



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

**L'USO DELLA DENSITOMETRIA OSSEA NEI BAMBINI
CON MALATTIE RARE COMPLESSE: NUOVE
PROSPETTIVE**

Relatore

Chiar.mo Prof. Carlo Catassi

Tesi di Laurea di:

Silvia Bellagamba

Correlatore

Chiar.ma Dott.ssa Lucia Santoro

A.A. 2019/2020

INDICE

ACRONIMI	5
RIASSUNTO	6
1 INTRODUZIONE	9
1.1 Metabolismo dell'osso	10
1.1.1 La struttura microbiologica dell'osso	10
1.1.2 Meccanismi della mineralizzazione ossea	13
1.2 La mineralometria ossea in pediatria	15
1.2.1 Metodiche di valutazione della mineralizzazione ossea	15
1.2.2 Modalità di esecuzione e parametri considerati	16
1.2.3 Indicazioni all'esecuzione della MOC-DXA	17
1.2.4 Procedura pratica per l'esecuzione della MOC-DXA	19
1.2.5 Interpretazione dei risultati	20
1.3 Studio biochimico del metabolismo calcio-fosforo	23
1.3.1 Funzioni della vitamina D	24
1.3.2 Effetti della vitamina D sul metabolismo dell'osso	25
1.3.3 Correlazione tra vitamina D, PTH, calcitonina e metabolismo Ca^{2+}P	26
1.3.4 Monitoraggio dei livelli di vitamina D	28
1.3.5 Modalità di somministrazione di vitamina D e calcio	30
1.4 L'osteoporosi e l'osteopenia in età pediatrica	31
1.4.1 Gestione terapeutica del bambino osteoporotico	34
2 OBIETTIVO DELLO STUDIO	35
3 MATERIALI E METODI	36
2.1 Criteri di inclusione nello studio	36
2.2 Disegno dello studio	37
2.3 Paziente 1: Neurofibromatosi 1	38
2.3.1 Descrizione generale della patologia	38
2.3.2 Metabolismo osseo e NF1	39
2.3.3 Storia clinica e follow up del paziente 1	41
2.4 Pazienti 2 e 3: Sindrome di Ehlers-Danlos ipermobile	41
2.4.1 Descrizione generale della sindrome di Ehlers-Danlos ipermobile	42
2.4.2 Metabolismo osseo e sindrome di Ehlers-Danlos ipermobile	44
2.4.3 Storia clinica e follow up del paziente 2	45
2.4.4 Storia clinica e follow up del paziente 3	46
2.5 Paziente 4: Sindrome di Ehlers-Danlos cifoscoliotica	47

2.5.1	Descrizione generale della patologia	47
2.5.2	Metabolismo osseo e sindrome di Ehlers-Danlos cifoscoliotica	48
2.5.3	Storia clinica e follow up del paziente 4.....	49
2.5	Paziente 5: Sindrome di Ehlers-Danlos spondilodisplastica	50
2.5.1	Descrizione generale della patologia	50
2.5.2	Metabolismo osseo e sindrome di Ehlers-Danlos spondilodisplastica	51
2.5.3	Storia clinica e follow up del paziente 5.....	52
2.6	Paziente 6: Sindrome di Di George.....	53
2.6.1	Descrizione generale della patologia	53
2.6.2	Metabolismo osseo e sindrome di Di George	54
2.6.3	Storia clinica e follow up del paziente 6.....	57
2.7	Paziente 7: Mucopolisaccaridosi IIIb	58
2.7.1	Descrizione generale della patologia	58
2.7.2	Metabolismo osseo e Mucopolisaccaridosi IIIb	60
2.7.3	Storia clinica e follow up del paziente 7.....	61
2.8	Paziente 8: Acondroplasia	62
2.8.1	Descrizione generale della patologia	62
2.8.2	Metabolismo osseo e Acondroplasia	63
2.8.3	Storia clinica e follow up del paziente 8.....	64
2.9	Paziente 9: Pseudoipoparatiroidismo di tipo I	65
2.9.1	Descrizione generale della patologia	65
2.9.2	Metabolismo osseo e Pseudoipoparatiroidismo di tipo I	66
2.9.3	Storia clinica e follow up del paziente 9.....	68
2.10	Paziente 10: Deficit di Acil-CoA Deidrogenasi a catena corta	69
2.10.1	Descrizione generale della patologia	69
2.10.2	Metabolismo osseo e Malattia da deficit di Acetil-CoA Deidrogenasi a catena corta..	71
2.10.3	Storia clinica e follow up del paziente 10.....	71
2.11	Pazienti 11 e 12: Malattia di Gaucher	72
2.11.1	Descrizione generale della patologia	72
2.11.2	Metabolismo osseo e Malattia di Gaucher	75
2.11.3	Storia clinica e follow up della paziente 11.....	77
2.11.4	Storia clinica e follow up del paziente 12.....	78
2.12	Analisi statistica	79
3	RISULTATI	81
4	DISCUSSIONE	88
4.1	PTH e MOC-DXA	90

4.2 Vitamina D e MOC-DXA.....	91
4.3 Fosfatasi alcalina e MOC-DXA	93
4.4 Livelli ematici di Ca^{2+} e P e MOC-DXA.....	95
5 CONCLUSIONI	97
6 BIBLIOGRAFIA.....	99
RINGRAZIAMENTI	110

ACRONIMI

AD-SoS – Amplitude-Dependent Speed of Sound

ALP- Fosfatasi Alcalina

BMC – Bone Mineral Content

BMD – Bone Mineral Density

BTT – Bone Transmission Time

BUA – Broadband Ultrasound Attenuation

DPA – Dual-Photon Absorptiometry

DXA – Dual-energy X-ray Absorptiometry

ISCD – International Society for Clinical Densitometry

MOC – Mineralometria Ossea Computerizzata

PA – Posterior-Anterior

pQCT – peripheral Quantitative Computed Tomography

PTH – Paratormone

QCT – Quantitative Computed Tomography

QUS – Quantitative Ultrasound

SoS – Speed of Sound

SPA – Single-Photon Absorptiometry

TBLH – Total Body Less Head

vBMD – volumetric BMD

RIASSUNTO

Introduzione

Le alterazioni del metabolismo osseo sono condizioni patologiche caratterizzate dalla modificazione della deposizione della componente minerale ossea. Possono essere distinte in alterazioni qualitative del processo di mineralizzazione (ad esempio il morbo di Paget che si configura con un quadro di disorganizzazione strutturale) e quantitative (diminuzione della densità ossea). L'osteoporosi, che fa parte di questo secondo gruppo, si caratterizza come una patologia costituita da un deterioramento della microarchitettura del tessuto scheletrico che induce fragilità ossea e un aumentato rischio di fratture, malformazioni e dolore. In particolare il quadro si può descrivere sulla base di criteri radiologici stabiliti dall'OMS nel 1994: l'osteoporosi è definita, nell'adulto, come un valore di BMD (densità minerale ossea) al di sotto delle 2,5 deviazioni standard, mentre l'osteopenia, condizione meno grave e antecedente, è delineata da BMD compreso tra -2,5 e -1. Il metodo di misura considera quindi la variazione del valore della densità rispetto alla media della popolazione e questo è molto efficace nella popolazione adulta, ma di meno in quella pediatrica, in cui queste definizioni risultano essere diverse. Nei bambini infatti si definiscono osteoporosi, la presenza di BMD Z-score ≤ -2 (il riferimento è dato in questo caso da soggetti di pari sesso, età ed etnia) e osteopenia un valore di BMD Z-score compreso tra -2 e -1 (anche se come vedremo nel corso della trattazione sono presenti molte controversie in letteratura per ciò che riguarda la validità del concetto di osteopenia in età pediatrica). Nella popolazione pediatrica per via del continuo accrescimento osseo, è stato difficile individuare dei parametri strutturati per la definizione di deficit minerale, ma questo è risultato fondamentale per la trattazione di una condizione patologica che peggiora nel tempo fino ad arrivare a quadri gravi nell'adulto, necessitando quindi di identificazione e attuazione di una terapia precoci.

