenza alla nascita delle forme più severe è stata stimata di 1 su 100.000 nati vivi; la più alta prevalenza di HPP è stata descritta nella popolazione della provincia di Manitoba dove l'incidenza è 1 su 2.500 nati vivi. Negli Stati Uniti, l'HPP è significativamente meno prevalente nella popolazione di origine africana; mentre, in Francia, la prevalenza è stimata intorno a 1 su 300.000 per le forme severe perinatali ed infantili (65,66). In Giappone, la prevalenza è stimata intorno 1:900.000 (67). Nel 2011, la prevalenza di HPP in Europa è intorno 1:300.000 per le forme severe, mentre per quelle meno gravi è intorno a 1:6370 basandosi su pazienti con HPP provenienti da 20 Paesi europei (67).

3. MANIFESTAZIONI CLINICHE

L'espressione clinica è estremamente variabile e dipende dal tipo di mutazione, dal meccanismo di ereditarietà, dall'età alla diagnosi. Le forme più gravi sono quelle ad esordio più precoce. I segni clinici principali consistono in alterazioni della mineralizzazione di denti ed ossa (rachitismo, osteomalacia, frattura e perdita di denti) ma possono essere presenti altre manifestazioni sistemiche (convulsioni, dolore cronico, debolezza muscolare, disturbi respiratori e renali).

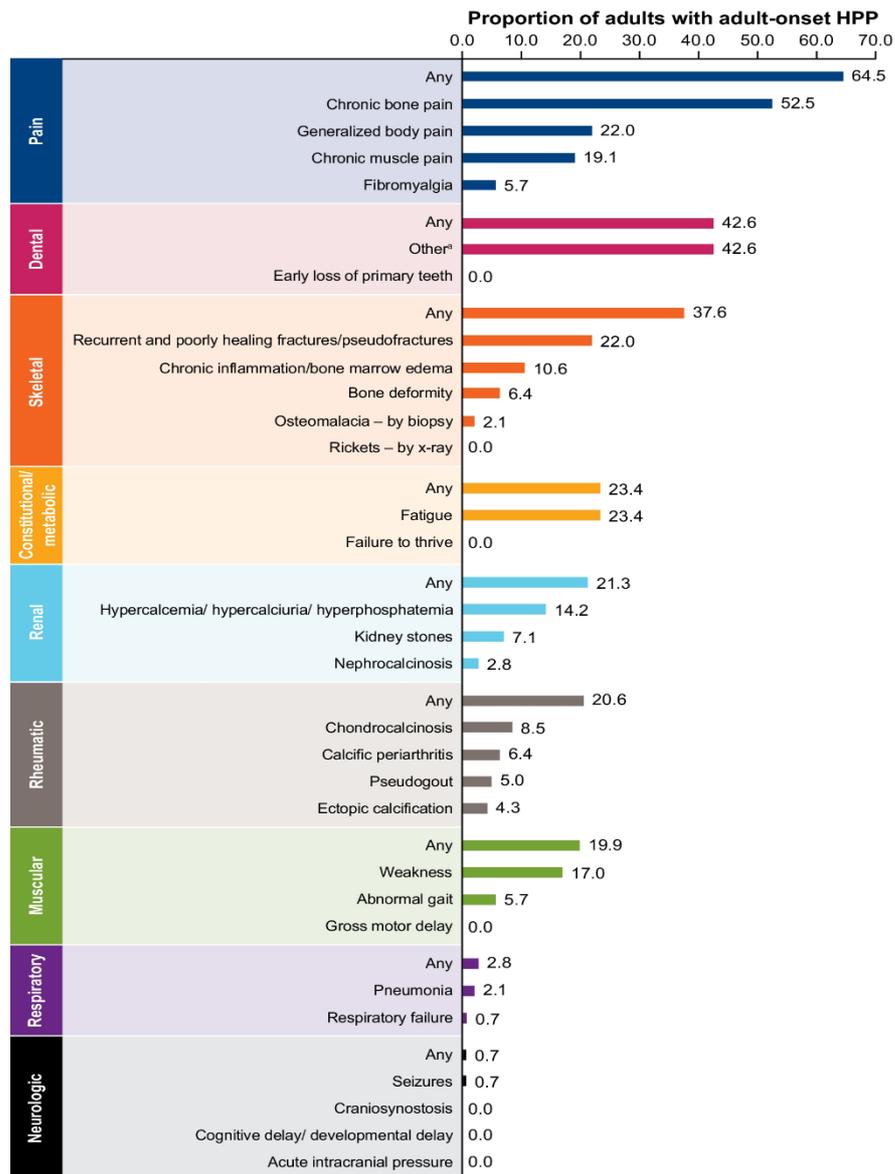


Figura 2: Manifestazioni più frequenti dell'Ipofosfatasia dell'adulto (Adattata da Dahir, K. M. et al., (2022). Clinical profiles of treated and untreated adults with hypophosphatasia in the Global HPP Registry. *Orphanet journal of rare diseases*, 17(1), 277).

3.1 FRATTURE

Nei pazienti affetti da HPP prevalgono le fratture da fragilità della regione subtrocanterica del femore, della tibia, delle ossa metatarsali e delle dita dei piedi rispetto alle fratture vertebrali, quando comparati con i pazienti con ridotta bone mineral density (BMD) alla Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA) (68); sono, inoltre, comuni fratture da stress o secondarie a traumi a bassa energia, pseudofratture del femore ed osteomalacia.

La manifestazione clinica più tipica è il dolore al piede, correlato a fratture da stress dei metatarsi, con ritardo nella guarigione della frattura e pseudoartrosi (69,70). La risonanza magnetica è talvolta necessaria per la diagnosi precoce di queste fratture, che mostrano edema osseo delle metafisi.

Il dolore alla regione della coscia, correlato a fratture femorali atipiche, è riportato nella forma adulta (71). Queste fratture originano nella corteccia laterale della diafisi sottotrocanterica, in contrasto con altre forme di rachitismo/osteomalacia dove sono localizzate nella corteccia mediale del collo del femore (72). Le fratture femorali in HPP sono considerate quindi fratture femorali atipiche per l'associazione con trauma nullo o minimo e la morfologia trasversa o obliqua corta e non comminuta o minimamente comminuta; alcune fratture incomplete presentano solo caratteristiche radiografiche minori (reazione periostale localizzata della corticale laterale, aumento dello spessore corticale).

Inoltre, per via dell'alterata mineralizzazione, i pazienti con HPP sviluppano spesso complicanze legate alle fratture ricorrenti e ad alterazioni nella consolidazione delle fratture.

Sulla base dello studio di Schmidt et al., in questi pazienti si riscontrano alterazioni microstrutturali, rilevate con la metodica HR-pQCT (high-resolution peripheral quantitative computed tomography). I soggetti adulti con HPP hanno una tendenza ad avere un decremento dello spessore corticale, della BMD corticale e dello spessore trabecolare, con un incremento delle trabecole. Queste alterazioni possono essere in parte giustificate dalla ridotta mobilità secondaria alle fratture e al dolore muscolo-scheletrico (70). È interessante invece notare come la DEXA non predica in modo accurato il rischio di frattura nei pazienti con HPP (70).

I fattori di rischio per lo sviluppo di fratture in pazienti con HPP sono: possedere due varianti per il gene ALPL, avere livelli molto bassi di ALP, elevati valori di fosforemia e di PLP. Mentre non si sono dimostrate associazioni statisticamente significative con ridotti valori di T-score femorale e lombare, bassi valori di vitamina D ed elevato CTX (73).

In conclusione, sia i pazienti affetti da Osteoporosi che quelli affetti da HPP presentano fragilità scheletrica e fratture. Spesso concomita una ridotta BMD. Inoltre, nei pazienti osteoporotici prevalgono fratture vertebrali e femorali, in questo caso a livello del collo, così come fratture di polso e di omero. Mentre nei pazienti con HPP sono comuni fratture atipiche del femore, con BMD normale o solo moderatamente ridotta.

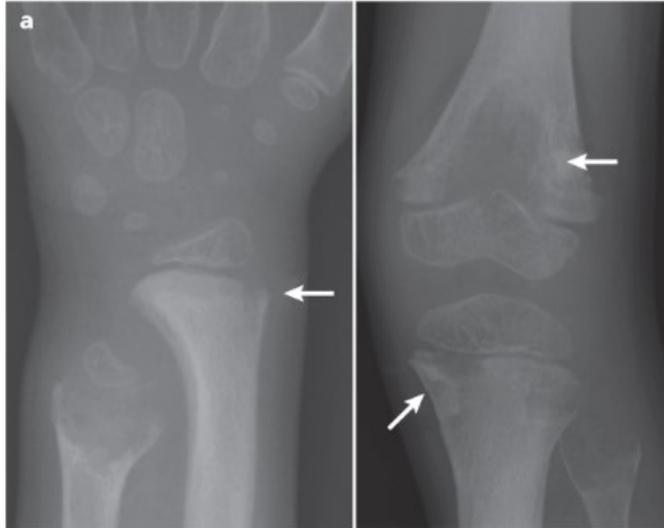


Figura 3: HPP infantile, bambina di 3 anni con “lingue” radiolucenti (freccia) che si estendono dalla fisi alla metafisi del polso sn (immagine sn) e del ginocchio sn (immagine a dx). Inoltre, è visibile una marcata ipomineralizzazione delle metafisi dell’ulna distale e del perone prossimale (Adattata da Mornet E. (2018). Hypophosphatasia. *Metabolism: clinical and experimental*, 82, 142–155).



Figura 4: Pseudofrattura in regione subtrocanterica laterale del femore (Adattata da Mornet E. (2018). Hypophosphatasia. *Metabolism: clinical and experimental*, 82, 142–155).

3.2 DOLORE MUSCOLO-SCHELETRICO

Spesso i pazienti con HPP presentano dolore muscolo-scheletrico e debolezza muscolare. La causa della debolezza muscolare non è del tutto chiara. È stato ipotizzato che potrebbe dipendere da alti livelli di pirofosfato inorganico (PPi) extracellulare (70). Talvolta, i pazienti presentano artralgie, mialgie e dolore osseo da porre in diagnostica differenziale con altre condizioni come rachitismo, osteogenesi imperfetta, malattia di Paget dell'Osso, artrite reumatoide e fibromialgia. In aggiunta, frequente è la condrocalcinosi causata dall'accumulo di cristalli di pirofosfato a livello articolare, in particolare a carico di mani e piedi.

Il dolore muscolare cronico e la debolezza sono un problema considerevole per i pazienti con HPP e sono associati a ridotta mobilità e attività fisica. Non è raro che i pazienti vengano diagnosticati erroneamente come affetti da sindrome da stanchezza cronica e/o fibromialgia (74).

3.3 COMPLICANZE NEUROLOGICHE

Nelle forme pediatriche di HPP, talvolta, coesistono manifestazioni neurologiche dovute ad alterazioni nel metabolismo del piridossal-5'-fosfato (PLP). Comune è l'epilessia, che rappresenta inoltre un fattore prognostico negativo per i soggetti affetti da HPP.

Nelle forme dell'Adulto si possono riscontrare cefalea ricorrente, disordini depressivi e insonnia (70,75). PLP è la forma attiva della vitamina B6 ed un substrato di TNSALP. La TNSALP defosforila normalmente il PLP in piridossale (PL) che è in grado di attraversare la membrana intracellulare. La sua forma defosforilata attraversa la membrana cellulare e viene rifosforilata all'interno delle cellule del sistema nervoso centrale. PLP interviene nella sintesi dei neurotrasmettitori cerebrali come serotonina, dopamina, GABA (acido gamma-ammino-butyrico).

Nell'HPP bassi livelli di TNSALP si traducono in bassi livelli intracellulari di PLP con conseguenti danni neurologici (76).

3.4 COMPLICANZE NEUROCHIRURGICHE

La fusione prematura delle suture craniche è comune nelle forme infantili e pediatriche e può comportare dislocazione caudale delle tonsille cerebellari (malformazione di Arnold-Chiari tipo I) o la formazione di idrosiringomielia. Il rischio di una craniosinostosi prematura deve essere considerato nelle forme ad insorgenza pediatrica e bisogna porre attenzione alla presenza di segni e sintomi che suggeriscano ipertensione endocranica come papilledema, continua cefalea, convulsioni, paralisi poiché questa condizione richiede interventi neurochirurgici (77).

3.5 COMPLICANZE RENALI

L'ipercalcemia e la conseguente ipercalciuria possono causare calcolosi renale: nefrocalcinosi e nefrolitiasi possono essere infatti osservate negli adulti. Sebbene l'ipercalcemia non sia un problema nella maggior parte delle forme lievi negli adulti, il calcio nella dieta deve essere valutato e limitato se necessario (69).

Anche i livelli sierici di fosfato possono essere aumentati. L'iperfosfatemia è stata attribuita a un aumento del recupero renale di fosfato (62,78).

3.6 COMPLICANZE RESPIRATORIE

Nelle forme neonatali e pediatriche ad esordio precoce per via del rachitismo e della diffusa ipomineralizzazione scheletrica con deformazione della gabbia toracica ci può essere ipoplasia polmonare, frequenti infezioni respiratorie, debolezza muscolare con ipoventilazione ed insufficienza respiratoria con necessità di supporto ventilatorio. Nella forma letale perinatale ed infantile l'insufficienza respiratoria è la principale causa di morte.

3.7 COMPLICANZE DENTALI

Spesso l'HPP è caratterizzata da alterazioni strutturali dei denti decidui e da esfoliazione prematura, inoltre, sono frequenti severe carie dentali. I denti anteriori sono più spesso interessati, con perdita degli incisivi.

L'ortopantomica dentale spesso mostra perdita di osso alveolare e camere pulpari e canali reticolari aumentati di volume. Inoltre, l'eccesso di pirofosfato inorganico ostacola la mineralizzazione del cemento che causa la prematura perdita dei denti decidui. Tuttavia, anche la dentizione permanente può subire alterazioni (75).