L'osteoporosi in età pediatrica, si riscontra in diverse patologie genetiche, sindromi malformative ed errori congeniti del metabolismo. Talvolta in questi pazienti con coinvolgimento di tipo multisistemico l'interessamento osseo rischia di essere sottovalutato rispetto alla compromissione neurologica, cardiologica o di altri distretti. La mancata diagnosi di una condizione di osteopenia o osteoporosi potrebbe incidere negativamente sulla qualità della vita di questi bambini; l'interessamento osseo potrebbe aggravarsi nel tempo comportando crisi dolorose o esitando in fratture in soggetti spesso già compromessi dal punto di vista motorio. La mineralometria ossea con metodica DXA, nonostante tutte le limitazioni legate a una sua esecuzione in un individuo in formazione, è oggi definita come una metodica sicura, efficace e ben codificata per la valutazione della densità minerale

ossea (BMD) del distretto scheletrico in bambini con malattie metaboliche a rischio di osteoporosi, in follow up per una terapia che determina riassorbimento osseo o con fratture multiple per le quali non si riesce a risalire ad una causa nota, ad esempio traumatica, metabolica o iatrogena.

Materiali e metodi

In questo studio sono stati presi in esame 12 pazienti, di cui 3 femmine e 9 maschi di età compresa tra 6 e 17 anni, affetti da sindromi malformative o malattie metaboliche congenite, afferiti presso l'ambulatorio di Clinica Pediatrica ad indirizzo genetico-metabolico nel presidio ospedaliero "G. Salesi" dell'AOU Ospedali Riuniti di Ancona tra novembre 2017 e gennaio 2020.

Nello studio sono stati presi in considerazione solo alcuni pazienti, arruolati per la specificità del quadro o per il riscontro densitometrico. In particolare: 4 pazienti con Sindrome di Ehlers-Danlos (2 di tipo ipermobile, 1 cifoscoliotico e 1 spondilodisplastico), 1 paziente con Sindrome di Di George, 1 paziente con Acondroplasia, 1 con Pseudoipoparatiroidismo tipo I, 1 paziente con Mucopolisaccaridosi, 1 con Deficit di ossidazione mitocondriale di acidi grassi (deficit di acetil-CoA deidrogenasi a catena corta) e 2 affetti da Malattia di Gaucher. Dei suddetti pazienti sono state raccolte le storie cliniche, i dati laboratoristici degli esami relativi al Ca^{2+} totale sierico, fosfemia, paratormone, 25-idrossivitamina D2+D3 e fosfatasi alcalina e i risultati della MOC-DXA definiti come BMD Z-score lombare, total body e total body senza testa. Successivamente si è studiata la correlazione tra i dati biochimici (determinanti del metabolismo fosfo-calcico) e i valori di BMD Z-score applicando il test statistico di Spearman (variante del test di Pearson non parametrico per piccoli campioni), ponendo come livello di significatività $\alpha < 0,05$.

Risultati

Il 25% dei referti MOC-DXA analizzati hanno riportato valori di Z-score ≤ -2 e quindi indicativi della presenza di osteoporosi. Sono state riportate associazioni statisticamente significative direttamente proporzionali tra i valori della fosforemia e il BMD Z-score misurati in tutti i distretti corporei. La variazione del livello di PTH (paratormone) è risultata non significativa ma inversamente proporzionale ai valori di BMD Z-score. Tra 25-idrossivitamina D2+D3 e BMD Z-score invece è stata riportata una relazione direttamente proporzionale ma non significativa. In ultimo, non è stata riscontrata alcuna associazione significativa tra i valori della calcemia e della fosfatasi alcalina e i risultati della MOC-DXA.

Discussione

In definitiva le MOC-DXA che sono risultate alterate con valori di Z-score ≤ -2 (diagnosi di osteoporosi) riguardano il 25% dei pazienti studiati, quindi una minoranza dei casi che presentavano l'indicazione all'esecuzione dell'esame. È stata riportata una relazione diretta tra i valori della fosforemia e uno stato di densità minerale ossea adeguata, ribadendo l'utilità di questo marker come indice di predittività di un eventuale danno a livello osseo. Non siamo riusciti a dimostrare la significatività delle altre relazioni, ma questo potrebbe essere dovuto al numero di pazienti inclusi nello studio; ciò non nega la validità degli altri esami biochimici, che sono quotidianamente utilizzati nella pratica clinica.

Conclusioni

Lo studio della mineralizzazione ossea nella popolazione pediatrica è un argomento di recente interesse e da un'analisi attenta della letteratura risulta come vi siano nozioni in continuo aggiornamento riguardo al monitoraggio della salute ossea nelle specifiche patologie metaboliche congenite, tra le quali quelle inserite in questo studio. Partendo da tali premesse, si è cercato di approfondire i meccanismi che causano la perdita del tono calcico nell'ambito di malattie genetiche rare pediatriche (spesso caratterizzate da multiple compromissioni d'organo), le manifestazioni e gli strumenti che sono attualmente presenti per approfondire il livello di danno osseo. In particolare, si è posta attenzione sulla mineralometria ossea computerizzata con metodica DXA come strumento principe per stabilire lo stato della salute ossea in relazione a parametri biochimici (calcemia, fosforemia, fosfatasi alcalina, vitamina D, PTH). In futuro potremmo approfondire ulteriormente con un campione più omogeneo di soggetti il ruolo che la DXA potrebbe avere nella determinazione e nel follow up della situazione ossea nelle specifiche patologie trattate. In altri termini potremmo avvalorare l'utilizzo della DXA come strumento ideale di diagnosi e monitoraggio di efficacia della terapia nei bambini con età superiore ai 5 anni affetti da patologie genetiche, metaboliche e sindromi malformative; il tutto per migliorare la qualità di vita di questi piccoli pazienti, prevenendo il rischio di andare incontro a fratture e successivo peggioramento del quadro clinico.

1 INTRODUZIONE

La massa ossea aumenta progressivamente nel corso dell'infanzia e dell'adolescenza, raggiungendo il suo picco alla fine della seconda decade di vita. Qualora questo non venisse raggiunto a causa di malattie metaboliche, utilizzo di cortisonici, malnutrizione e altre condizioni, il soggetto una volta adulto ha un forte rischio di sviluppare osteopenia o osteoporosi. Queste condizioni sono caratterizzate da un deterioramento della microarchitettura del tessuto scheletrico che induce fragilità ossea e un aumentato rischio di fratture, malformazioni e dolore. La definizione di osteoporosi data dall'OMS si basa su criteri strumentali, valutati con l'utilizzo della mineralometria ossea a raggi X (MOC-DXA). In particolare in età pediatrica si utilizza come parametro il BMD Z-score, che è caratterizzato dalla densità minerale ossea del paziente rapportata ai valori della popolazione di riferimento che ha la stessa età, sesso ed etnia del paziente considerato. Allo stato attuale, secondo i criteri OMS, l'osteoporosi in età pediatrica è definita da un valore di BMD Z-score ≤ -2 , mentre per l'identificazione di osteopenia si dovrebbero considerare livelli di BMD Z-score compresi tra -1 e -2. La definizione di osteopenia, come vedremo, è molto controversa in letteratura e addirittura alcuni autori attualmente preferiscono sostituire nei referti densitometrici, il termine di osteoporosi con "densità minerale ossea bassa per sesso ed età". Questo principalmente a causa del fatto che è difficile definire una carenza minerale ossea durante l'età evolutiva, ma la definizione di parametri standard è fondamentale per individuare quelli che sono dei cut off patologici che consentano di individuare delle condizioni in cui intervenire con terapia e monitoraggio.

In questo lavoro in particolare abbiamo studiato lo stato della mineralizzazione ossea in bambini portatori di patologie genetiche rare di natura metabolica e malformativa e questo è stato effettuato, come suggerito dalle ultime indicazioni dell'OMS, attraverso i risultati della mineralometria ossea con metodica DXA (dual-energy X-ray absorbiometry), esame fondamentale il cui utilizzo è aumentato negli ultimi anni in pediatria. Sono stati inoltre considerati parametri biochimici specifici come il dosaggio di Ca^{2+} totale ematico, fosforemia, vitamina D, paratormone e fosfatasi alcalina, in seguito correlati con i risultati dell'esame strumentale.