4. DIAGNOSI

Data l'estrema variabilità nella presentazione clinica e nella gravità dell'ipofosfatasia, soprattutto, nelle forme dell'adulto ad esordio tardivo, la diagnosi non è facilmente ottenibile; essa è una diagnosi clinica fondata su segni e sintomi di HPP ed un valore persistentemente ridotto di attività fosfatasi alcalina totale corretto per età e sesso, che è il segno distintivo dell'ipofosfatasia; di supporto, vi sono altri biomarcatori quali PLP e fosfoetanolamina (PEA) urinaria.

Una volta che esiste il sospetto di HPP, i pazienti possono ricordare segni e sintomi precedentemente sottovalutati: deformità rachitiche, fratture frequenti nell'infanzia, perdita prematura dei denti decidui e deambulazione ritardata. Bassi livelli sierici di ALP e anomalie dentali sono i due capisaldi della diagnosi clinica. (77)

La diagnosi viene confermata tramite l'analisi genetica molecolare del gene ALPL. Importante è raccogliere l'anamnesi familiare, poiché essendo una malattia genetica ad espressività variabile possono ritrovarsi clusters familiari. Il rischio di frattura è influenzato dall'anamnesi familiare positiva in maniera indipendente rispetto alla BMD.

4.1 INDAGINI DI LABORATORIO

Esse sono essenziali per la diagnosi di HPP, possono facilitare la diagnosi differenziale con altri disturbi metabolici dell'osso con caratteristiche cliniche o densitometriche analoghe. Le indagini di laboratorio includono gli esami di I e II livello del metabolismo fosfo-calcico.

Tra le indagini di primo livello ritroviamo il dosaggio della fosfatasi alcalina totale (ALP). Livelli persistentemente bassi di ALP, devono far pensare alla ricerca dell'HPP, soprattutto in presenza di fragilità scheletrica o alterazioni dentarie.

4.1.1 MARCATORI DI RIMODELLAMENTO OSSEO (BTM)

In quanto si tratta di esami poco invasivi, i BTM sono, nel loro complesso, un metodo molto utile per studiare il rimodellamento osseo; esso è un processo costante, che agisce per preservare la struttura dell'osso, in cui l'attività catabolica e quella anabolica risultano accoppiate. I marcatori sono impiegati per valutare la compliance e l'efficacia della terapia antirassorbitiva o anabolica nel singolo paziente. Non vengono al momento utilizzati per la diagnosi.

I marcatori di turnover osseo possono essere misurati nel siero e nelle urine; si classificano in marcatori di formazione ossea, correlati all'attività osteoblastica, come l'isoforma ossea della fosfatasi alcalina (bALP), l'osteocalcina, il propeptide del collagene di tipo I (P1NP) e di riassorbimento, legati all'attività osteoclastica quali la desossipiridinolina, i telopeptidi N- e C-terminali del collagene di tipo I (CTX). Negli adulti, un aumento dei marcatori di rimodellamento osseo, oltre i valori normali, indica una eccessiva perdita ossea ed un incremento del rischio di frattura e potrebbe sottendere patologie ossee primarie o secondarie.

I BTM possono essere influenzati dal ritmo circadiano, in particolare quelli di riassorbimento come il CTX che deve essere dosato al mattino a digiuno. Inoltre, nei pazienti con insufficienza renale, i marcatori eliminati per tale via aumentano e possono essere poco attendibili, in questo setting di pazienti, è più utile dosare P1NP o bALP la cui eliminazione è epatica (79). Altri fattori che agiscono su BTM sono quelli legati all'età, infatti, essi raggiungono il loro nadir nelle donne intorno ai 35 anni; mentre aumentano rapidamente nelle donne durante la menopausa. Anche il peso corporeo incide, ed i pazienti con valori di BMI al di sotto della normalità possono presentare incremento dei BTM. Infine, anche l'immobilizzazione prolungata o la guarigione delle fratture si associano ad un aumento del rimodellamento scheletrico.

4.1.1.1 FOSFATASI ALCALINA TOTALE (ALP)

La fosfatasi alcalina è un enzima di membrana in grado di idrolizzare il pirofosfato a pH elevato (pH 8-10), aumenta la concentrazione del fosfato inorganico facilitando la mineralizzazione e riduce il pirofosfato extracellulare che funge da inibitore della mineralizzazione. (77)

La famiglia della fosfatasi alcalina è codificata da 4 geni diversi che derivano da un unico gene ancestrale. 3 geni localizzati su 2q37.1 codificano per un isoenzima della fosfatasi alcalina specifico per intestino (IALP), placenta (PLALP) e cellule germinali (GCALP). Un quarto gene (ALPL), localizzato su 1p36.12, codifica per un isoenzima TNSALP espresso ubiquitariamente, in particolare a livello di fegato, osso e rene. Le isoforme di osso (BALP), fegato (LALP) e rene (KALP) derivano dalla stessa proteina TNSALP. Sono caratterizzate dalla stessa struttura aminoacidica e differiscono solo per modifiche post-traduzionali. Oltre agli isoenzimi principali, sono state identificate tramite cromatografia liquida (HPLC) 4 isoforme di BALP e 3 di LALP (Figura 3) (80).

TNSALP è un enzima che si trova a livello della membrana plasmatica ed è ancorato alla membrana tramite glicosil-fosfatidil-inositolo. Dopo il clivaggio tramite fosfolipasi può ritrovarsi nella forma circolante come un omodimero solubile.

TNSALP è un omodimero e l'interfaccia tra i 2 monomeri è cruciale per la stabilità enzimatica e la funzionalità. Il sito attivo ha 3 siti di legame per metalli (2 per lo Zn^{+} e 1 per il Mg^{+}) necessari per l'attività enzimatica. Un altro sito è occupato dal Ca^{+} . Mutazioni di TNSALP vicino al sito attivo, possono determinare una ridotta attività enzimatica con conseguente deficit di mineralizzazione. Le varie isoforme di ALP differiscono per modifiche post-traduzionali, come la glicosilazione.

TNSALP viene espressa a livello di pre-osteoblasti, osteoblasti, odontoblasti, osteociti, condrociti, cellule del midollo osseo. Mentre non è espresso dagli osteoclasti.

Essa aumenta in tutti i casi di iperattività osteoblastica primitiva o secondaria alla necessità di ulteriore neoformazione ossea.

I valori di riferimento di ALP devono essere corretti per età, sesso ed etnia.

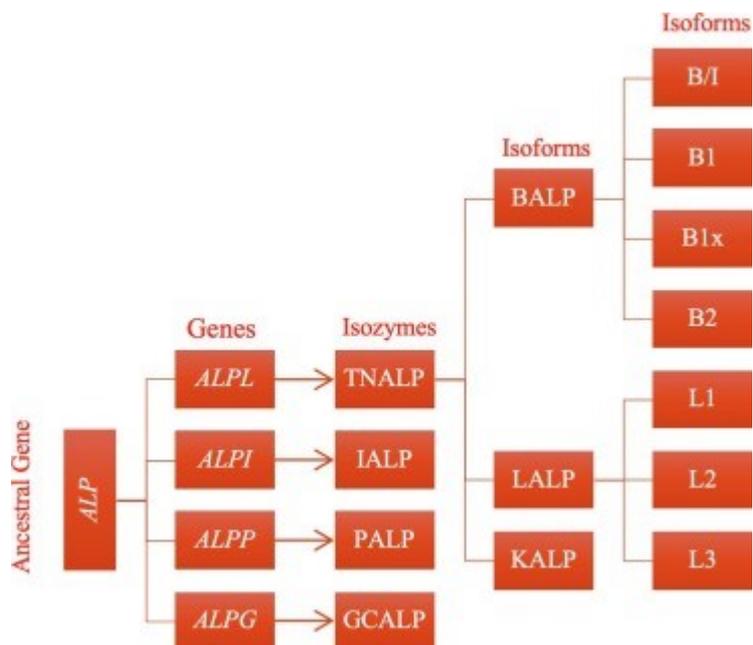


Figura 5: Geni, isoenzimi e isoforme della fosfatasi alcalina (Adattato da Nizet, A. et al., (2020). Bone alkaline phosphatase: An important biomarker in chronic kidney disease - mineral and bone disorder. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 501, 198–206.

ALP è un marker di osteosintesi ed esprime l'attività osteoblastica ma è anche un marker di danno epato-biliare. Nella diagnosi differenziale è indispensabile valutarlo insieme ad altri indici di funzionalità epatica e di colestasi od utilizzare le frazioni di ALP.

Valori elevati di ALP si possono riscontrare più frequentemente nelle seguenti condizioni: in età pediatrica, durante la gravidanza, nella malattia di Paget dell'Osso, nell'Osteomalacia e Rachitismo, nell'Osteoporosi ad elevato turnover, nel carcinoma della prostata con metastasi scheletriche.

Mentre livelli persistentemente ridotti di ALP (Tabella 1) sono comuni nell'Ipofosfatasia, nell'ipotiroidismo, in corso di trapianto polmonare o cardiaco, plasma exchange, somministrazione di immunoglobuline, severa immunosoppressione, chirurgia recente, sepsi, chemioterapia emorragie o trapianto di midollo osseo (81). La terapia antiassorbitiva rappresenta una causa importante di abbassamento dei valori di ALP, che tuttavia possiamo

ritrovare anche in corso di terapia steroidea o in pazienti affetti da celiachia o con carenza di zinco e magnesio.

Un ruolo del TNSALP nei processi infiammatori è suggerito dal verificarsi di infiammazione (osteomielite, artrite) e danni muscolari, ossei e cartilaginei nell'HPP (60). Il ruolo del deficit di TNSALP in altre manifestazioni di HPP (ad esempio, sintomi gastrointestinali) è ancora sconosciuto.

Dunque, il valore di ALP va sempre contestualizzato ed analizzato in relazione al quadro clinico del paziente, è, inoltre, utile avere più di una misurazione per confronto, in modo da distinguere valori transitoriamente ridotti di ALP da valori persistentemente bassi o ai range inferiori dell'intervallo di riferimento. Inoltre, la mutazione con perdita di funzione del gene ALPL che codifica per TNSALP compromette l'idrolisi del pirofosfato inorganico. L'aumento della concentrazione del pirofosfato inorganico che funge da inibitore della mineralizzazione, determina un accumulo di matrice osteoide non mineralizzata (Figura 5) (82).

Dunque, tale mutazione riduce l'attività sierica di ALP con accumulo dei precursori, in particolare del pirofosfato inorganico (PPi), del piridoxal 5-fosfato (PLP) e della fosfoetanolamina urinaria (PEA).

TNSALP ha un ruolo anche nel metabolismo della vitamina B6, per cui un deficit di TNSALP comporta alti livelli di PLP extracellulari (forma attiva della vitamina B6) associati alla comparsa di sintomi neurologici, in particolare nell'HPP ad esordio infantile.

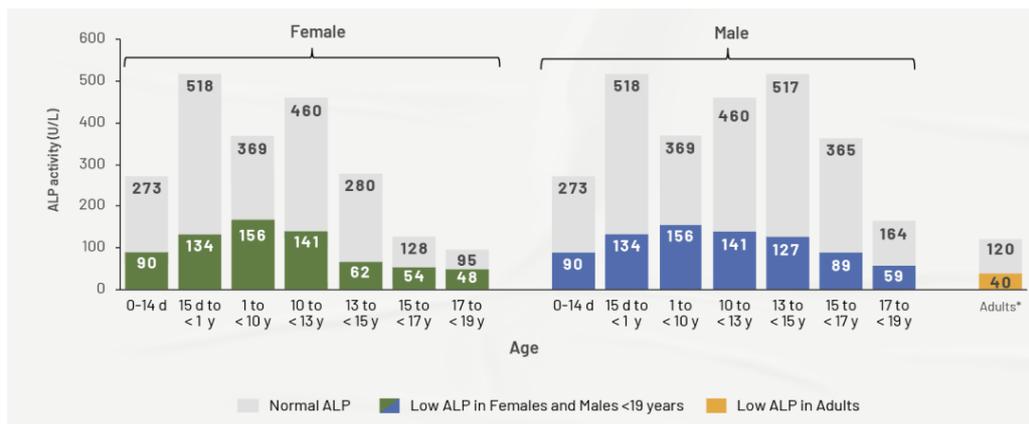


Figura 5: Intervalli di riferimento della fosfatasi alcalina aggiustati per età e sesso (U/L) (Grafico adattato da Colantonio, D. A. et al., (2012). Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: a CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clinical chemistry*, 58(5), 854–868).

4.1.1.2 FOSFATASI ALCALINA OSSEA (bALP)

L'isoforma della fosfatasi alcalina ossea esprime la neoformazione ossea, deriva da modifiche post-traduzionali a partire da TNSALP. È un omodimero ancorato alla membrana degli osteoblasti, dopo il suo clivaggio da parte di una fosfolipasi viene rilasciata in circolo. Essa promuove la formazione di cristalli di idrossiapatite e defosforila l'osteopontina, che funge da inibitore della mineralizzazione, inattivandola. La degradazione di bALP è epatica, dunque non si accumula in caso di insufficienza renale, è un marker particolarmente utile in pazienti con insufficienza renale. Inoltre, ha una lunga emivita (circa 1-2 gg), non è influenzata da variazioni diurne. bALP aumenta in condizioni fisiologiche (come l'accrescimento o la guarigione delle fratture) ma anche patologiche come nel Morbo di Paget dell'osso, tumori dell'osso, rachitismo, osteomalacia (80). Mentre bassi valori si ritrovano nel HPP, mieloma multiplo o in caso di lesioni osteolitiche.