In questa sezione si approfondiranno i concetti generali riguardanti lo stato dell'arte della valutazione ossea in ambito pediatrico, per poi analizzare più avanti il ruolo delle specifiche indagini analitiche nelle varie patologie riportate dal campione considerato.

1.1 Metabolismo dell'osso

Per comprendere i meccanismi che sottendono la perdita di tessuto mineralizzato nelle varie condizioni patologiche che si descriveranno in seguito singolarmente, è necessario fare una premessa circa la struttura del tessuto osseo e i meccanismi di regolazione dei processi metabolici che avvengono normalmente a livello scheletrico.

1.1.1 La struttura microbiologica dell'osso

Il tessuto osseo è il tessuto di sostegno sul quale si articola la struttura del corpo umano, ma oltre alle caratteristiche di robustezza e elasticità, il compartimento osseo ha anche l'importante funzione di riserva di oligoelementi come calcio, magnesio e sodio che svolgono importanti funzioni nell'omeostasi del nostro organismo.

Macroscopicamente, è costituito da osso corticale che si trova esternamente ed è composto da lamelle concentriche e da una parte centrale trabecolare caratterizzata da una struttura lamellare tipicamente "ad alveare". La percentuale di osso corticale (80% del totale) e lamellare (20% del totale) varia tra un distretto e l'altro, ma nelle ossa lunghe è prevalente la componente corticale, mentre nelle ossa corte (vertebre) e piatte (cranio) prevale invece quella trabecolare. Nell'osteoporosi, anche nel bambino, la componente principalmente a rischio di riassorbimento è quella delle trabecole dell'osso spugnoso che lo rende più poroso e quindi più fragile.

Istologicamente, l'osso è costituito da una componente organica (35% del peso secco) e da una componente inorganica mineralizzata. La componente minerale è costituita da Ca^{2+} e Pi (fosfato inorganico) che si assemblano per formare una molecola chiamata idrossiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), che viene depositata su di uno scheletro di fibre collagene, la cui organizzazione influenza la quantità e il tipo di componente minerale nell'osso; ecco perché, come vedremo in seguito, patologie genetiche che influenzano una alterata costruzione di queste fibre collagene possono determinare nei bambini affetti, osteomalacia. Nell'osteogenesi imperfetta ad esempio, sostituzioni di singoli aminoacidi nella porzione ad elica delle catene $\alpha 1$ o $\alpha 2$ del collagene di tipo 1 sovvertono l'organizzazione del tessuto osseo.

La componente organica invece è costituita a sua volta da matrice extracellulare composta principalmente da collagene di tipo 1 e da proteine di derivazione plasmatica (come l'albumina) o prodotte localmente (come le proteine di adesione cellulare e di segnalazione, ossia la trombospondina, osteopontina e fibronectina, ma anche proteine leganti il calcio e proteoglicani, come il biglicano e la decorina).

La componente non minerale cellulare è invece prevalentemente costituita da osteoblasti (con funzione ossificante) e osteoclasti (che riassorbono la matrice ossea). Una volta che l'osteoblasto ha prodotto la matrice che viene sistematicamente mineralizzata, si trasforma in osteocita che rimane in comunicazione con il sistema microvascolare tramite dei canalicoli. Gli osteociti inoltre agiscono da meccanosensori ed essendo a contatto con gli osteoblasti fungono da regolatori di deposizione e riassorbimento osseo. In aggiunta a ciò, essi sono in grado di produrre FGF23, uno dei principali regolatori del metabolismo del fosfato. Anche gli osteoclasti intervengono in questo meccanismo: essi infatti, attraverso l'espressione sulle loro membrane cellulari di una molecola chiamata Osterix (a sua volta regolata da Runx2), contribuiscono alla maturazione osteoblastica. Nell'uomo mutazioni di Runx2 in eterozigosi sono responsabili della displasia cleidocranica (caratterizzata da alterata formazione delle ossa della teca cranica). L'attività osteoblastica è anche influenzata da numerosi fattori di crescita come ad esempio TGF β , FGF 2 e 18, PDGF e IGF 1 e 2. Anche PTH e $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D hanno recettori sulla membrana cellulare degli osteoblasti e svolgono importanti funzioni regolatorie.

Il riassorbimento osseo è invece solitamente determinato dagli osteoclasti che derivano dalla fusione di cellule monocito-macrofagiche. I fattori che regolano l'osteoclastogenesi sono prodotti da osteoblasti e cellule stromali del midollo. In particolare gli osteoblasti producono M-CSF e RANKL, quest' ultimo si lega a RANK presente sulla superficie dei precursori degli osteoclasti e ne determinano la maturazione. L'osteoprotegerina (OPG), prodotta anch'essa dagli osteoblasti, agisce invece legandosi a RANKL, inibendo il processo appena descritto. Ormoni importanti come PTH, vitamina D ed estrogeni stimolano il riassorbimento osseo agendo sulla secrezione di queste molecole.

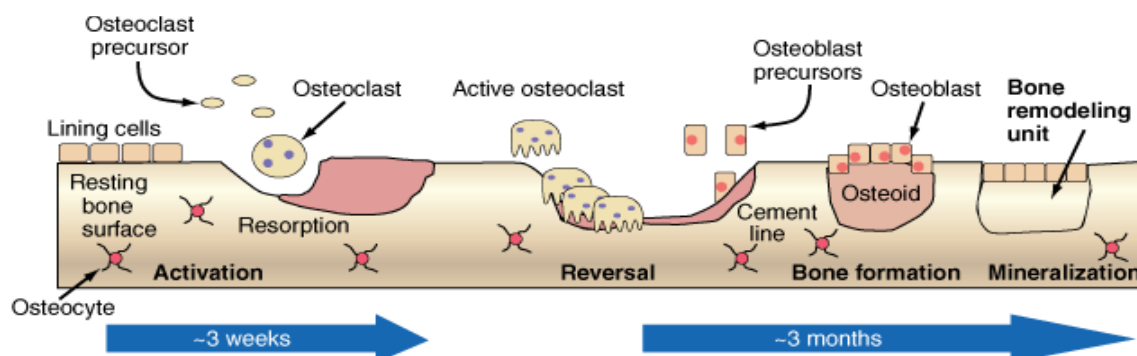


Figura 1 Rappresentazione dei meccanismi che sottendono il rimodellamento osseo. Adattato da: Kasper, Fauci, Hauser et al. Harrison, Principi di Medicina Interna Vol 2, 19ª edizione. Casa Editrice Ambrosiana, 2017; pp 3195-3197.

Il riassorbimento mediato dagli osteoclasti ha luogo in spazi chiamati lacune di Howship, dove queste cellule si trovano ad essere saldamente adese alla matrice ossea. La superficie attiva dell'osteoclasto si trova in corrispondenza di una regione della membrana cellulare che acquisisce una forma "a spazzola" la quale ne aumenta l'estensione; a questo livello si trova inoltre una pompa protonica ATP-dipendente protono-secerne che solubilizza la componente minerale. Questa cellula macrofagica specializzata è inoltre in grado di determinare la dissoluzione della matrice ossea, producendo una proteasi che agisce a livello di questo microambiente acido, che è la catepsina K.

Nel bambino piccolo la formazione di osso avviene attraverso la sostituzione della cartilagine ossificata (ossificazione encondrale) o anche in assenza di un abbozzo cartilagineo (ossificazione membranosa o intramembranosa). Nel primo caso si presenta inizialmente ipertrofia e successivamente morte dei condrociti che in seguito alla lisi della loro membrana determinano il rilascio di una serie di fattori fondamentali per l'ossificazione encondrale (IGF 1 e 2 che rispondono al GH; FGF, PTHrP). Il tessuto osseo così formato risulta molto diverso da quello degli adulti in quanto caratterizzato da fibre collagene grossolanamente intrecciate. La crescita delle ossa in lunghezza dipende principalmente dalla proliferazione delle cellule della cartilagine di accrescimento, mentre la crescita in larghezza e spessore dipende solitamente da neoformazione periostale e riassorbimento endostale.