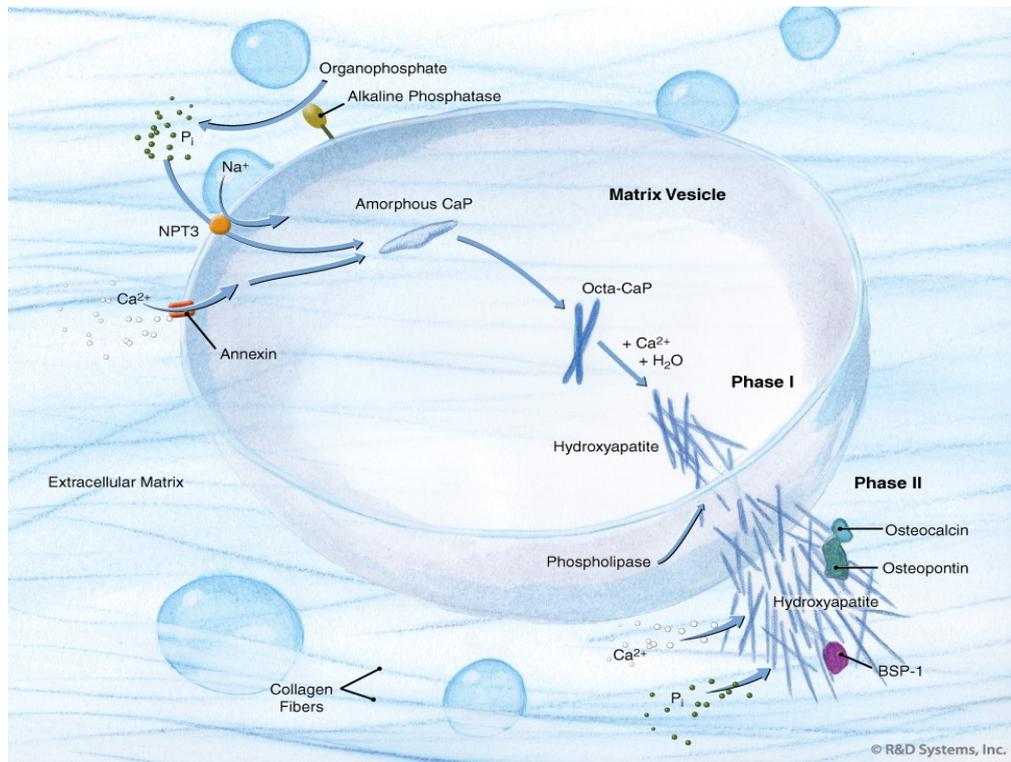


Figura 6: Ruolo della fosfatasi alcalina nel processo di mineralizzazione ossea (Adattato da Vimalraj S. (2020). Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*, 754, 144855).

4.1.1.3 P1NP

P1NP deriva dal clivaggio post-traduzionale del procollagene di tipo I. Il P1NP sierico origina principalmente dal tessuto scheletrico, mostra poche variazioni circadiane ed aumenta durante la neoformazione ossea. Inoltre, come vantaggi, presenta una scarsa variabilità inter-individuale ed il campione è stabile a temperatura ambiente. Esso viene eliminato per via epatica. Dunque, può essere dosato nei pazienti affetti da insufficienza renale.

4.1.1.4 (CTX)

CTX è generato dall'attività della catepsina K, deriva dalla degradazione del collagene di tipo I. È specifico per il tessuto scheletrico e diminuisce durante la terapia antiassorbitiva. L'epitopo di CTX contiene un motivo di aspartil-glicina suscettibile a spontanea isomerizzazione e racemizzazione generando 4 isoforme. L'acido α -aspartico si converte nella forma β man mano che l'osso invecchia. Il principale svantaggio è la grande variazione circadiana, il campione per il dosaggio deve essere raccolto al mattino, a digiuno.

4.1.2 BIO-MARCATORI DI SUPPORTO PER DIAGNOSI DI HPP

Nell'HPP, a causa di una ridotta attività della fosfatasi alcalina, si verifica un accumulo extra-cellulare di numerosi substrati come il pirofosfato inorganico (PPI), il piridossal-5-fosfato (PLP) e la fosfoetanolamina urinaria (PEA). L'accumulo di pirofosfato inorganico inibisce la formazione del complesso calcio-fosfato dell'idrossiapatite, provocando la formazione di matrice osteoide non mineralizzata (83,84).

TNSALP ha anche un ruolo nel metabolismo della vitamina B6. PLP, substrato del TNSALP, è la forma biologicamente attiva e più abbondante di vitamina B6. TNSALP defosforila il piridossal-5-fosfato a piridossale (PL) permettendogli di oltrepassare la membrana intracellulare e di penetrare nel SNC. Il PLP interviene nella sintesi di alcuni neurotrasmettitori cerebrali (serotonina, dopamina, GABA); nel HPP, bassi livelli di TNSALP si traducono in bassi livelli intracellulari di PLP con danni neurologici e manifestazioni epilettiche. Elevate concentrazioni plasmatiche di PLP si riscontrano in pazienti sia adulti sia pediatrici affetti da HPP; tuttavia, un valore normale o basso di PLP non è in grado di escludere la diagnosi di HPP. Inoltre, alcuni fattori preanalitici interferiscono con il dosaggio come la sensibilità alla luce, l'instabilità del campione a temperatura ambiente ed il legame all'albumina, per cui il dosaggio può essere influenzato dallo stato nutrizionale, dall'infiammazione e dai farmaci. Il PLP può diminuire in seguito ad assunzione di carboidrati per cui il dosaggio deve avvenire a digiuno (85).

La PEA urinaria è un altro substrato di TNSALP utile per il supporto alla diagnosi e per stimare il carico di malattia. Si riscontrano, spesso, valori elevati di PEA nei soggetti con HPP sia dell'adulto che in età pediatrica (86).

Inoltre, può essere usato come marcatore nel follow up della terapia sostitutiva con asfotase alfa (85).

4.2 INDAGINI RADIOGRAFICHE

Le radiografie dello scheletro sono utili poiché mostrano elementi caratteristici dell'HPP. Nelle forme severe dell'infanzia si riscontrano, alle indagini radiografiche, l'ipomineralizzazione diffusa in tutti i distretti e le deformazioni dell'osso. Le radiografie delle ossa lunghe mostrano aree radiolucenti che si proiettano dalla cartilagine di accrescimento a livello della metafisi, la metafisi può apparire allargata con osteopenia ed osteosclerosi a chiazze (Figura 6). Inoltre, può esserci craniosinostosi, prominenza della fontanella anteriore con proptosi oculare ed alterazioni del torace e a livello delle giunzioni costocondrali.

Nell'HPP dell'adulto le principali caratteristiche sono osteopenia, scarsa consolidazione delle fratture da stress metatarsali, pseudofratture che comunemente coinvolgono la regione subtrocanterica laterale del femore (Figura 7). Inoltre, depositi di pirofosfato possono riscontrarsi alle radiografie di vari segmenti ossei in particolare a livello di mani e piedi (63).

4.3 DENSITA' MINERALE OSSEA

La DEXA è la tecnica d'elezione per stimare la massa ossea ed è utilizzata nelle patologie da fragilità scheletrica per predire il rischio fratturativo e per il follow-up. Essa valuta il contenuto minerale osseo [BMC, g/cm di segmento osseo] e la densità minerale ossea [BMD, g/cm² di segmento osseo]. Una diagnosi densitometrica d'osteoporosi si basa sulla valutazione del T-score; esso corrisponde alla differenza espressa sotto forma di deviazioni standard (SD) tra il valore di BMD del paziente ed il valore medio di BMD in soggetti adulti e sani al picco di massa ossea. Altro valore ad essere considerato specialmente nelle donne in premenopausa e negli uomini di età < 50 anni è lo Z-score che confronta il valore di BMD del paziente in relazione al valore medio di BMD in soggetti di pari età e sesso. L'OMS per la diagnosi di osteoporosi considera validi solo valori di BMD (T-score < -2.5) ottenuti tramite DEXA a livello della colonna lombare e del femore. I criteri dell'OMS non sono applicabili alle donne in premenopausa e agli uomini di età < 50 anni.

La misurazione densitometrica tramite DEXA può essere alterata da fratture vertebrali, manifestazioni artrosiche, calcificazioni extrascheletriche, lesioni focali e altre anomalie, che non permettono una corretta valutazione della densità minerale ossea con questa metodica. Qualora fossero presenti queste alterazioni è necessario escludere le vertebre interessate dalla valutazione DEXA, per poter effettuare l'esame devono però rimanere almeno 2 vertebre disponibili; vertebre adiacenti sono escluse dalla valutazione anche se presentano un T-score che differisce di oltre 1.0. Per questi motivi oltre i 65 anni la valutazione densitometrica lombare potrebbe essere meno accurata di quella femorale.

Una riduzione della BMD è un'importante fattore di rischio per le fratture. La BMD dipende dal picco di massa ossea raggiunto durante la maturità e dalla successiva perdita di massa ossea associata alla menopausa e all'invecchiamento, ed è influenzata da fattori genetici e nutrizionali, stile di vita, comorbidità e da numerosi farmaci. I pazienti con HPP hanno valori di BMD nei limiti o solo di poco inferiori alla norma. Nei pazienti con HPP ritroviamo un'aumentata fragilità scheletrica in assenza di bassi valori di BMD (68). In particolare, i valori di BMD non vertebrali sono eterogenei, mentre i

valori di BMD lombare si riscontrano tendenzialmente nei limiti di norma o più elevati. Alcuni Autori ipotizzano che l'incremento della BMD lombare possa essere determinato da iperostosi e da un'alterata mineralizzazione con un eccesso di matrice osteoide. Infatti, elevati valori di BMD non necessariamente indicano un reale incremento della massa ossea. Fratture non osteoporotiche e valori di BMD lombare più elevati della norma potrebbero essere inclusi tra i criteri diagnostici per HPP (87). Dunque, la DEXA non è accurata per predire il rischio di frattura nell' HPP.

4.4 TOMOGRAFIA QUANTITATIVA COMPUTERIZZATA (QCT) E RM SPINALE

Permette una misura volumetrica della BMD (g/cm³) della colonna e dell'anca, sia totale che compartimentale, ed è in grado di differenziare la BMD trabecolare da quella corticale. Un elemento a suo svantaggio è l'alta dose di radiazioni necessaria ad acquisire l'immagine [circa 100 µSV]. La DEXA ha il vantaggio rispetto alla QCT di essere più precisa e di avere un minore tempo d'acquisizione dell'immagine, una calibrazione più stabile, una minore esposizione alle radiazioni e costi inferiori. Vi è anche una pQCT che misura i segmenti periferici come radio e tibia e permette di analizzare parametri geometrici correlati con la resistenza dell'osso (densità corticale, sezione trasversale, momento d'inerzia); La pQCT ad alta risoluzione può essere usata per indagare con buona accuratezza parametri della microarchitettura dell'osso ma attualmente è utilizzata con fini di ricerca e non nella pratica clinica. Nei pazienti con HPP è riportata una ipomineralizzazione dell'osso corticale. Inoltre, l'osso corticale appare ridotto di spessore nei pazienti con HPP e fratture (70).

La RMN spinale è indicata in presenza di fratture multiple. Poiché permette di discriminare tra fratture recenti, in cui vi è edema visibile nelle sequenze STIR o T2-pesate, e quelle pregresse. Inoltre, essa identifica fratture da stress spesso localizzate nelle metafisi.

4.5 GENETICA DELL'IPOFOSFATASIA

L'HPP è causata da mutazioni con perdita di funzione del gene ALPL, sul cromosoma 1p36.1-34 che codifica per la fosfatasi alcalina non tessuto specifica (TNSALP o TNAP); questo gene è costituito da 12 esoni distribuiti in 50 kb. Circa 80% sono mutazioni puntiformi missenso (mutazione puntiforme che comporta lo scambio tra due aminoacidi del DNA; dando origine ad un codone codificante per un diverso aminoacido) (70). Esistono più di 340 mutazioni diverse, inoltre, risulta difficile individuare una correlazione genotipo-fenotipo, poiché interferiscono altri fattori epigenetici ed ambientali che possono modificare il fenotipo (88). La prevalenza delle forme severe è stimata intorno 1/300,000 in Europa e 1/100,000 in Nord America.

Come abbiamo già visto, lo spettro clinico è estremamente variabile.

Le forme gravi di HPP, prevalentemente ad insorgenza precoce, come la perinatale e l'infantile, sono ereditate con modalità autosomica recessiva; mentre forme moderate possono presentare un'ereditarietà sia autosomica dominante che recessiva. Nelle mutazioni in eterozigosi la forma mutata dimerizza con quella wild-type e la capacità enzimatica ne risulta ridotta (effetto dominante negativo).

Nelle forme dell'adulto, quando i sintomi sono aspecifici, la malattia non è sempre facilmente identificabile, nonostante bassi livelli di fosfatasi alcalina, che però possono ritrovarsi anche in altre condizioni. La conferma con test genetico è perciò molto utile. Nonostante ciò, molti pazienti pauci-sintomatici e con bassi valori di ALP risultano negativi per varianti di ALPL. Dagli studi è emersa un'elevata eterogeneità genetica dell'HPP (89). La distribuzione delle varianti ALPL in Europa mostra che la maggior parte delle varianti ricorrenti derivano da un unico evento mutazionale.

Nell'ambito di HPP si possono individuare tre sottotipi distinguibili per caratteristiche genetiche e prevalenza. Forme severe recessive, moderate recessive, moderate dominanti. Le forme severe di HPP (1/300.000) sono in omozigosi o con mutazioni composte in eterozigosi. Il fenotipo delle forme severe viene suddiviso tra forme molto gravi e forme letali. Mutazioni missenso con manifestazioni severe riguardano domini cruciali come il sito attivo dell'enzima.

Forme moderate (1/2430) sono principalmente causate da varianti missenso con effetto dominante negativo, mentre forme lievi con segni aspecifici (1/508) potrebbero essere determinate da aploinsufficienza (condizione di mancanza del 50% di un prodotto genico, in cui il prodotto residuo non è sufficiente a svolgere la sua funzione).

Lo screening per la ricerca delle mutazioni genetiche è essenziale per la diagnosi prenatale nelle famiglie affette da forme severe di HPP ed è utile per confermare la diagnosi quando i dati clinici e biochimici risultano suggestivi di HPP o per distinguerla da altre patologie che potrebbero mostrare presentazioni simili come l'Osteogenesi Imperfetta.