Con l'età adulta le cartilagini metafisarie si chiudono e questo influenza il fatto che non è più possibile crescere in altezza dopo i 18-20 anni, ma i processi di riassorbimento e deposizione ossea continuano per tutto l'arco della vita. Recenti studi tramite l'utilizzo di radioisotopi hanno riportato come ogni anno il 18% del calcio presente nell'osso venga riassorbito e altrettanto ne venga depositato. A fronte di questo metabolismo costantemente attivo, la vascolarizzazione ossea deve essere efficiente e in effetti si calcola che le ossa, al contrario di quello che ci si aspetterebbe, ricevono il 10% della gittata cardiaca. Uno dei principali driver che normalmente determinano il rimodellamento osseo è la sollecitazione meccanica: questa infatti inibisce negli osteociti il rilascio della sclerostina che è un inibitore del pathway di wnt, stimolando quindi gli osteoblasti a produrre mineralizzazione ossea.

Una volta compresi questi processi, è stato facile individuare delle molecole che fossero indicative della funzione e del metabolismo dell'osso, come per esempio l'isoenzima osseo della fosfatasi alcalina che è un marker di attività osteoblastica, oppure i peptidi derivati dalla degradazione delle molecole di collagene che possono essere dosati nel sangue e sono invece indicativi della funzione osteoclastica². Dopo aver descritto la composizione ossea e i principi di funzionamento della deposizione e riassorbimento osseo, si prosegue

con la trattazione dei meccanismi specifici che regolano la deposizione dell'idrossiapatite, ossia la mineralizzazione ossea.

1.1.2 Meccanismi della mineralizzazione ossea

La deposizione di minerale ossea, come detto precedentemente, avviene grazie alla produzione della stessa da parte degli osteoblasti. Essa viene depositata su di un substrato costituito da una matrice di fibre collagene e la deposizione può avvenire in due modi: inizialmente si realizza in corrispondenza degli spazi intrafibrillari, nelle estremità amino e carbossi-terminale in cui le triple eliche di collagene si appaiano e successivamente negli spazi interfibrillari. L'esatto meccanismo con cui la matrice determinerebbe la deposizione ossea ancora non è conosciuto, ma potrebbe essere dovuto alla presenza di particolari aminoacidi o di una determinata struttura tridimensionale delle fibre collagene; queste condizioni sono quelle che probabilmente causerebbero la nucleazione dell'idrossiapatite.

La sola presenza di una struttura costituita da fibre collagene, non è però sufficiente alla mineralizzazione perché altrimenti qualsiasi tessuto molle potrebbe andare incontro a calcificazioni (vasi, derma). Questo non avviene grazie alla presenza di potenti inibitori come per esempio il pirofosfato (P-Pi). Questo può essere prodotto sia nell'ambiente intracellulare che al di fuori della cellula, per mezzo dell'azione di una pirofosfatasi con produzione di P-Pi a partire da ATP. Normalmente al livello della matrice ossea si ritrova specialmente P-Pi, ma quando viene trascritto il gene per la fosfatasi alcalina, l'enzima rilasciato dagli osteoblasti agisce clivando il pirofosfato e determinando un aumento dell'ossificazione, tramite la deposizione di idrossiapatite.

Un'altra importante proteina implicata in questo processo è la proteina di matrice Gla (MGP), la cui funzione sarebbe quella di determinare un'inibizione dell'ossificazione. Questo è stato appurato anche verificando come l'over-espressione della proteina negli osteoblasti determini nei pazienti osteomalacia per difetti di ossificazione encondrale. Anche alcuni enzimi prendono parte a questo meccanismo, in particolare ricordiamo la sfingomielina fosfodiesterasi 3 (SMPD3) e la fosfatasi orfana 1 (PHOSPHO1). La loro funzione è stata valutata su di modelli murini³: in particolare SMPD3 taglia la sfingomielina presente sulla membrana cellulare per determinare ceramide e fosfocolina, mentre PHOSPHO1 agisce a livello intracellulare con attività fosfatasi. L'effetto degli enzimi descritti è stato ipotizzato studiando topi con mutazioni a livello del gene che codifica per queste proteine e osservando come, in queste cavie, ci fosse un deficit dell'ossificazione endocondrale e intramembranoso. Dagli studi condotti finora, si è compreso che il meccanismo di mineralizzazione è caratterizzato dalla presenza di microvescicole con deposizione progressiva di Ca^{2+} e Pi. Gli enzimi intracellulari di cui si è parlato sopra

agirebbero quindi all'interno di queste microvescicole: SMPD3 (enzima di membrana) formando fosfocolina e fosfoetanolamina, successivamente clivata per generare P_i libero da PHOSPHO1. Ciò determina una alterazione dei livelli del rapporto P_i/P_{pi} con determinazione dello stimolo alla nucleazione dei cristalli di idrossiapatite⁴.

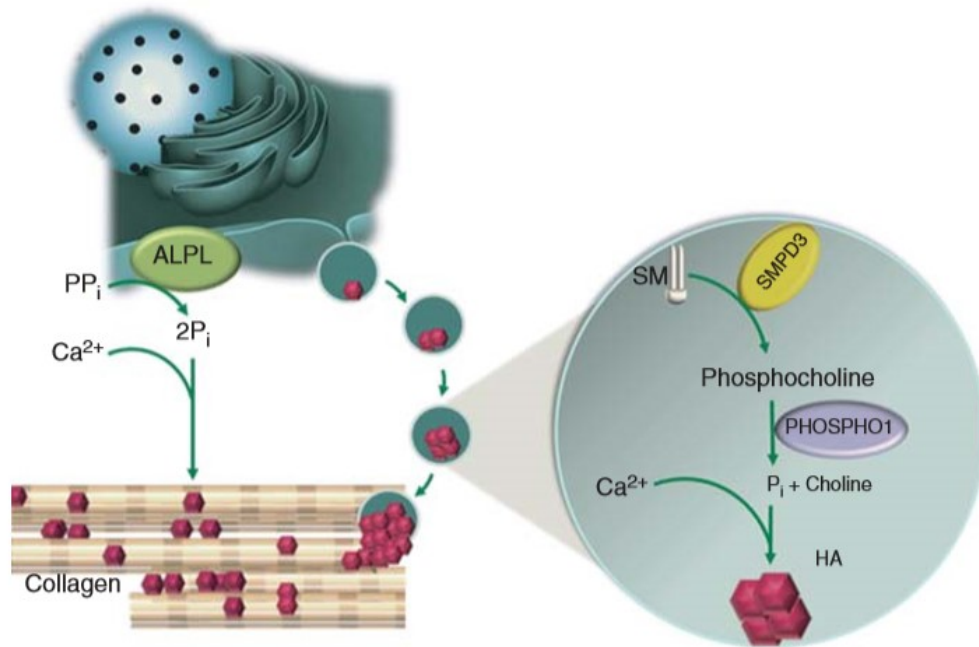


Figura 2 Modello di mineralizzazione ossea. Adattato da: Khavandgar Z, Poirier C, Clarke CJ et al. A cell-autonomous requirement for neutral sphingomyelinase 2 in bone mineralization. *J Cell Biol.* 2011; 194: 277–289.

1.2 La mineralometria ossea in pediatria

1.2.1 Metodiche di valutazione della mineralizzazione ossea

Le tecniche che è possibile adoperare per lo studio della mineralizzazione ossea sono quelle che utilizzano le radiazioni ionizzanti e quelle che impiegano gli ultrasuoni. Le ultime citate sono caratterizzate dalla QUS (quantitative ultrasound) che è stata, negli ultimi anni, molto implementata a causa della sua semplice ed economica esecuzione e dell'assenza di effetti collaterali, come l'esposizione a radiazioni ionizzanti. La QUS studia la modalità di attraversamento dell'osso da parte di un fascio di ultrasuoni emessi in senso trasversale ad esso. Le variabili che vengono analizzate per avere informazioni riguardo il contenuto minerale osseo sono il grado di attenuazione (Broadband Ultrasound Attenuation, BUA) e la velocità degli ultrasuoni (Speed of Sound, SoS; Amplitude-Dependent Speed of Sound, AD-SoS; Bone Transmission Time, BTT), in questo modo si possono studiare non solo la densità minerale, ma anche la struttura e le proprietà meccaniche dell'osso. Attualmente sono presenti raccolte di informazioni che riguardano la struttura ossea nella maggior parte della popolazione di riferimento soprattutto per i distretti di falangi, tibia e calcagno che sono le sedi attualmente studiate nell'indagine ultrasonografica.