5. TERAPIA DELL' IPOFOSFATASIA

L'HPP è associata ad una significativa morbidità e mortalità nei pazienti pediatrici. La mortalità sfiora il 100% per le forme ad esordio perinatale e il 50% per le forme ad esordio infantile. Asfotase alfa è il farmaco di prima scelta in Europa, è approvato per la terapia a lungo termine delle forme di HPP ad esordio pediatrico, per trattare le manifestazioni scheletriche. Si tratta di una terapia sostitutiva con TNSALP umano ricombinante specifico per il tessuto scheletrico. L'asfotase alfa è una glicoproteina solubile composta da due catene polipeptidiche identiche. Ognuna di queste catene è costituita dal dominio catalitico del TNSALP umano, dal dominio G1 Fc dell'immunoglobulina umana e da un peptide deca-aspartato utilizzato come dominio di targeting osseo.

Uno studio di follow-up sull'efficacia e sulla sicurezza della durata di 5 anni con una durata media del trattamento di 2,7 anni ha indicato che l'asfotase alfa comporta un rapido e duraturo miglioramento delle manifestazioni scheletriche della malattia, promuovendo la mineralizzazione scheletrica, influisce, inoltre, anche sulla funzionalità respiratoria (riducendo la respirazione artificiale e migliorando l'insufficienza respiratoria), sull'aumento di peso, la crescita e normalizza la forza muscolare, migliorando nel complesso la qualità di vita. Asfotase-alfa migliora dunque la sopravvivenza nei pazienti HPP perinatali e infantili potenzialmente letali (90).

Viene somministrato per via sottocutanea, con un regime posologico basato sul peso corporeo ed ha un'emivita di circa 2,28 giorni. È generalmente ben tollerato. I più comuni effetti avversi sono reazioni a livello del sito di inoculo con eritema, noduli sottocutanei, celluliti e reazioni da ipersensibilità (77,91,92).

Nel 2018, in uno studio multicentrico, randomizzato, in aperto della durata di 5 anni, Kishnani et al. hanno esaminato l'efficacia e la sicurezza della terapia con asfotase-alfa negli adulti e negli adolescenti con HPP (90).

Per le forme dell'adulto complicate da fratture viene, talvolta, impiegato il teriparatide. Il teriparatide è un farmaco anabolico, analogo del PTH con 34 amminoacidi. Esso è attualmente approvato per il trattamento dell'Osteoporosi severa. Si somministra quotidianamente s.c. al dosaggio di 20 µg per 24 mesi.

Alcuni case report hanno riportato l'ipofosfatasia dell'adulto trattata con teriparatide con una buona efficacia sul dolore osseo e sul consolidamento ma con risultati contrastanti sui marcatori biologici (93). Il suo uso nell'HPP risulta quindi off-label e resta controverso.

Cruciale è evitare l'uso di bisfosfonati nei pazienti con HPP, poiché essi, in questa categoria di soggetti, possono peggiorare l'ipomineralizzazione. I pazienti con HPP che assumono bisfosfonati presentano un rischio maggiore di sviluppare fratture atipiche femorali (77).

È stato riportato che i FANS (ad es. Naprossene) forniscono un miglioramento significativo con aumento della forza muscolare, distanza percorsa normalizzata e riduzione del dolore dovuto ai livelli di prostaglandine normalizzati nei bambini con HPP (94,95). Secondo gli autori, il trattamento con FANS dovrebbe essere preso in considerazione nei pazienti con dolore significativo e sintomi infiammatori (95), tenendo sempre conto della funzionalità renale.

Pertanto, è necessario un attento monitoraggio della funzionalità renale ed è giustificata un'attenta scelta delle sostanze utilizzate (ad es. inibitori della COX aspecifici vs. specifici e inibitori della sintesi delle prostaglandine). Per quanto riguarda la fisiopatologia sottostante, anche una terapia antinfiammatoria mirata che utilizza il blocco di IL1 potrebbe essere un'utile opzione terapeutica in questi pazienti (96).

III. CENNI SUI FARMACI ANTIRIASSORBITIVI E ANDAMENTO DEI MARCATORI DI RIMODELLAMENTO OSSEO IN CORSO DI TERAPIA

1. BISFOSFONATI

Sono farmaci di prima linea per il trattamento dell'Osteoporosi; sono composti sintetici che posseggono un legame bisfosfonato, sono analoghi del pirofosfato inorganico, ma si differenziano per via di un legame P-C-P che li rende resistenti all'idrolisi enzimatica in ambiente acido e alle pirofosfatasi. Essi si legano selettivamente al tessuto osseo sottoposto a rimodellamento. Agiscono inibendo il rimodellamento poiché inibiscono l'attività osteoclastica, il meccanismo d'azione differisce a seconda che presentino un gruppo aminico o meno. Trovano impiego in patologie ossee caratterizzate da eccessiva attività osteoclastica sia benigne come Morbo di Paget, Osteoporosi, sia per patologie maligne come l'osteolisi tumorale. Possiamo individuare farmaci di I generazione come Etidronato e Clodronato, essi sono non-amino bisfosfonati, una volta incorporati negli osteoclasti, vengono metabolizzati in un analogo citotossico dell'ATP, che ne impedisce la capacità riassorbente. Essi provocano un aumento della BMD vertebrale e mantengono stabile la BMD a livello del collo femorale nelle donne in postmenopausa. Attualmente sono considerati farmaci di seconda linea usati specialmente in prevenzione primaria per via del loro basso costo.

I farmaci di II e III generazione approvati in Europa sono: alendronato, risedronato, ibandronato e zoledronato: si differenziano da quelli di prima generazione per la presenza di un atomo di N che ne aumenta la potenza, agiscono interferendo con alcuni passaggi metabolici della via del mevalonato ed impedendo la prenilazione di proteine necessarie al mantenimento del citoscheletro degli osteoclasti, che si riducono di numero in parte a causa dell'apoptosi indotta dall'inibizione dell'enzima farnesilpirofosfato sintetasi. L'assorbimento intestinale è molto scarso, intorno al 0.5- 5% ed è

compromesso da cibi che contengono calcio, ferro o altri ioni bivalenti che chelano i bisfosfonati. L'emivita plasmatica è inferiore a due ore, ma l'emivita della quota incorporata nell'osso supera i 10 anni; non metabolizzati vengono escreti immutati nelle urine. Le vie di somministrazione sono quella orale ed intramuscolo (giornaliera, settimanale, mensile) e la via endovenosa con intervalli di tempo che per i BP più potenti come lo zoledronato arrivano a 12 mesi. La somministrazione dei bisfosfonati è controindicata se il tasso di filtrazione glomerulare è < 35ml/min.

Nella somministrazione endovenosa di aminobisfosfonati (o nelle alte dosi di BP per via orale) il più comune effetto collaterale è una reazione di fase acuta che si manifesta con sintomatologia simil-influenzale: febbre di lieve entità, mialgie, astenia della durata di 1-3 giorni. Queste manifestazioni sono più frequenti e marcate alla prima infusione del farmaco. Un'altra complicanza è costituita da fratture atipiche subtrocanteriche in pazienti in terapia da molti anni, tuttavia tale complicanza è ancora oggetto di studio. Gli effetti di zoledronato ed alendronato sulla BMD e sul turnover osseo persistono per diversi mesi dopo l'interruzione della terapia.

2. DENOSUMAB

Il denosumab è un anticorpo monoclonale umano IgG2 con affinità e specificità per RANKL. RANK è un recettore posto sulla superficie dei precursori degli osteoclasti e sugli osteoclasti maturi, quando il ligando di RANK si lega viene promossa l'osteoclastogenesi, la maturazione e la sopravvivenza degli osteoclasti. Il denosumab esercita un'azione anti-RANKL inibendone l'azione, riducendo la differenziazione, l'attivazione e la sopravvivenza degli osteoclasti, diminuendo dunque il riassorbimento e il turnover osseo e successivamente la formazione ossea. È approvato per il trattamento delle donne con Osteoporosi postmenopausale e di quella maschile, inclusi pazienti in terapia con deprivazione androgenica per carcinoma della prostata e in terapia con inibitori dell'aromatasi per neoplasia mammaria. Viene somministrato alla dose di 60 mg ogni 6 mesi per via sottocutanea, non è necessario una modificazione della posologia in caso di insufficienza renale. Vi sono alcune differenze con i bisfosfonati; infatti, l'effetto del denosumab termina non

appena il farmaco è eliminato dal plasma, ciò viceversa comporta la necessità per un paziente che sospenda la terapia di intraprendere un trattamento alternativo. Inoltre, la terapia di lunga durata si associa con un persistente incremento nella BMD mentre con gli altri agenti antiriassorbitivi si raggiunge un plateau dopo 3-4 anni di trattamento. Il denosumab deve associarsi ad una adeguata assunzione di calcio e vitamina D giornaliera. L'ipocalcemia deve essere corretta prima di iniziare la terapia in quanto il trattamento può provocare ipocalcemia.

Dopo la sospensione del denosumab i marcatori di rimodellamento osseo, se non si continua con una terapia sequenziale, raggiungono i valori pretrattamento e nell'arco di 12-24 mesi dall'ultima somministrazione di denosumab, si perde la BMD guadagnata durante la terapia.

3. ANDAMENTO DEI MARCATORI DI RIMODELLAMENTO OSSEO (BTM) IN CORSO DI TERAPIA CON FARMACI ANTIRIASSORBITIVI

I BTM subiscono una rapida e considerevole modifica durante la terapia per l'osteoporosi con i farmaci antiriassorbitivi e la loro misurazione si è dimostrata utile anche durante lo sviluppo dei farmaci. La risposta al trattamento permette di definire la dose e la frequenza di somministrazione più adeguata ed ha aiutato a definire il meccanismo di azione dei farmaci impiegati. La riduzione dei BTM avviene entro giorni o settimane dall'inizio della terapia, mentre modifiche della BMD sono evidenti solo dopo mesi o anni. Dunque, i BTM forniscono una risposta più precoce riguardo la risposta al trattamento intrapreso. Dunque, monitorare i marcatori è utile per valutare la risposta terapeutica. La riduzione dei BTM durante terapia antiriassorbitiva con bisfosfonati è intorno al 50% o più, mentre l'incremento di BMD è modesto circa 5% (97).

L'intensità di risposta ed il tempo con cui questa si verifica dipende dal farmaco scelto, dal dosaggio, dai singoli marcatori di rimodellamento osseo. Inoltre, è influenzato dal meccanismo di azione del farmaco.

Dunque, il trattamento di donne in postmenopausa con bisfosfonati come Alendronato, risulta in un rapido decremento dei marcatori di riassorbimento, seguito da una riduzione dei marcatori di neoformazioni con una latenza di circa 4 settimane, nel 80% dei pazienti dopo 3 mesi di terapia il CTX si riduce del 56% ed il P1NP del 38% (79). Inoltre, l'acido zoledronico somministrato annualmente alla dose di 5 mg e.v. produce una riduzione più rapida dei marcatori di riassorbimento rispetto ad alendronato somministrato per os ogni mese, la riduzione del CTX in questo caso avviene entro 2 settimane (97). Inoltre, durante la terapia con Zoledronato 5 mg e.v. vs placebo si assiste ad un decremento significativo dei BTM nei pazienti trattati con Zoledronato. A 12 mesi dall'infusione i livelli di CTX, bALP e P1NP erano del 59%, 30% e 58% più bassi, rispettivamente nel gruppo con Zoledronato. Le infusioni di Zoledronato sono state ripetute a 12, 24 e 36 mesi ed i valori sui BTM sono rimasti stabili, senza una ulteriore riduzione dei marcatori (Figura 8) (98). Infine, nello studio di Cummings sono stati confrontati denosumab versus placebo. È emerso che il denosumab, comparato con il placebo, riduce il CTX del 86% nel primo mese, del 72% dopo 6 e a 36 mesi di terapia. I livelli di P1NP erano del 18%, 50% e 76% più bassi rispetto a quelli del gruppo placebo negli stessi intervalli di tempo (Figura 9) (99).

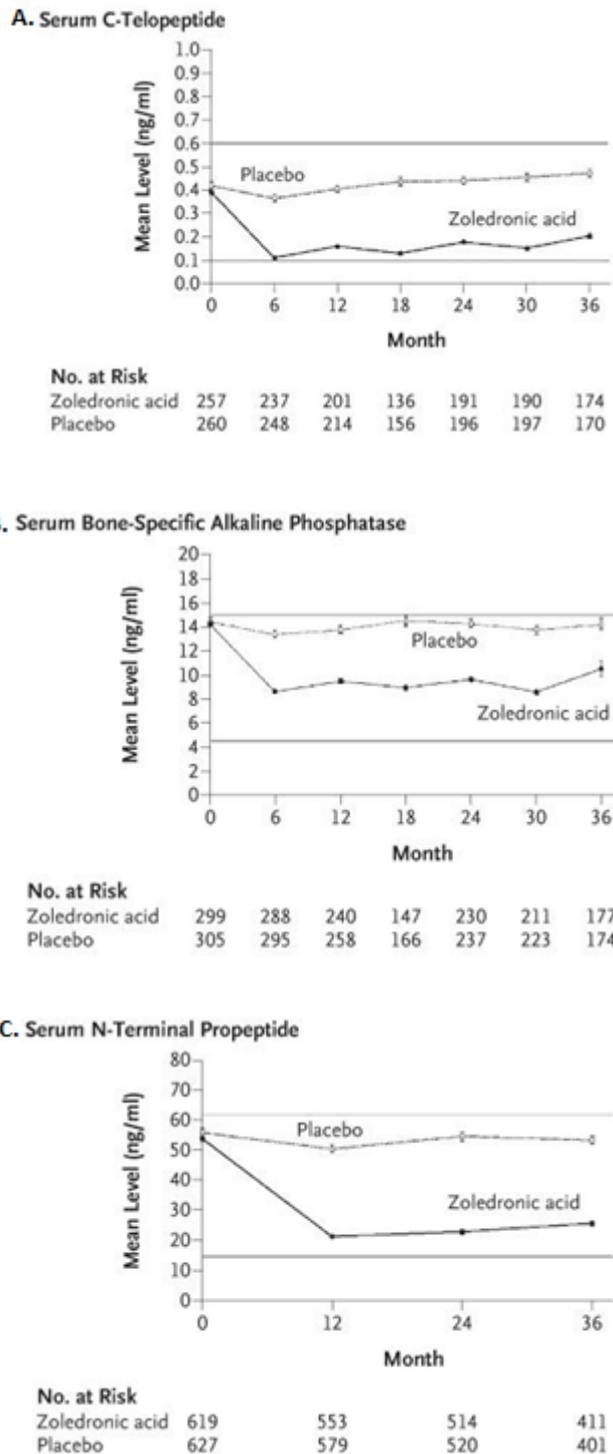


Figura 8. Percentuale di cambiamento nel tempo dei marcatori biochimici durante la terapia con Zoledronato vs placebo. I BTM sono CTX (grafico A), bALP (grafico B), e P1NP (grafico C).

A 12 mesi, i livelli sierici di CTX, bALP e P1NP erano inferiori rispettivamente del 59% (95% CI, da 55 a 63), 30% (95% CI, da 27 a 32) e del 58% (95% CI,

da 55 a 60), nel gruppo trattato con acido zoledronico ($P < 0,001$ per tutti i confronti).

I range di riferimento nelle donne in premenopausa (indicati da linee orizzontali sopra e sotto i punti del gruppo in studio) sono dati provenienti dallo studio Os des Femmes de Lyon (OFELY) (Adattato da Black, D. M. et al., HORIZON Pivotal Fracture Trial (2007). Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *The New England journal of medicine*, 356(18), 1809–1822.

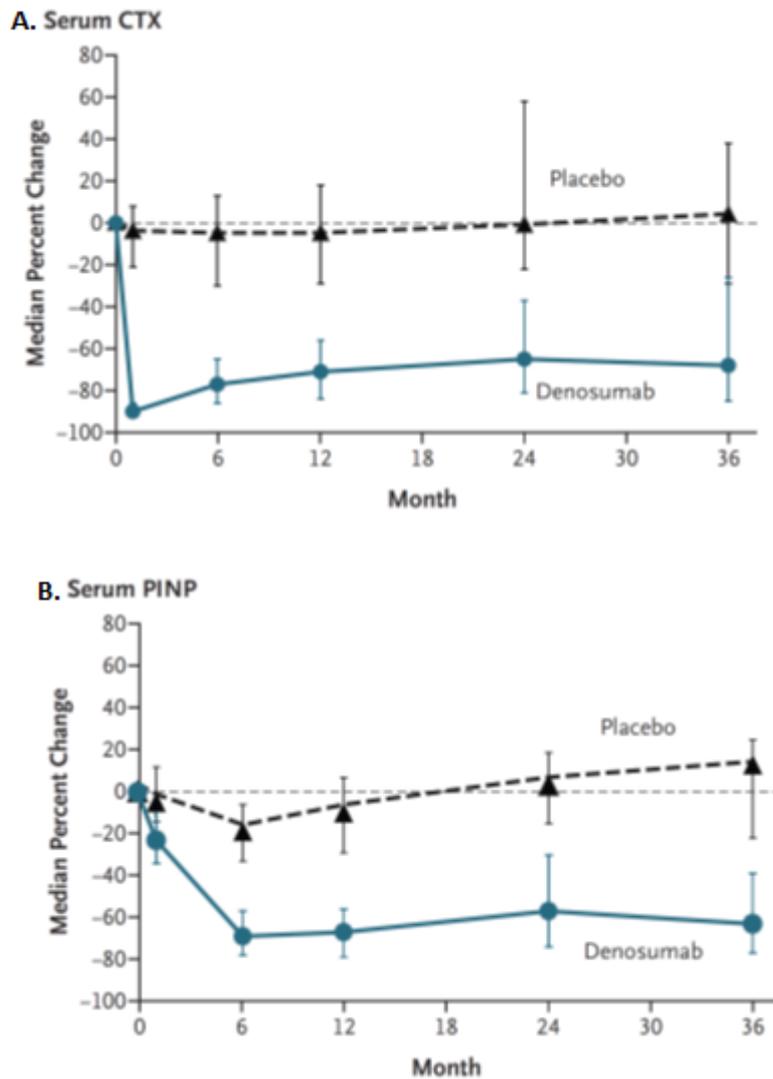


Figura 9: Percentuale di cambiamento nel tempo di CTX e P1NP in corso di terapia con denosumab vs placebo (Adattato da Cummings, S. R. et al., FREEDOM Trial (2009). Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *The New England journal of medicine*, 361(8), 756–765.

IV. INTRODUZIONE ALLO STUDIO

L'ipofosfatasi (HPP) è una rara ed eterogenea malattia metabolica ereditaria caratterizzata da deficit della mineralizzazione di ossa e denti ed associata a complicanze scheletriche ed extra-scheletriche. Nelle forme dell'Adulto ad esordio più tardivo, la rarità del disturbo ed i sintomi frequentemente aspecifici e comuni con altre patologie dello scheletro, tra cui l'osteoporosi post-menopausale, possono portare ad errori diagnostici ed a una sottostima della malattia.

Generalmente, i pazienti con HPP sono più giovani dei pazienti osteoporotici e presentano più frequentemente fratture femorali o metatarsali piuttosto che fratture vertebrali.

Dallo studio di Genest e collaboratori emerge che il 48,2% dei pazienti con HPP sperimenta una frattura nel corso della propria vita. I principali fattori di rischio per frattura sembrano essere: 2 specifiche varianti del gene ALPL, bassi valori di ALP, valori elevati di fosforo e di PLP. Inoltre, un valore elevato di T-score a livello della colonna lombare è risultato significativamente correlato con la prevalenza di fratture di HPP (73).

Le conseguenze di una frattura da fragilità sono estremamente gravi, sia in termini di mortalità e morbidità, che di costi socio-sanitari. La mortalità ad un anno dopo una frattura di femore è del 15-25%, mentre il 30% dei pazienti diviene permanentemente disabile, il 40% perde la capacità di camminare autonomamente in modo definitivo e l'80% subisce una perdita di autonomia nelle attività di vita quotidiana dopo la frattura (100). Ciò si ripercuote negativamente anche a livello economico sui Sistemi Sanitari Nazionali, comportando un aumento dei costi sociali (101). Inoltre, una frattura da fragilità è un fattore di rischio per lo sviluppo di successive fratture, sia nello stesso sito che in altri distretti ossei.

Per questi motivi risulta di cruciale importanza delineare un corretto ed appropriato percorso diagnostico-terapeutico.

Una eventuale diagnosi errata potrebbe comportare un rischio fratturativo aumentato per il paziente. I soggetti con HPP, se trattati con farmaci antiassorbitivi, come i bisfosfonati, che sopprimono ulteriormente l'attività di TNSALP, possono presentare un incremento del rischio di fratture da fragilità.

In particolare, risultano comuni fratture atipiche femorali in regione subtrocanterica, delle ossa metatarsali, della tibia e pseudofratture.

Dal punto di vista biumorale i pazienti con HPP sono per lo più caratterizzati da ridotti valori di attività di ALP e da un incremento dei substrati di TNSALP, come la PLP plasmatica e la fosfoetanolamina urinaria. Questi ultimi test, che supportano la diagnosi, non sono facilmente eseguibili in tutti i laboratori di analisi, ma solo in alcuni centri specialistici. Inoltre, il loro ruolo rimane ad oggi controverso. La conferma diagnostica definitiva deriva dall'analisi genetica per la ricerca delle mutazioni del gene ALP.

Inoltre, bassi valori di ALP possono riscontrarsi anche in altri setting di pazienti, parimenti con fratture da fragilità, ma non affetti da HPP; ad esempio, i pazienti con Osteoporosi primitiva in terapia antirassorbitiva possono avere bassi valori di ALP, secondari al trattamento stesso.

Il nostro studio si basa sull'osservazione che nell'HPP si riscontrano ridotti livelli di ALP e bALP per effetto della mutazione genetica, mentre i restanti marcatori di rimodellamento scheletrico (P1NP e CTX) non risultano direttamente coinvolti.

Nei pazienti con Osteoporosi in terapia con farmaci antirassorbitivi, sia essa con aminobisfosfonati o con denosumab, si assiste ad una riduzione dei marcatori di rimodellamento scheletrico, sia anabolici che catabolici, con andamento consensuale.

V. OBIETTIVO

Lo scopo di questo studio è dunque quello di investigare se il rapporto tra i marcatori di rimodellamento scheletrico possa essere utile per distinguere pazienti affetti da HPP da pazienti con osteoporosi e bassi livelli di ALP secondari a terapia con farmaci antiriassorbitivi.

VI. PAZIENTI E METODI

È stato condotto uno studio clinico retrospettivo osservazionale multicentrico, non di intervento.

Criteri d'inclusione:

Sono stati inclusi nello studio soggetti adulti di età superiore ai 18 anni, di entrambi i sessi, afferenti a 5 Centri Italiani Specializzati nell'ambito delle Malattie Metaboliche dello Scheletro (Figura 10) e con diagnosi di Ipofosfatasia. L'arruolamento è avvenuto considerando dati dal 2014 al 2022. La diagnosi di Ipofosfatasia è stata posta sulla base di criteri clinici (segni, sintomi e complicanze dell'Ipofosfatasia) (Figura 2), laboratoristici e genetici. Tutti i pazienti arruolati presentano valori di ALP \leq 50 U/L, dopo aver escluso altre cause di bassa attività di ALP (Tabella 1) ed altre patologie scheletriche con le medesime caratteristiche.

Come gruppo di controllo sono stati selezionati pazienti adulti di età superiore ai 18 anni con diagnosi di osteoporosi (BMD T score \leq - 2,5 a livello femorale o vertebrale e/o 1 frattura da fragilità), trattati con farmaci antiriassorbitivi, (Denosumab 60 mg s.c. o Ac. Zoledronico 5 mg e.v. entro 12 mesi), con valori di ALP \leq 50 U/L.

Nel gruppo di controllo, oltre a prendere in considerazione valori di ALP in corso di terapia, abbiamo riportato anche lo stesso valore al basale per evitare di includere pazienti malati tra i controlli.

Criteria d'esclusione:

Sono stati esclusi pazienti affetti da Ipofosfatasi in terapia con asfotase-alfa; pazienti con le seguenti patologie: Iperparatiroidismo primitivo, malattia di Paget dell'Osso, neoplasie primitive e secondarie del tessuto osseo, malattie croniche intestinali, ipofosfatemia alcalina da altra causa come ipercortisolismo endogeno ed esogeno, celiachia, anoressia, carenza di zinco e magnesio, ipovitaminosi D (< 75 nmol/L) se non corretta, insufficienza renale stadio 3b (GFR < 45 ml/min).

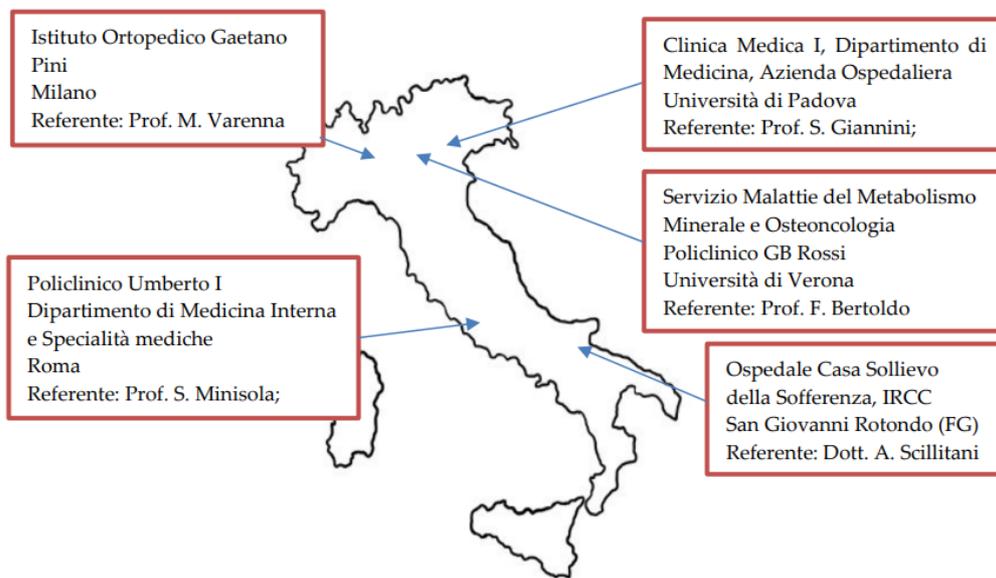


Figura 10: Centri coinvolti nello studio.

Valutazione clinica, laboratoristica e strumentale:

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a raccolta anamnestica ed esame obiettivo completo. Inoltre, è stato prelevato un campione ematico a digiuno per la valutazione dei principali parametri del metabolismo fosfo-calcico, comprensivi dei seguenti marcatori di rimodellamento scheletrico: CTX, P1NP, ALP totale e bALP. Sono stati, inoltre, eseguiti i rapporti tra i vari marcatori (Total ALP/P1NP, Bone ALP/P1NP, Total ALP/CTX, Bone ALP/CTX) e tali rapporti sono stati confrontati tra malati e controlli. Sono stati effettuati dosaggio della vitamina B6 (PLP) ed una raccolta urinaria delle 24 h per il dosaggio di calciuria e fosfaturia. Inoltre, nei pazienti malati è stata condotta, su DNA estratto da leucociti di sangue periferico, l'analisi genetica per la ricerca delle mutazioni del gene ALP (sequenziamento di nuova generazione con Illumina NextSeq 550 e kit AgilentSureselect custom).