Le metodiche che invece utilizzano le onde elettromagnetiche sono caratterizzate da tecniche densitometriche a singolo e a doppio raggio fotonico (single-photon absorptiometry, SPA o dual-photon absorptiometry, DPA) che oggi sono state per la maggior parte sostituite. Un altro strumento che ci consente di studiare nella maniera più accurata di tutte l'osso è la TC quantitativa (QTC) della colonna vertebrale, che però utilizzando una quantità di radiazioni troppo alta (200-1000 Sv) non viene attualmente presa in considerazione. Molto meno impegnativa in termini di radioprotezione è invece la TC quantitativa periferica (pQTC), che studia con la stessa modalità un distretto meno ampio (come radio e ulna), in questa maniera le dosi in Sv utilizzate sono molto inferiori. Nonostante ciò però, attualmente la metodica più diffusa è la MOC-DXA (dual energy X-ray absorptiometry), che come vedremo, è di più semplice esecuzione e ha ridotti effetti collaterali. La DXA per alcuni aspetti non può sostituire la QTC che consente di calcolare parametri importantissimi per comprendere la composizione ossea come la $BMD_{materiale}$ che è il rapporto tra la quantità di tessuto mineralizzato e il volume della matrice ossea, esclusa la parte occupata dal midollo osseo, dalle lacune e dai canali ossei. Un altro indice che può essere considerato è invece la $BMD_{compartimentale}$ che è il rapporto tra la quantità di tessuto minerale e il volume della matrice ossea compreso il midollo, le lacune e i canali ossei.

In ultimo per calcolare il BMD_{totale} viene utilizzato al denominatore tutto il volume racchiuso all'interno della superficie ossea. Purtroppo questi indici di mineralizzazione non possono essere indagati invece con la metodica DXA perché questa consente di eseguire uno studio bidimensionale, non tridimensionale e questo è alla base delle sue principali limitazioni⁵. Leonard et al.⁶ nel loro lavoro hanno comparato le diverse modalità di studio della densità ossea con il pQTC arrivando a definire il principale parametro DXA che risulta il più simile possibile ai risultati di una TC quantitativa e questo è costituito dal BMC total body Z-score relativo all'altezza; si vedrà in seguito il suo significato.

	SPA	DXA	pQTC	QUS
Sito di misurazione	radio	Vertebre lombari, collo femore, radio, corpo in toto	Radio/ulna	Falangi mano, calcagni e tibia
Componente ossea misurata	Corticale e trabecolare integrata	Corticale e trabecolare integrata	Corticale e trabecolare separate	Corticale e trabecolare integrata
Precisione (%)	1-3	1-3	1-3	0,4-4
Accuratezza (%)	5-8	4-8	5-8	-
ED (Sv)	1-50	0,08-4,6	<2	Nessuna
Durata esame (min)	3-5	2-5	3-5	5

Tabella 1 Confronto tra le principali tecniche descritte. *Adattato da: Gordon CM, Leonard MB, Zemel BS et al. International Society for Clinical Densitometry. 2013 Pediatric Position Development Conference: executive summary and reflections. J Clin Densitom. 2014;17(2):219–224.*

1.2.2 Modalità di esecuzione e parametri considerati

La MOC è, come specificato sopra, l'esame più utilizzato per la misurazione quantitativa della massa ossea, fornendo così un contributo fondamentale alla moderna diagnostica dell'osteopenia e/o dell'osteoporosi. Gli apparecchi attualmente in uso sono a raggi X (MOC-DXA) e data la bassissima dose di radiazioni che sono emesse (circa 1/5 di una comune radiografia, che corrisponde a 5 o 6 μ Sv) è considerata una metodica sicura in ambito pediatrico.

Le sedi di esame nel bambino sono diverse da quelle utilizzate nei pazienti adulti (in cui si studiano le aree ad elevata componente trabecolare, le vertebre lombari da L1-L4, il collo del femore, il radio ultradistale, l'intero scheletro), sono infatti costituite da:

- Gli spondali lombari (L1-L4);
- L'intero scheletro compresa la testa;
- L'intero scheletro senza la testa (la testa rappresenta la gran parte del contenuto osseo totale ma la densità a questo livello non cambia molto sulla base della crescita o di condizioni patologiche⁵⁻⁷).

Lo studio di altri distretti andrebbe considerato sulla base delle specifiche richieste cliniche.

Il risultato della misurazione può essere espresso in g/cm², come densità minerale ossea (BMD) o in g/cm come contenuto minerale calcico (BMC). Il valore rilevato è poi confrontato con una curva di normalità che rappresenta la descrizione del parametro nella popolazione sana al picco della massa ossea (T score) per mezzo di un programma in grado di indicare il numero di deviazioni standard (DS) del soggetto in esame rispetto alla media della popolazione di riferimento⁸. Il T-score è utilizzato principalmente nell'adulto mentre com'è intuibile, in un soggetto in continua crescita quale il bambino, non ha senso confrontare il risultato riscontrato con il picco della massa ossea non ancora raggiunto, per cui è preferibile studiare lo Z-score, che è il valore rilevato rispetto a quello di un soggetto sano della stessa età e dello stesso sesso del paziente.

1.2.3 Indicazioni all'esecuzione della MOC-DXA

I pazienti in cui va utilizzata la MOC-DXA ed il momento in cui eseguire l'esame, sono stati delineati dalle linee guida della *Società Internazionale di Densitometria Clinica (ISCD)* aggiornate al 2013.

L'esecuzione dell'esame è indicata solo per bambini con età superiore a 3 anni, a meno che non ci siano particolari condizioni costituite da patologie primitive dell'osso.

In generale l'esecuzione della MOC-DXA è prevista in bambini a rischio di fratture da fragilità ossea, per guidare decisioni inerenti un trattamento in atto per specifiche patologie (ad esempio con corticosteroidi o terapia con gli ormoni tiroidei), per il monitoraggio di una terapia precedentemente impostata con sostituti della vitamina D o calcio carbonato, oppure quando si sospetti osteoporosi in base a precedenti esami radiologici eseguiti dal paziente (ad esempio è possibile che in seguito all'esecuzione di una telespinografia per la valutazione di una scoliosi, sia refertata una probabile diminuzione della densità minerale ossea che debba essere approfondita con un esame densitometrico, allo stesso modo se l'indagine radiologica viene eseguita per una pregressa frattura)⁹.

Nella tabella sottostante sono riportate le principali indicazioni specifiche per l'esecuzione della MOC-DXA¹⁰ secondo il Ministero della Salute (dipartimento di qualità). Come si può

notare le condizioni che necessitano dell'esecuzione di questo esame sono inquadrabili all'interno di condizioni patologiche quali: malattie endocrine, malattie iatrogene, difetti genetici e cromosomici, alterazioni nutrizionali, malattie tumorali e condizioni croniche.