Nello specifico gli esami di laboratorio richiesti sono stati analizzati con le seguenti metodiche:

- Metodi automatizzati su strumentazione Cobas 8000 (Ditta Roche Diagnostics): creatininemia e creatininuria (enzimatico, calibratore tracciabile con metodo di riferimento IDMS); calcemia, calciuria e fosfaturia (colorimetrico 5-nitro-5'-methyl-ethan-N',N',N',N'-tetraacetico-acido); ALP totale (metodo enzimatico-colorimetrico, racc. IFCC), Magnesio (colorimetrico, blu di xilidile), Zinco (colorimetrico senza deproteinizzazione).
- Metodi di immunochemiluminescenza, automatizzati su strumentazione Liaison XL, DiaSorin per PTH e 25-OH-vitamina D.
- Altri metodi per ALP ossea, CTX, P1NP (immunochemiluminescenza, strumento IDS-iSYS, Pantec); Ab antitransglutaminasi (immunochemiluminescenza, strumento Bioflash, Werfen), vitamina B6 (metodo HPLC).

Come diagnostica strumentale a completamento, sia i malati che i controlli, hanno eseguito una DEXA dei distretti femorale e lombare e radiografie delle sedi di frattura e del rachide dorso-lombare.

Analisi statistica:

Le variabili continue distribuite normalmente sono espresse come valori medi \pm deviazioni standard (SD). Le variabili non distribuite normalmente sono espresse come mediana e range interquartile. Per il confronto di variabili continue distribuite normalmente è stato impiegato il test ANOVA, per quelle continue non distribuite normalmente il test di Mann-Whitney. Per il confronto di variabili categoriche è stato usato il test del chi-quadro. Il coefficiente di correlazione di Pearson è stato adoperato per valutare il rapporto di correlazione tra le variabili continue. Il calcolo delle curve ROC (Receiver Operating Characteristic) e delle relative aree sotto la curva (AUC) è stato utilizzato per valutare il potere diagnostico dei rapporti tra marcatori. Il valore soglia ottimale per ciascun rapporto tra marcatori è stato determinato tramite il calcolo dell'indice di Youden. I risultati sono stati considerati significativi quando il valore della p era inferiore a 0.05. L'analisi statistica è stata condotta usando il software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

VII. RISULTATI

Caratteristiche dei pazienti:

In questa analisi retrospettiva sono stati sottoposti a screening 151 pazienti; di questi 60 sono stati esclusi per presenza di almeno un criterio di esclusione (Figura 1). Dei rimanenti 91 pazienti, 23 sono stati classificati come affetti da HPP, mentre 68 pazienti erano affetti da osteoporosi primitiva trattati con farmaci antiassorbitivi. Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella Tabella 1.

I pazienti con HPP erano più giovani (età $50,7 \pm 12,9$ anni) rispetto ai pazienti con osteoporosi primitiva (età $65,6 \pm 8,7$ anni) e con una percentuale più alta di uomini (28% vs 0%, $p < 0,001$). I pazienti con HPP avevano anche livelli più bassi di 25-OH-vitamina D (mediana 73,1 nmol/L, IQR 57,2–94,0 nmol/L vs mediana 88,8 nmol/L, IQR 74,5–102,5, $p = 0,011$).

A ulteriore conferma della diagnosi, nei pazienti con HPP è stata dosata la vitamina B6 e in tutti i pazienti sono stati riscontrati livelli sierici superiori al range di riferimento (15-73 nmol/L), con una mediana di 134 nmol/L (IQR 88-199). Nessun paziente classificato nel gruppo HPP ha riferito un precedente trattamento con bifosfonati o denosumab.

Al contrario, per escludere la diagnosi di HPP nel gruppo di controllo, sono stati retrospettivamente raccolti i livelli di ALP prima dell'avvio del trattamento antiassorbitivo, con riscontro di valori nel range di normalità (mediana 78 U/L, IQR 66-98).

Figura 1. Pazienti inizialmente sottoposti a screening, quelli esclusi e inclusi nello studio. BTM = marcatori di turnover osseo.

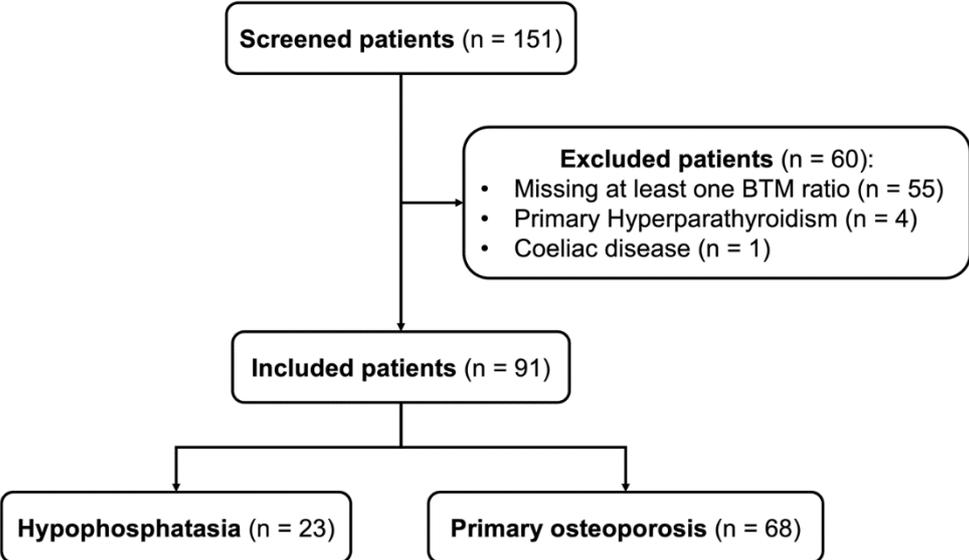


Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti

Caratteristiche	Ipofosfatasia (n = 23)	Controlli (n = 68)	p-Value
Generali			
Età (anni)	50.7 ± 12.9	65.6 ± 8.7	<0.001
Genere femminile (%)	16 (72)	68 (100)	<0.001
Altezza (cm)	162.7 ± 7.9	159.3 ± 5.9	0.319
Peso (Kg)	65.3 ± 16.6	58.1 ± 10.6	0.314
BMI (Kg/m ²)	24.5 ± 4.9	22.98 ± 4.63	0.517
Test di laboratorio			
Calcio (mg/dL)	9.4 (8.9–9.6)	9.3 (9.0–9.7)	0.993
Fosfato (mg/dL)	3.8 (2.9–4.4)	3.5 (3.1–3.8)	0.195
Creatinina (mg/dL)	0.83 (0.62–1.00)	0.90 (0.87–0.98)	0.081
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	95 (76–103)	93.9 (88.5–98.7)	0.958
25-OH-vitamina D (nmol/L)	73.1 (57.2–94.0)	88.8 (74.5–102.5)	0.011
PTH (assay di 2° generazione, pg/mL)	55.0 (43.0–67.0)	54.7 (41.5–66.0)	0.784
PTH (assay di 3° generazione, ng/L)	20.1 (15.0–26.0)	26.3 (14.9–34.5)	0.705
Calcio urinario (mg/24h)	180 (125–273)	171 (147–211)	0.750
Fosfato urinario (mg/24h)	561 (504–636)	610 (542–700)	0.757
Marcatori di rimodellamento osseo			
CTX (pg/mL)	231.9 (97.4–361.2)	33.0 (30.0–120.0)	<0.001
ALP (U/L)	27 (23–34)	40 (31–46)	<0.001
bALP (µg/L)	4.7 (3.1–6.8)	5.8 (3.9–7.1)	0.197
P1NP (µg/L)	55.2 (38.0–73.6)	16.4 (10.0–20.5)	<0.001
Rapporti tra i marcatori di rimodellamento osseo			
Rapporto ALP/P1NP	0.62 ± 0.46	2.86 ± 1.35	<0.001
Rapporto bALP/P1NP	0.11 ± 0.07	0.44 ± 0.28	<0.001
Rapporto ALP/CTx	0.19 ± 0.18	0.88 ± 0.54	<0.001
Rapporto bALP/CTx	0.04 ± 0.03	0.12 ± 0.08	<0.001

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard, mediana e intervallo interquartile o numero assoluto e percentuale, a seconda dei casi. BMI = indice di massa corporea, eGFR = tasso di filtrazione glomerulare stimato, PTH = ormone paratiroideo, CTx = telopeptide C-terminale del collagene di tipo I, ALP = fosfatasi alcalina, bALP = fosfatasi alcalina ossea, P1NP = propeptide N-terminale del procollagene di tipo 1.

Marcatori di rimodellamento osseo e rapporti fra essi:

I pazienti con HPP erano caratterizzati da livelli significativamente più bassi di ALP (mediana 27 U/L, IQR 23–34 U/L) rispetto al gruppo di controllo (mediana 40 U/L, IQR 31–46 U/L); questa differenza non era evidente per bALP ($p=0,197$). Al contrario, i pazienti con osteoporosi primitiva avevano livelli più bassi di CTX (mediana 231,9 pg/mL, IQR 97,4–361 pg/mL vs mediana 33,0 pg/mL, IQR 30,0–120,0 pg/mL, $p<0,001$) e P1NP (mediana 55,2 $\mu\text{g/L}$, IQR 38,0–73,6 $\mu\text{g/L}$ vs mediana 16,4 $\mu\text{g/L}$, IQR 10,0–20,5 $\mu\text{g/L}$, $p<0,001$), riflettendo la soppressione sia della neoformazione che del riassorbimento ossei dovuti al trattamento antirassorbitivo. Differenze statisticamente significative sono state riscontrate in tutti i rapporti dei marcatori di turnover osseo, che erano inferiori nei pazienti con HPP ($0,62\pm 0,46$ vs $2,86\pm 1,35$, $p<0,001$), nel rapporto bALP/P1NP ($0,11\pm 0,07$ vs $0,44 \pm 0,28$, $p<0,001$), rapporto ALP/CTX ($0,19\pm 0,18$ vs $0,88\pm 0,54$, $p<0,001$) e rapporto bALP/CTX ($0,04\pm 0,03$ vs $0,12\pm 0,08$, $p<0,001$).

Analisi delle curve ROC (Receiver-Operating Characteristics):

È stata quindi eseguita un'analisi ROC per valutare il potere predittivo di questi quattro rapporti nel distinguere i due gruppi. Come mostrato nella Figura 2 e nella Tabella 2, la performance di tutti i rapporti valutati è stata buona, con i seguenti valori di AUC, rapporto ALP/P1NP (AUC = 0,977, 95% CI: 0,946–1,000, $p < 0,001$), rapporto bALP/P1NP (AUC = 0,942, 95% CI: 0,895–0,989, $p < 0,001$), rapporto ALP/CTX (AUC = 0,910, 95% CI: 0,845–0,975, $p < 0,001$) e rapporto bALP/CTX (AUC = 0,871, IC 95%: 0,787–0,954, $p < 0,001$). I migliori cut-off per ciascun rapporto sono stati definiti tramite il calcolo dell'indice di Youden e sono riportati nella Tabella 2, così come i livelli di sensibilità, specificità, likelihood ratio positivo e negativo. Quindi è stato eseguito un confronto tra le AUC di tutte le curve ROC. Considerando il rapporto ALP/P1NP quello con la migliore performance diagnostica in base all'AUC, abbiamo valutato le differenze tra il rapporto ALP/P1NP e gli altri rapporti. Non abbiamo osservato differenze tra il rapporto ALP/P1NP e il rapporto bALP/P1NP (differenza tra le aree 0,039, IC 95%: -0,008–0,076, $p=0,115$) e il rapporto ALP/P1NP e il rapporto ALP/CTX (differenza tra le aree 0,064, IC 95%: -0,008–0,136, $p=0,083$), mentre è stata osservata una differenza tra il

rapporto ALP/P1NP e il rapporto bALP/CTX (differenza tra le aree 0,102, IC 95%: 0,011–0,193, $p=0,028$).

Inoltre, dato che l'età e il sesso differivano significativamente tra casi e controlli (si veda la Tabella 1), abbiamo valutato in che misura queste due variabili aggiungessero potere discriminatorio ai quattro biomarcatori (vale a dire: rapporto ALP/P1NP, rapporto bALP/P1NP, rapporto ALP/CTX, rapporto bALP/CTX) per discriminare i pazienti affetti da HPP dal gruppo di controllo. Abbiamo riscontrato che l'età e il sesso aumentavano marginalmente dell'1,5% e del 3,9% il potere discriminatorio del rapporto ALP/P1NP e del rapporto bALP/P1NP e del 6,0% e del 7,8% (vedere la Tabella 3 e la Figura 1) il potere discriminatorio del rapporto ALP/CTX e del rapporto bALP/CTX, indicando che queste due variabili possono contribuire ad affinare ulteriormente l'accuratezza diagnostica dei quattro biomarcatori per identificare i pazienti con ipofosfatasia.

Figura 2. Curva ROC dei rapporti ALP/P1NP, bALP/P1NP, ALP/CTX e bALP/CTX. ALP = fosfatasi alcalina, P1NP = propeptide N-terminale del procollagene di tipo 1, bALP = fosfatasi alcalina ossea, CTX = telopeptide C-terminale del collagene di tipo I.

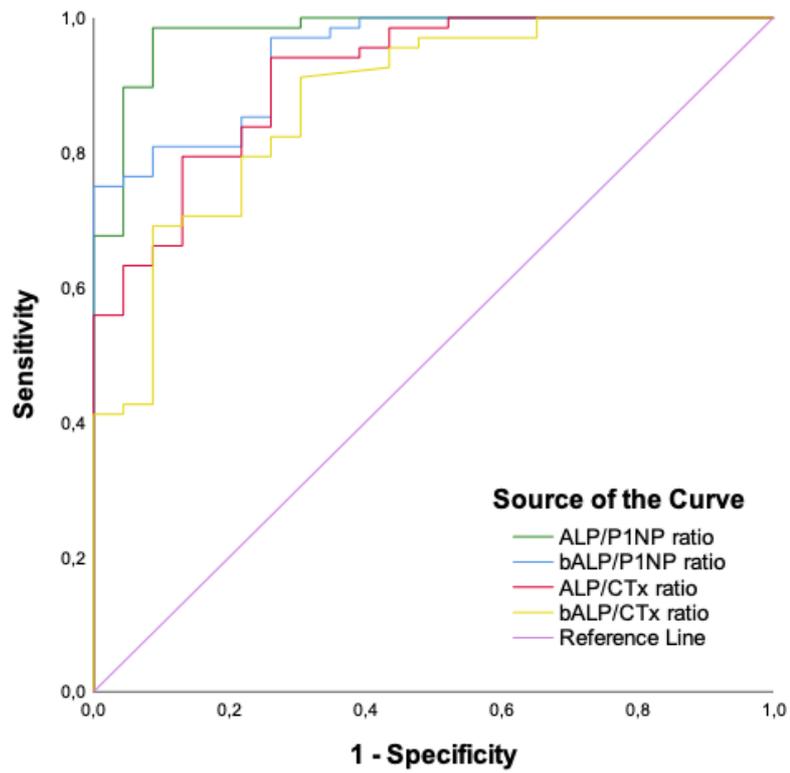


Figura 3. Curva ROC regolata in base alla covariata dei rapporti ALP/P1NP, bALP/P1NP, ALP/CTx e bALP/CTx.

ALP = fosfatasi alcalina, P1NP = propeptide N-terminale del procollagene di tipo 1, bALP = fosfatasi alcalina ossea, CTX = telopeptide C-terminale del collagene di tipo I.

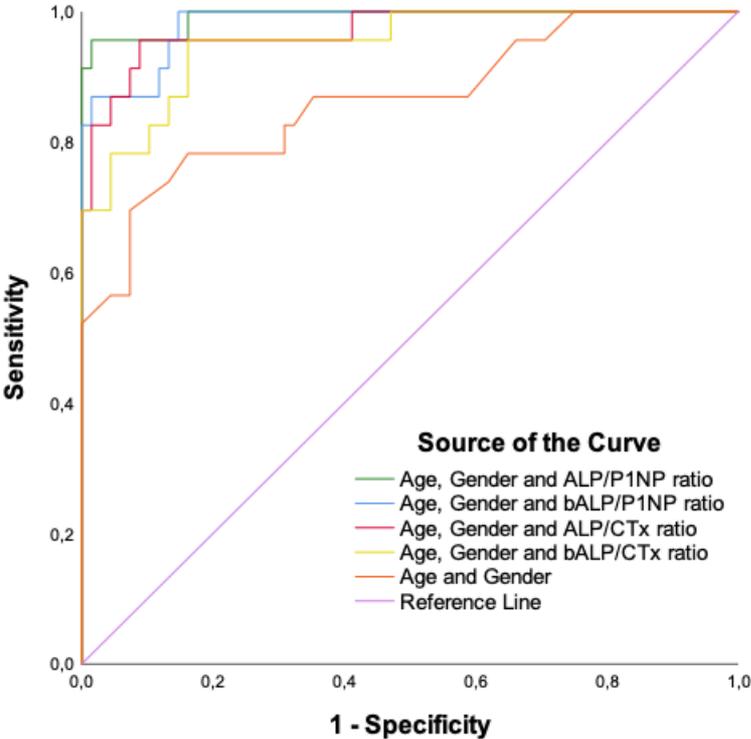


Tabella 2.

AUC (area sotto la curva)					
Variabili dei risultati del test	Area	Errore standard	Sig. asintotica	Intervallo di confidenza asintotico 95%	
				Inferiore	Superiore
Rapporto ALP/P1NP	0.977	0.016	<0.001	0.946	1.000
Rapporto bALP/P1NP	0.942	0.024	<0.001	0.895	0.989
Rapporto ALP/CTx	0.910	0.033	<0.001	0.845	0.975
Rapporto bALP/CTx	0.871	0.043	<0.001	0.787	0.954

Migliore cut-off						
Variabili dei risultati del test	Cut-off	Sensibilità (Veri positivi)	1 – Specificità (Falsi positivi)	Valore predittivo positivo	Valore predittivo negativo	Indice di Youden
Rapporto ALP/P1NP	1.114	0.985	0.091	10.8	0.016	0.894
Rapporto bALP/P1NP	0.254	0.750	0.001	750	0.250	0.750
Rapporto ALP/CTx	0.204	0.941	0.273	3.4	0.089	0.668
Rapporto bALP/CTx	0.071	0.691	0.091	7.6	0.340	0.600

Tabella 3

AUC (area sotto la curva)					
Variabili dei risultati dei test	Area	Errore standard	Sig. asintotica	Intervallo di confidenza asintotico 95%	
				Inferiore	Superiore
Età, sesso e rapporto ALP/P1NP	0.992	0.008	0.000	0.977	1.000
Età, sesso e rapporto bALP/P1NP	0.981	0.012	0.000	0.958	1.000
Età, sesso e rapporto ALP/CTX	0.970	0.020	0.000	0.931	1.000
Età, sesso e rapporto bALP/CTX	0.949	0.025	0.000	0.900	0.999

VIII. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'HPP è una rara malattia metabolica delle ossa, causata da mutazioni nel gene ALPL. A causa della sua bassa prevalenza e della presentazione clinica che può essere variabile e aspecifica, l'HPP, specialmente negli adulti, spesso non viene riconosciuta e di conseguenza può essere trattata impropriamente, talvolta con farmaci potenzialmente dannosi, come i bisfosfonati. Pertanto, diventa essenziale sviluppare strumenti diagnostici che ne facilitino l'identificazione, anche in contesti con risorse diagnostiche limitate. Attualmente la diagnosi di HPP si basa sulla presenza di manifestazioni cliniche e radiologiche compatibili, e su test di laboratorio, tra i quali l'ALP gioca un ruolo chiave, poiché i suoi livelli sono costantemente ridotti, rispetto ai range di riferimento correlati a sesso ed età. Tuttavia, non è possibile utilizzare i valori di ALP come unico indicatore, poiché valori bassi possono essere riscontrati in molteplici condizioni, tra cui la più comune – nel contesto delle patologie osteo-fragilizzanti – è l'osteoporosi primitiva trattata con farmaci antiriassorbitivi, che riducono sia il processo di neoformazione che quello di riassorbimento osseo, riducendo di conseguenza i livelli dei marcatori del turnover osseo (BTM). I valori plasmatici di PLP e PEA urinari possono supportare la diagnosi di HPP, ma il loro dosaggio non è facilmente disponibile in tutti i laboratori. La valutazione dei BTM viene invece eseguita di routine nei laboratori che si occupano di malattie metaboliche ossee, ad esempio, per il follow-up dei pazienti o per valutare la compliance al trattamento antiriassorbitivo, ed è relativamente meno costosa rispetto al dosaggio di PLP e PEA. Questo studio nasce dall'osservazione che nei pazienti con HPP, mentre l'attività dell'ALP è compromessa, lo stesso non accade per gli altri BTM, i cui livelli sono superiori a quelli attesi nei pazienti con una soppressione farmacologica del rimodellamento osseo. Nei pazienti con osteoporosi primitiva trattati con farmaci antiriassorbitivi infatti vi è una riduzione del rimodellamento osseo che interessa sia la fase anabolica che quella catabolica, quindi tutti i BTM dovrebbero ridursi in modo consensuale. Il calcolo dei rapporti tra marcatori di formazione ossea e marcatori di riassorbimento osseo, o tra diversi marcatori di formazione, permette di evidenziare questo diverso andamento nelle due condizioni. Come abbiamo

osservato, c'è una differenza in tutti i BTM, eccetto bALP, tra pazienti con HPP e pazienti con osteoporosi primitiva trattati con farmaci antiriassorbitivi. Inoltre, vi è una differenza significativa in tutti i rapporti BTM tra i due gruppi. Nell'analisi della curva ROC, tutti i rapporti BTM avevano una performance diagnostica perlomeno buona, con un'influenza solo marginale data da età e sesso. In particolare, non sono state osservate differenze nelle AUC del rapporto ALP/P1NP, del rapporto bALP/P1NP e del rapporto ALP/CTX, suggerendo così la possibilità di utilizzare questi tre rapporti in modo intercambiabile come strumento diagnostico in pazienti con bassa attività ALP. Ci sono alcune limitazioni di questo studio. Innanzitutto, il disegno è retrospettivo, il che potrebbe aver aumentato il rischio di bias di selezione. Anche a causa della natura retrospettiva di questo studio, non siamo stati in grado di eseguire test genetici in tutti i pazienti della nostra coorte HPP, ma in alcuni pazienti la diagnosi è stata stabilita solo sulla base di dati clinici, radiologici e biochimici. In secondo luogo, come evidenziato in precedenza, abbiamo osservato una differenza di età e sesso tra i due gruppi, quindi abbiamo dovuto confermare i risultati dell'analisi della curva ROC mediante aggiustamento per queste covariate. In terzo luogo, a causa del numero limitato di pazienti, non è stato possibile valutare i rapporti BTM in altre condizioni caratterizzate da bassa attività di ALP; pertanto, possiamo solo ipotizzare che in altre condizioni di basso turnover osseo non farmacologicamente indotto, si osservi un andamento dei BTM (e dei loro rapporti) simile a quello dei pazienti con osteoporosi primitiva trattati con farmaci antiriassorbitivi.

In conclusione, i risultati di questo studio evidenziano il possibile ruolo che la valutazione dei BTM, insieme alle caratteristiche cliniche e radiologiche, possa svolgere nella fase iniziale del processo diagnostico HPP, portando auspicabilmente a un miglioramento del ritardo diagnostico, riducendo il rischio di diagnosi errate e potenziale danno derivante dal trattamento con bifosfonati in questi pazienti.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connect Tissue Res.* 1996;35(1–4):131–6.
2. Moriishi T, Ozasa R, Ishimoto T, Nakano T, Hasegawa T, Miyazaki T, et al. Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. *PLoS Genet.* maggio 2020;16(5):e1008586.
3. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem.* luglio 1994;55(3):273–86.
4. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, et al. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol.* gennaio 2009;174(1):239–47.
5. Zelzer E, McLean W, Ng YS, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, et al. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Dev Camb Engl.* aprile 2002;129(8):1893–904.
6. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest.* giugno 2007;117(6):1616–26.
7. Wan C, Gilbert SR, Wang Y, Cao X, Shen X, Ramaswamy G, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 gennaio 2008;105(2):686–91.
8. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 11 gennaio 2002;108(1):17–29.

9. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med*. 11 settembre 2011;17(10):1235–41.
10. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, et al. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem*. 14 settembre 2007;282(37):27285–97.
11. Dickinson DA, Forman HJ. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci*. novembre 2002;973:488–504.
12. Weinstein RS, Wan C, Liu Q, Wang Y, Almeida M, O'Brien CA, et al. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice. *Aging Cell*. aprile 2010;9(2):147–61.
13. McKee MD, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech*. 1 febbraio 1996;33(2):141–64.
14. Whyte MP. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia: Hypophosphatasia and alkaline phosphatase. *Ann N Y Acad Sci*. aprile 2010;1192(1):190–200.
15. Zhu T, Gan YH, Liu H. Functional evaluation of mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. *Chin J Dent Res Off J Sci Sect Chin Stomatol Assoc CSA*. 2012;15(2):99–104.
16. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med*. luglio 2009;15(7):757–65.
17. Wu X, Pang L, Lei W, Lu W, Li J, Li Z, et al. Inhibition of Sca-1-positive skeletal stem cell recruitment by alendronate blunts the anabolic effects of parathyroid hormone on bone remodeling. *Cell Stem Cell*. 5 novembre 2010;7(5):571–80.

18. Manolagas SC, Parfitt AM. What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab*. giugno 2010;21(6):369–74.
19. Bilezikian JP, Khan A, Potts JT, Brandi ML, Clarke BL, Shoback D, et al. Hypoparathyroidism in the adult: epidemiology, diagnosis, pathophysiology, target-organ involvement, treatment, and challenges for future research. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. ottobre 2011;26(10):2317–37.
20. Maranda B, Chabot G, Décarie JC, Pata M, Azeddine B, Moreau A, et al. Clinical and cellular manifestations of OSTM1-related infantile osteopetrosis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. febbraio 2008;23(2):296–300.
21. Feigin ME, Malbon CC. OSTM1 regulates beta-catenin/Lef1 interaction and is required for Wnt/beta-catenin signaling. *Cell Signal*. maggio 2008;20(5):949–57.
22. Sobacchi C, Frattini A, Guerrini MM, Abinun M, Pangrazio A, Susani L, et al. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nat Genet*. agosto 2007;39(8):960–2.
23. 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*. 16 maggio 2002;346(20):1513–21.
24. Henriksen K, Gram J, Høegh-Andersen P, Jemtland R, Ueland T, Dziegiel MH, et al. Osteoclasts from patients with autosomal dominant osteopetrosis type I caused by a T253I mutation in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 are normal in vitro, but have decreased resorption capacity in vivo. *Am J Pathol*. novembre 2005;167(5):1341–8.
25. 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. *Am J Hum Genet*. marzo 2001;68(3):577–89.

26. Loots GG, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, et al. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res.* luglio 2005;15(7):928–35.
27. Paddock C, Youngs T, Eriksen E, Boyce R. Validation of wall thickness estimates obtained with polarized light microscopy using multiple fluorochrome labels: correlation with erosion depth estimates obtained by lamellar counting. *Bone.* marzo 1995;16(3):381–3.
28. Dempster DW. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* aprile 1989;4(2):137–41.
29. Dobnig H, Turner RT. The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology.* novembre 1997;138(11):4607–12.
30. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell.* 7 settembre 2007;130(5):811–23.
31. Martin-Millan M, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Zhao H, Weinstein RS, et al. The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Mol Endocrinol Baltim Md.* febbraio 2010;24(2):323–34.
32. Taxel P, Kaneko H, Lee SK, Aguila HL, Raisz LG, Lorenzo JA. Estradiol rapidly inhibits osteoclastogenesis and RANKL expression in bone marrow cultures in postmenopausal women: a pilot study. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* febbraio 2008;19(2):193–9.
33. Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, et al. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med.* 10 luglio 1997;337(2):91–5.