Malattie endocrine	Malattie iatrogene
- Ipogonadismo - Sindrome da insensibilità agli estrogeni - Sindrome da insensibilità agli androgeni - Deficit di ormone della crescita - Panipopituitarismo - Iperteroidismo - Sindrome di Cushing - Iperparatiroidismo primitivo - Sindrome di McCune Albright	- Corticosteroidi - Anticonvulsivanti - Chemioterapici - Analoghi del GnRH - Dosi elevate di L-tiroxina - Terapia antiretrovirale in pazienti HIV positivi - Anticoagulanti
Difetti genetici	Alterzioni nutrizionali
- Osteogenesi imperfetta - Omocistinuria - Sindrome di Marfan - Sindrome di Ehlers-Danlos - Sindrome di Menkes - Intolleranza alle proteine con lisinuria - Fenilchetonuria - Malattia di Gaucher - Fibrosi cistica	- Anoressia nervosa - Intolleranza al latte - Carenza di calcio, rame - Diete vegetariane - Malnutrizione - Carenza di vitamina C, K, - Nutrizione parenterale totale - Eccessivo consumo di bevande a base di cola
Malattie cromosomiche	Malattie maligne
- Sindrome di Turner - Sindrome di Klinefelter	- Leucemia - Linfoma - Tumori solidi
Malattie croniche	Miscellanea
- Reumatiche (artrite giovanile idiopatica, lupus eritematoso sistemico, dermatomiosite) - Renali (insufficienza renale cronica, acidosi tubulare renale, ipercalciuria idiopatica) - Infiammatorie intestinali (malattia di Crohn, colite ulcerosa)	- Immobilizzazione-scarso uso - Intensa attività fisica - Post-trapianto - Morbo di Paget giovanile - Ipofosfatasia - Malattie osteolitiche - Malattia di Rett - Osteoporosi idiopatica

- Epato-biliari (forme colestatiche) - Cardiache (insufficienza cardiaca congestizia) - Ematologiche (talassemia, emocromatosi ereditaria, emofilia A, anemia a cellule falciformi) - Immunologiche (mastocitosi sistemica, sindrome da iper-IgE)	giovane
--	---------

Tabella 2 Condizioni in cui l'esecuzione della MOC-DXA dovrebbe essere considerata.

Adattata da: Ministero della salute dipartimento della qualità direzione generale della programmazione sanitaria, dei livelli di assistenza e dei principi etici di sistema Individuazione dei criteri di Accesso alla Densitometria Ossea. SOURCE DOCUMENT II, Febbraio 2005.

1.2.4 Procedura pratica per l'esecuzione della MOC-DXA

La procedura con le nuove strumentazioni, può impiegare per lo Scan solo 2 o 3 minuti per sito dipendentemente dall'estensione della zona che si desidera studiare.

Alcuni accorgimenti enunciati dalla *National Osteoporosis Society of UK*¹¹ per rendere l'esecuzione dell'esame il più agevole possibile sono:

- rendere l'ambiente adeguato e confortante per il bambino tramite l'utilizzo di colori e disegni applicati alle pareti;
- spiegare con parole semplici quello che si andrà a fare, in modo da ottenere una compliance adeguata, anche attraverso la proposta di una possibile ricompensa;
- misurare peso e altezza del bambino e poi privarlo di indumenti o oggetti che siano costituiti da componenti metalliche, in seguito posizionarlo nella maniera più idonea possibile;
- tra i principali problemi che riguardano l'esecuzione della MOC-DXA ci sono la creazione di artefatti per la presenza di placche o fili metallici a livello spinale o la presenza di artefatti di movimento, questi ultimi potrebbero essere eliminati tramite l'utilizzo di alcuni semplici accorgimenti quali: nei lattanti si esegue l'esame dopo l'allattamento, nei bambini in età prescolare si può eseguire una leggera sedazione, in età successive invece è più semplice ottenere che il bambino non si muova, attraverso la spiegazione della procedura.

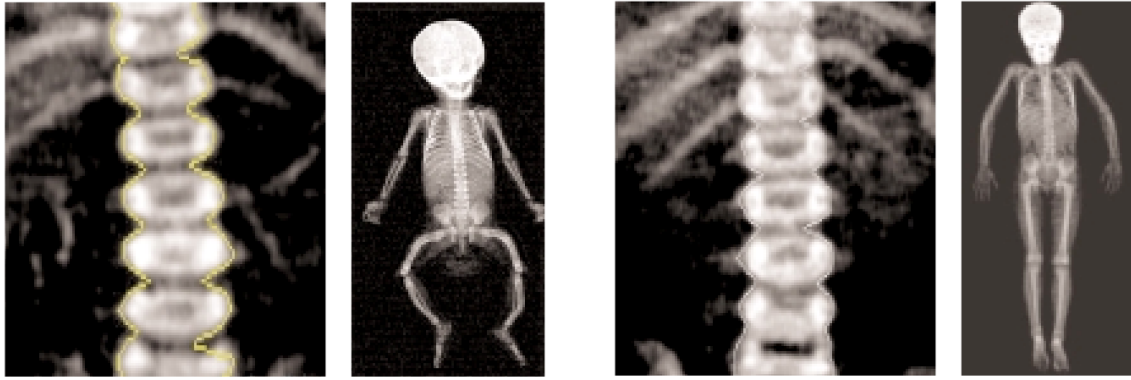


Figura 3 A sinistra: lattante di 6 mesi con osteogenesi imperfetta. A destra: bambina di 5 anni con neutropenia congenita. *Adattato da: Eastell R, Adams JE, Alsop C et al. A practical guide to Bone Densitometry in children. National Osteoporosis Society, 2004:13-14.*

1.2.5 Interpretazione dei risultati

Mentre negli adulti bassi valori di BMD correlano molto bene con il rischio di andare incontro a fratture, interpretare i risultati della MOC-DXA nei bambini non risulta affatto facile. Un interessante studio eseguito da Gafni et al¹² ha riportato come anni fa, gran parte delle diagnosi di osteoporosi eseguite in clinica pediatrica fossero il frutto di interpretazioni non corrette dei dati a causa dell'uso del T-score, che confronta i valori riscontrati con quelli della media della popolazione adulta (62% degli errori riportati nello studio), utilizzo di database che non considerano la differenza di genere (21%), mappatura ossea non corretta (21%), errori statistici o di misurazione (12%) e non considerazione dell'altezza del bambino (15%). Quest'ultimo aspetto è molto importante in quanto la BMD misurata con la DXA è, nelle strumentazioni utilizzate oggi, corretto per l'area, ma non per il volume osseo e così c'è il rischio che a parità di densità volumetrica ossea vera tra due individui, quello a più bassa statura appaia con BMD minore¹².

I problemi principali che sembrano essere presenti nell'uso della MOC-DXA sono¹³:

- Mancanza di dati di riferimento standardizzati nella popolazione pediatrica;
- Il calcolo del T-score è inadeguato nel paziente pediatrico dato che egli non ha ancora raggiunto il picco di massa ossea che si ottiene solitamente a circa 20 anni;
- I risultati dovrebbero essere comparati con dati ottenuti da soggetti della stessa età, sesso, stadio dello sviluppo, etnia e eventualmente patologia.

Una volta identificate queste criticità, diversi studi hanno provato a dirimere le suddette questioni, cercando di trovare dei sistemi standardizzati di riferimento¹⁴⁻¹⁷. Questi lavori hanno individuato diversi metodi di aggiustamento, facendo riferimento alla misurazione

con la TC quantitativa (QTC). Quindi, attualmente i risultati della DXA sono riportati come aBMD Z-score che produce una stima della deviazione standard rispetto alla mediana diversificata per sesso ed età^{18,19}. I fattori che devono essere considerati per evitare di sottostimare o sovrastimare la massa ossea sono sesso, etnia, altezza, peso, composizione corporea e sviluppo puberale²⁰. Ad oggi vi sono anche dei dati di riferimento, che possono essere considerati sempre in base alla strumentazione utilizzata e ai relativi hardware e software. Una tra le raccolte di dati più autorevoli è quella realizzata da BMDCS (Bone Mineral Density in Childhood Study) che ha ottenuto dati da una coorte multi-etnica americana nell'anno 2014²¹. In conclusione per rendere i risultati della MOC-DXA il più accurati possibile, si dovrebbe sempre considerare aBMD pesata sull'altezza ed età e BMC relativa al peso e alla quantità di massa magra⁵.

Nonostante l'interpretazione dei dati sia migliorata alla luce dell'importanza data a questi parametri, una diagnosi di osteoporosi non dovrebbe mai essere eseguita senza l'evidenza clinica di fragilità ossea. Inoltre, a differenza dell'adulto, nel bambino è priva di senso la definizione dello stato di osteopenia (definito negli adulti da un T-score tra -1 e -2,5)²².