34. Chen L, Li C, Qiao W, Xu X, Deng C. A Ser(365)-->Cys mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in mouse downregulates Ihh/PTHrP signals and causes severe achondroplasia. *Hum Mol Genet.* 1 marzo 2001;10(5):457–65.
35. Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev.* dicembre 2002;23(6):787–823.
36. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest.* 15 luglio 1998;102(2):274–82.
37. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop.* aprile 1995;(313):36–46.
38. Evans DM, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* marzo 1996;11(3):300–5.
39. Garcia C, Boyce BF, Gilles J, Dallas M, Qiao M, Mundy GR, et al. Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* novembre 1996;11(11):1619–27.
40. Liu W, Qi M, Konermann A, Zhang L, Jin F, Jin Y. The p53/miR-17/Smurf1 pathway mediates skeletal deformities in an age-related model via inhibiting the function of mesenchymal stem cells. *Aging.* marzo 2015;7(3):205–18.
41. Trajanoska K, Morris JA, Oei L, Zheng HF, Evans DM, Kiel DP, et al. Assessment of the genetic and clinical determinants of fracture risk: genome wide association and mendelian randomisation study. *BMJ.* 29 agosto 2018;362:k3225.
42. Leslie WD, Majumdar SR, Morin SN, Lix LM. Change in Bone Mineral Density Is an Indicator of Treatment-Related Antifracture Effect in Routine Clinical Practice: A Registry-Based Cohort Study. *Ann Intern Med.* 4 ottobre 2016;165(7):465.

43. Lorentzon M, Branco J, Brandi ML, Bruyère O, Chapurlat R, Cooper C, et al. Algorithm for the Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in the Diagnosis, Assessment and Follow-Up of Treatment for Osteoporosis. *Adv Ther.* ottobre 2019;36(10):2811–24.
44. Collins MT, Marcucci G, Anders HJ, Beltrami G, Cauley JA, Ebeling PR, et al. Skeletal and extraskeletal disorders of biomineralization. *Nat Rev Endocrinol.* agosto 2022;18(8):473–89.
45. Bhadada SK, Rao SD. Role of Phosphate in Biomineralization. *Calcif Tissue Int.* gennaio 2021;108(1):32–40.
46. Jannin A, Kerlan V, Desailoud R. Endocrinology of bone mineralization: An update. *Ann Endocrinol.* febbraio 2022;83(1):46–53.
47. Gagnon C, Schafer AL. Bone Health After Bariatric Surgery: BONE HEALTH AFTER BARIATRIC SURGERY. *JBMR Plus.* maggio 2018;2(3):121–33.
48. Allan PJ, Lal S. Metabolic bone diseases in intestinal failure. *J Hum Nutr Diet.* giugno 2020;33(3):423–30.
49. Collins MT, Chebli C, Jones J, Kushner H, Consugar M, Rinaldo P, et al. Renal Phosphate Wasting in Fibrous Dysplasia of Bone Is Part of a Generalized Renal Tubular Dysfunction Similar to That Seen in Tumor-Induced Osteomalacia. *J Bone Miner Res.* 1 maggio 2001;16(5):806–13.
50. Arboleya L, Braña I, Pardo E, Loredó M, Queiro R. Osteomalacia in Adults: A Practical Insight for Clinicians. *J Clin Med.* 5 aprile 2023;12(7):2714.
51. Fukumoto S, Ozono K, Michigami T, Minagawa M, Okazaki R, Sugimoto T, et al. Pathogenesis and diagnostic criteria for rickets and osteomalacia—proposal by an expert panel supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, the Japanese Society for Bone and Mineral Research, and the Japan Endocrine Society. *J Bone Miner Metab.* settembre 2015;33(5):467–73.

52. Bhan A, Rao AD, Rao DS. Osteomalacia as a Result of Vitamin D Deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am.* giugno 2010;39(2):321–31.
53. Uday S, Högl W. Spot the silent sufferers: A call for clinical diagnostic criteria for solar and nutritional osteomalacia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* aprile 2019;188:141–6.
54. Linglart A, Bioso-Duplan M. Hypophosphatasia. *Curr Osteoporos Rep.* giugno 2016;14(3):95–105.
55. Rathbun JC. Hypophosphatasia; a new developmental anomaly. *Am J Dis Child* 1911. giugno 1948;75(6):822–31.
56. Mumm S, Jones J, Finnegan P, Whyte MP. Historical Vignette: Hypophosphatasia: Molecular Diagnosis of Rathbun's Original Case. *J Bone Miner Res.* 1 settembre 2001;16(9):1724–7.
57. Fallon MD, Teitelbaum SL, Weinstein RS, Goldfischer S, Brown DM, Whyte MP. Hypophosphatasia: clinicopathologic comparison of the infantile, childhood, and adult forms. *Medicine (Baltimore).* gennaio 1984;63(1):12–24.
58. Hofmann C, Girschick H, Mornet E, Schneider D, Jakob F, Mentrup B. Unexpected high intrafamilial phenotypic variability observed in hypophosphatasia. *Eur J Hum Genet EJHG.* ottobre 2014;22(10):1160–4.
59. Burnstock G, Krügel U, Abbracchio MP, Illes P. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol.* ottobre 2011;95(2):229–74.
60. Hofmann C, Girschick HJ, Mentrup B, Graser S, Seefried L, Liese J, et al. Clinical Aspects of Hypophosphatasia: An Update. *Clin Rev Bone Miner Metab.* giugno 2013;11(2):60–70.
61. Jandl NM, Schmidt T, Rolvien T, Stürznickel J, Chrysostomou K, von Vopelius E, et al. Genotype-Phenotype Associations in 72 Adults with Suspected ALPL-Associated Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int.* marzo 2021;108(3):288–301.

62. Whyte MP. Hypophosphatasia: An overview For 2017. *Bone*. settembre 2017;102:15–25.
63. Whyte MP. Hypophosphatasia - aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. aprile 2016;12(4):233–46.
64. Villa-Suárez JM, García-Fontana C, Andújar-Vera F, González-Salvatierra S, de Haro-Muñoz T, Contreras-Bolívar V, et al. Hypophosphatasia: A Unique Disorder of Bone Mineralization. *Int J Mol Sci*. 21 aprile 2021;22(9):4303.
65. Mornet E, Beck C, Bloch-Zupan A, Girschick H, Le Merrer M. Clinical utility gene card for: hypophosphatasia. *Eur J Hum Genet EJHG*. marzo 2011;19(3).
66. Michałus I, Gawlik A, Wieczorek-Szukała K, Lewiński A. The Clinical Picture of Patients Suffering from Hypophosphatasia-A Rare Metabolic Disease of Many Faces. *Diagn Basel Switz*. 30 marzo 2022;12(4):865.
67. Mornet E, Yvard A, Taillandier A, Fauvert D, Simon-Bouy B. A molecular-based estimation of the prevalence of hypophosphatasia in the European population. *Ann Hum Genet*. maggio 2011;75(3):439–45.
68. Desborough R, Nicklin P, Gossiel F, Balasubramanian M, Walsh JS, Petryk A, et al. Clinical and biochemical characteristics of adults with hypophosphatasia attending a metabolic bone clinic. *Bone*. marzo 2021;144:115795.
69. Berkseth KE, Tebben PJ, Drake MT, Hefferan TE, Jewison DE, Wermers RA. Clinical spectrum of hypophosphatasia diagnosed in adults. *Bone*. maggio 2013;54(1):21–7.
70. Schmidt T, Mussawy H, Rolvien T, Hawellek T, Hubert J, Rütther W, et al. Clinical, radiographic and biochemical characteristics of adult hypophosphatasia. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. settembre 2017;28(9):2653–62.
71. Maman E, Briot K, Roux C. Atypical femoral fracture in a 51-year-old woman: Revealing a hypophosphatasia. *Joint Bone Spine*. maggio 2016;83(3):346–8.

72. Shane E, Burr D, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD, Cheung AM, et al. Atypical Subtrochanteric and Diaphyseal Femoral Fractures: Second Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research: AFF TASK FORCE REPORT. *J Bone Miner Res.* gennaio 2014;29(1):1–23.
73. Genest F, Claußen L, Rak D, Seefried L. Bone mineral density and fracture risk in adult patients with hypophosphatasia. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* febbraio 2021;32(2):377–85.
74. Lefever E, Witters P, Gielen E, Vanclooster A, Meersseman W, Morava E, et al. Hypophosphatasia in Adults: Clinical Spectrum and Its Association With Genetics and Metabolic Substrates. *J Clin Densitom.* luglio 2020;23(3):340–8.
75. Bianchi ML. Hypophosphatasia: an overview of the disease and its treatment. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* dicembre 2015;26(12):2743–57.
76. Simon S, Resch H, Klaushofer K, Roschger P, Zwerina J, Kocijan R. Hypophosphatasia: From Diagnosis to Treatment. *Curr Rheumatol Rep.* 10 settembre 2018;20(11):69.
77. On behalf of the Rare Bone Disease Action Group of the European Calcified Tissue Society, Bianchi ML, Bishop NJ, Guañabens N, Hofmann C, Jakob F, et al. Hypophosphatasia in adolescents and adults: overview of diagnosis and treatment. *Osteoporos Int.* agosto 2020;31(8):1445–60.
78. Whyte MP. Enzyme Defects and the Skeleton. In: Rosen CJ, curatore. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* [Internet]. Ames, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013 [citato 11 giugno 2023]. p. 838–42. Disponibile su: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118453926.ch101>
79. Eastell R, Szulc P. Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* novembre 2017;5(11):908–23.

80. Nizet A, Cavalier E, Stenvinkel P, Haarhaus M, Magnusson P. Bone alkaline phosphatase: An important biomarker in chronic kidney disease - mineral and bone disorder. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* febbraio 2020;501:198–206.
81. Ng E, Ashkar C, Seeman E, Schneider HG, Nguyen H, Ebeling PR, et al. A low serum alkaline phosphatase may signal hypophosphatasia in osteoporosis clinic patients. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* febbraio 2023;34(2):327–37.
82. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene.* 5 settembre 2020;754:144855.
83. Millán JL, Narisawa S, Lemire I, Loisel TP, Boileau G, Leonard P, et al. Enzyme Replacement Therapy for Murine Hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 17 dicembre 2007;23(6):777–87.
84. Whyte MP. Hypophosphatasia and the Role of Alkaline Phosphatase in Skeletal Mineralization*. *Endocr Rev.* agosto 1994;15(4):439–61.
85. Shajani-Yi Z, Ayala-Lopez N, Black M, Dahir KM. Urine phosphoethanolamine is a specific biomarker for hypophosphatasia in adults. *Bone.* ottobre 2022;163:116504.
86. Licata AA, Radfar N, Bartter FC, Bou E. The urinary excretion of phosphoethanolamine in diseases other than hypophosphatasia. *Am J Med.* gennaio 1978;64(1):133–8.
87. Sadhukhan S, Mehta P, Rajender S, Gupta SK, Chattopadhyay N. Proposing a clinical algorithm for better diagnosis of hypophosphatasia in resource-limiting situations. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* dicembre 2022;33(12):2479–93.
88. Khan AA, Josse R, Kannu P, Villeneuve J, Paul T, Van Uum S, et al. Hypophosphatasia: Canadian update on diagnosis and management. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* settembre 2019;30(9):1713–22.

89. Mornet E, Taillandier A, Domingues C, Dufour A, Benaloun E, Lavaud N, et al. Hypophosphatasia: a genetic-based nosology and new insights in genotype-phenotype correlation. *Eur J Hum Genet EJHG*. febbraio 2021;29(2):289–99.
90. Kishnani PS, Rockman-Greenberg C, Rauch F, Bhatti MT, Moseley S, Denker AE, et al. Five-year efficacy and safety of asfotase alfa therapy for adults and adolescents with hypophosphatasia. *Bone*. aprile 2019;121:149–62.
91. Whyte MP, Greenberg CR, Salman NJ, Bober MB, McAlister WH, Wenkert D, et al. Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia. *N Engl J Med*. 8 marzo 2012;366(10):904–13.
92. Whyte MP, Simmons JH, Moseley S, Fujita KP, Bishop N, Salman NJ, et al. Asfotase alfa for infants and young children with hypophosphatasia: 7 year outcomes of a single-arm, open-label, phase 2 extension trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. febbraio 2019;7(2):93–105.
93. Righetti M, Wach J, Desmarchelier R, Coury F. Teriparatide treatment in an adult patient with hypophosphatasia exposed to bisphosphonate and revealed by bilateral atypical fractures. *Joint Bone Spine*. maggio 2018;85(3):365–7.
94. Girschick HJ, Seyberth HW, Huppertz HI. Treatment of childhood hypophosphatasia with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Bone*. novembre 1999;25(5):603–7.
95. Girschick HJ, Schneider P, Haubitz I, Hiort O, Collmann H, Beer M, et al. Effective NSAID treatment indicates that hyperprostaglandinism is affecting the clinical severity of childhood hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis*. 28 giugno 2006;1:24.
96. Beck C, Morbach H, Richl P, Stenzel M, Girschick HJ. How can calcium pyrophosphate crystals induce inflammation in hypophosphatasia or chronic inflammatory joint diseases? *Rheumatol Int*. gennaio 2009;29(3):229–38.
97. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garner P, Griesmacher A, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards.

Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA. febbraio 2011;22(2):391–420.

98. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*. 3 maggio 2007;356(18):1809–22.
99. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 20 agosto 2009;361(8):756–65.
100. Piscitelli P, Neglia C, Feola M, Rizzo E, Argentiero A, Ascolese M, et al. Updated incidence and costs of hip fractures in elderly Italian population. *Aging Clin Exp Res*. dicembre 2020;32(12):2587–93.
101. Degli Esposti L, Girardi A, Saragoni S, Sella S, Andretta M, Rossini M, et al. Use of antiosteoporotic drugs and calcium/vitamin D in patients with fragility fractures: impact on re-fracture and mortality risk. *Endocrine*. maggio 2019;64(2):367–77.