Attualmente un valore di aBMD Z-score ≤ -2 DS il valore aspettato, viene considerato come basso in riferimento all'età⁸.

Per cercare di standardizzare la diagnosi di osteoporosi, i seguenti criteri sono stati approvati dalle linee guida PDC del 2014⁵:

- Presenza di 1 o più fratture vertebrali non causate da patologie locali o da un trauma ad alta energia;
- BMC o aBMD Z-score ≤ -2 o storia significativa di fratture (2 o più fratture di ossa lunghe prima dei 10 anni oppure 3 o più fratture di ossa lunghe prima dei 19 anni).

Inoltre, prima di ripetere l'esame nel monitoraggio del paziente, dovrebbero passare almeno 6 mesi, meglio 1 anno soprattutto per motivi di radioprotezione. Nelle tabelle sottostanti sono raccolte invece le posizioni ufficiali ISCD stabilite nel 2013 riguardo l'uso della MOC-DXA in ambiente pediatrico.

Prevenzione delle fratture e definizione di osteoporosi

1) Valutare l'uso della DXA per bambini che possono beneficiare di un intervento dato l'alto rischio clinico di fratture.

2) Il ritrovamento di una o più fratture vertebrali da compressione sono indicative di osteoporosi in assenza di un forte trauma o una condizione patologica locale.

3) La diagnosi di osteoporosi in ambito pediatrico non andrebbe fatta solo sulla base di criteri densitometrici.

4) In assenza di fratture da compressione a livello lombare, la diagnosi di osteoporosi è effettuata con la presenza di BMD Z-score ≤ -2 e da una storia clinica rilevante di fratture (2 o più fratture di ossa lunghe prima dei 10 anni o 3 o più fratture di ossa lunghe a qualsiasi età). Un BMC/BMD Z-score > -2 non preclude la possibilità di avere fragilità scheletrica e aumentato rischio di frattura.

Interpretazione del risultato della DXA in bambini e adolescenti con malattia che può riguardare lo scheletro

1) La misurazione con DXA è parte della valutazione complessiva della salute scheletrica in pazienti a incrementato rischio di frattura.

2) In pazienti con malattia ossea primaria o a rischio di una patologia ossea secondaria, una DXA dovrebbe essere effettuata quando il paziente potrebbe beneficiare di interventi di diminuzione dell'elevato rischio di fratture significative, o la DXA potrebbe influenzare il management patologico successivo.

3) La DXA non dovrebbe essere eseguita se non può essere assicurato un posizionamento appropriato del paziente.

Interpretazione della DXA in bambini e adolescenti

1) La DXA è il metodo preferito per determinare il valore di BMC e aBMD.

2) Le scansioni spinale posteriore-anteriore (PA) e la total body senza testa (TBLH), sono i siti scheletrici preferiti per studiare BMC e aBMD nella maggior parte dei soggetti pediatrici. Altri siti d'indagine potrebbero essere utili dipendentemente dalle necessità cliniche.

3) La misurazione della quantità di tessuti molli con la scansione total body può essere utile nella valutazione di pazienti con condizioni croniche associate con malnutrizione o con deficit muscolari o scheletrici.

4) Il bacino non è un sito adeguato di valutazione nel bambino in crescita e questo è dovuto a variabilità nello sviluppo dello scheletro.

5) Quando è indicato un follow up con DXA, l'intervallo minimo tra gli esami deve essere di 6-12 mesi.

6) Nei bambini con bassa statura e disturbi della crescita, i valori di BMC spinali e aBMD devono essere aggiustati come BMAD o Z-score pesato sull'altezza.

7) Un appropriato set di dati di riferimento dovrebbe includere un campione di bambini sani sufficientemente largo da considerare misurazioni ossee variabili e che prendono in considerazione genere, età e razza/etnia.

8) È necessario usare una strumentazione, software e hardware adeguati nell'esecuzione dell'esame.

9) Il referto DXA dovrebbe sempre contenere informazioni: tecniche sulla strumentazione utilizzata; nome del medico; età, genere, etnia, peso e altezza del paziente; storia medica rilevante e fratture precedenti; indicazioni allo studio, stadio di Tanner; BMC e/o aBMD Z-score aggiustati per la crescita, raccomandazioni per il timing della successiva DXA.

10) Il T-score non dovrebbe essere calcolato, il termine "osteopenia" non dovrebbe essere utilizzato in pediatria e per pazienti con BMC o aBMD Z-score ≤ -2 SD è preferito il termine "densità minerale ossea bassa per sesso ed età".

Considerazioni generali sulla DXA in bambini in età prescolare

1) La DXA è una metodica adeguata per la valutazione densitometrica in età prescolare.

2) La misurazione della densità minerale ossea sulla scansione lombare è sufficientemente riproducibile in bambini da 0-5 anni.

3) BMC total body è sufficientemente riproducibile in bambini sopra i 3 anni.

4) Lo studio di BMC total body nei bambini con età < 3 anni è limitato a causa della mancanza di dati con cui operare un confronto.

5) La misurazione in corrispondenza di femore e polso sono tecnicamente fattibili in bambini sotto i 5 anni ma ci sono pochi dati riguardo la metodologia e la riproducibilità.

6) Nei bambini < 5 anni di età, l'impatto dei difetti di crescita nell'interpretazione dei risultati della DXA devono essere considerati, ma non sono attualmente quantificabili.

Tabelle 3 Posizioni ufficiali ISCD 2013 sull'uso della DXA in pediatria. *Adattato da: Crabtree NJ, Arabi A, Bachrach LK, et al. International Society for Clinical Densitometry. Dual-energy X-ray absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: the revised 2013 ISCD Pediatric Official Positions. J Clin Densitom. 2014;17(2):225–242.*

1.3 Studio biochimico del metabolismo calcio-fosforo

Oltre alla valutazione della mineralizzazione con l'uso della MOC-DXA, in questo lavoro, il metabolismo osseo è stato studiato anche attraverso specifici parametri di laboratorio: calcemia e fosforemia, vitamina D, fosfatasi alcalina e paratormone (PTH). Nei paragrafi sottostanti si andranno ad approfondire concetti riguardanti le funzioni di queste molecole, sempre in relazione alla costituzione dello scheletro umano, ponendo particolarmente attenzione al ruolo della vitamina D, alle conseguenze della sua carenza e alle modalità del reintegro di questo importantissimo ormone.

1.3.1 Funzioni della vitamina D

La vitamina D è un ormone fondamentale per il mantenimento di un corretto metabolismo calcio-fosforo, infatti legandosi ai propri recettori a livello intestinale e renale e aumentando il riassorbimento del calcio in questi due distretti, mantiene i livelli della calcemia costanti con valori di Ca^{2+} totale tra 8,5 e 10,5 mg /dl (livelli di riferimento nella popolazione pediatrica) ed è anche un importante regolatore della mineralizzazione ossea. Viene prodotto in maniera endogena a livello della cute, per irradiazione solare; a partire dal cortisone si ha la formazione di colecalciferolo (D3), che insieme al D2 (ergocalciferolo) può anche essere assunto con la dieta. D2 e D3 sono pro-ormoni inattivi che vengono trasportati al fegato attraverso la vitamina D-binding protein. Qui esso è trasformato dall'enzima 25-idrossilasi in 25-idrossivitamina D. A questo punto l'ormone non ancora attivato, viene convertito dalla 1α -idrossilasi renale, la cui funzione è regolata dal PTH (il paratormone, a sua volta, aumenta in seguito alla presenza di bassi valori di calcio ematico e alti livelli di fosfatemia)²³.

Numerose ricerche cliniche hanno però messo in luce il molteplice ruolo della vitamina D in diversi organi e apparati, data la presenza a vari livelli del recettore della vitamina D (VDR), le principali sono: regolazione della proliferazione e differenziazione cellulare (in particolare a livello cheratinocitario) e controllo del sistema immunitario. Attualmente diversi studi hanno indagato anche la possibile implicazione della vitamina D nella fisiopatogenesi di alcune malattie autoimmuni come diabete mellito e tiroiditi²⁴, ma anche di patologie infiammatorie croniche intestinali (MICI) e dell'asma, infatti alterazioni dei suoi livelli sarebbero associate soprattutto a uno scarso controllo della patologia²⁵.

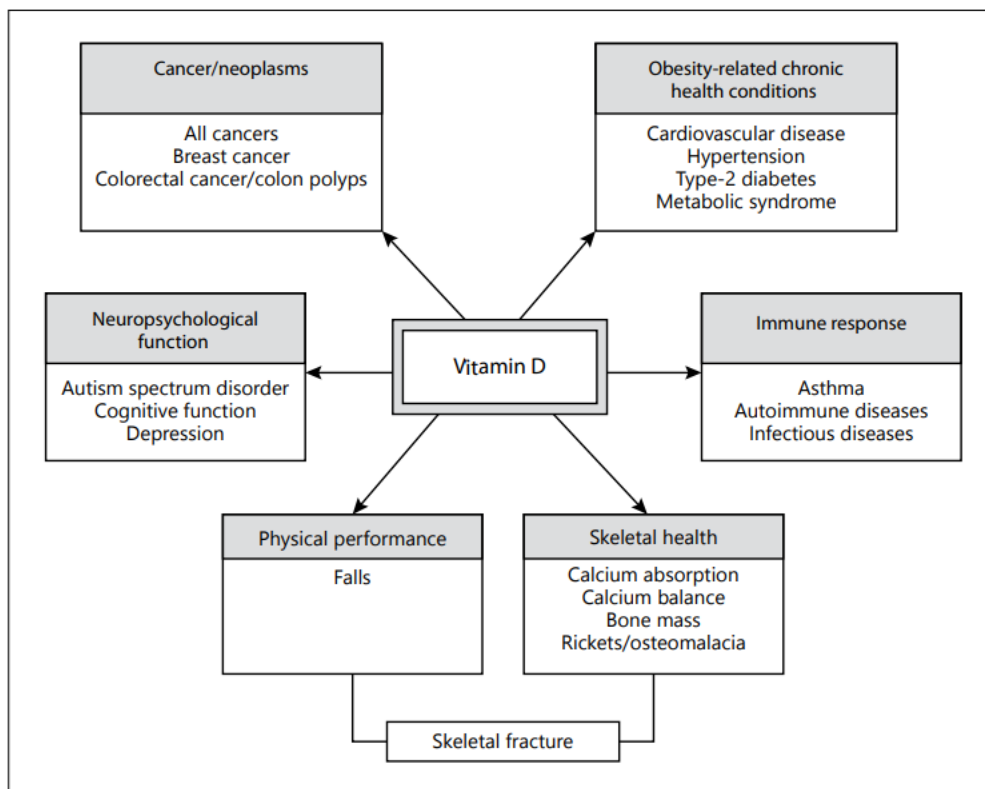


Figura 4 Relazione tra ipovitaminosi D e condizioni patologiche.

1.3.2 Effetti della vitamina D sul metabolismo dell'osso

Attualmente non c'è un comune accordo degli studiosi riguardo il ruolo che un eventuale reintegro di vitamina D potrebbe avere sul tono calcico e sulla prevenzione di fratture²⁶. Di certo però si sono comprese le funzioni di questo ormone a livello osseo.

L'1,25-idrossivitamina D infatti determina:

- L'up-regolazione della trascrizione dei trasportatori del calcio TRPV5 e TRPV6 a livello della mucosa intestinale, anche se diversi studi non hanno riportato alcuna associazione tra la supplementazione di vitamina D e un aumento dell'assorbimento di calcio^{27,28};
- La stimolazione degli osteoblasti nella deposizione di osso: i geni bersaglio a questo livello comprendono quelli per le proteine della matrice ossea, osteocalcina e osteopontina con una stimolazione della loro trascrizione, mentre vi è una azione inibitoria nei confronti dell'espressione dei geni per il collagene di tipo 1. Altri effetti sono: stimolazione del riassorbimento osseo attraverso l'attivazione degli osteoclasti (produzione di RANKL che agisce legandosi a RANK) e funzione antiproliferativa sulle cellule paratiroidi.

La funzione della vitamina D può essere osservata indirettamente anche attraverso gli effetti benefici che un reintegro dell'ormone potrebbe avere sulla mineralizzazione ossea in stati carentiali. Diversi studi hanno mostrato come vi sia una associazione tra supplementazione di vitamina D in pazienti con livelli nel sangue $<50\text{nmol/l}$ (bassi livelli) e il miglioramento dello stato di mineralizzazione ossea anche se moderato²⁹⁻³⁴. In alcuni di essi viene approfondito come, la risposta osteogenetica alla vitamina D riguardi principalmente il bacino in età prepubere e la colonna lombare in post-pubertà. Bisogna però considerare che sono tutti studi eseguiti su campioni di bambine, infatti attualmente non sono stati osservati benefici riguardo la supplementazione per bambini maschi. Uno dei pochi studi controllati randomizzati esistenti, includenti maschi e femmine ha previsto la suddivisione in 3 gruppi a cui sono stati rispettivamente somministrati: il placebo, 200 UI di vitamina D al giorno, 2000 UI di vitamina D al giorno. In questo caso è stato dimostrato un miglioramento nella mineralizzazione ossea a livello dell'anca, all'aumentare della dose somministrata³⁵. In conclusione la supplementazione di vitamina D risulta essere benefica sui livelli di mineralizzazione ossea solo in quei pazienti con valori insufficienti della stessa.

1.3.3 Correlazione tra vitamina D, PTH, calcitonina e metabolismo $\text{Ca}^{2+}\text{-P}$

Come precedentemente accennato il ruolo della vitamina D sarebbe quello di aumentare il riassorbimento di calcio ma anche di fosfato a livello intestinale e di inibirne il riassorbimento a livello osseo. Così facendo essa presenta un ruolo importantissimo nella deposizione di osteoide, ma soprattutto di cristalli di idrossiapatite. A questo meccanismo prendono parte non solo la vitamina D, ma anche il calcio e il fosforo che se mancanti, possono comunque determinare un danneggiamento della mineralizzazione ossea, quindi calcemia e fosforemia vanno attentamente monitorati e se si comprende che l'abbassamento del loro livello non è secondario a una ipovitaminosi D, ma primitivo, ne va compresa la causa ed eventualmente andrebbero integrati. Una diminuzione di questi microelementi infatti, non solo può contribuire a determinare quadri molto gravi in acuto con compromissione cardiaca e respiratoria, ma la loro carenza cronica può determinare: dolore osseo, osteomalacia, pseudofratture, debolezza muscolare, rachitismo e bassa statura.

Un altro attore prende parte a questa scena, cioè il PTH, la cui funzione è quella di mantenere livelli costanti di calcio e fosfato in circolo; in particolare quando la calcemia si abbassa e la fosforemia si alza le paratiroidi vengono stimulate a produrre PTH, che determina un aumento del riassorbimento osseo di Ca^{2+} (stimolazione dell'azione degli osteoclasti attivati grazie alla mediazione degli osteoblasti, entrambi i tipi di cellule sono aumentati di numero nell'iperparatiroidismo cronico) e un aumento dell'escrezione a livello

tubulare renale di fosfati. Il PTH quindi tende ad innalzarsi ogni qualvolta si abbia una grave ipovitaminosi D con deficit di Ca^{2+} e P. Questo ormone è invece contro-regolato dalla calcitonina, un polipeptide prodotto dalle cellule C della tiroide che, sensibili agli innalzamenti di calcio e fosforo, producono questo mediatore proteico ipocalcemizzante, le cui funzioni sono quelle di inibire l'assorbimento intestinale e renale di calcio, favorirne l'escrezione a livello dei tubuli renali e inibire l'attivazione degli osteoclasti. Proprio in virtù di questo, in passato la calcitonina era stata proposta nel trattamento delle condizioni di osteoporosi soprattutto nell'adulto, attualmente invece il suo ruolo è stato molto ridimensionato e ad oggi la calcitonina non ha alcuna indicazione terapeutica accertata.

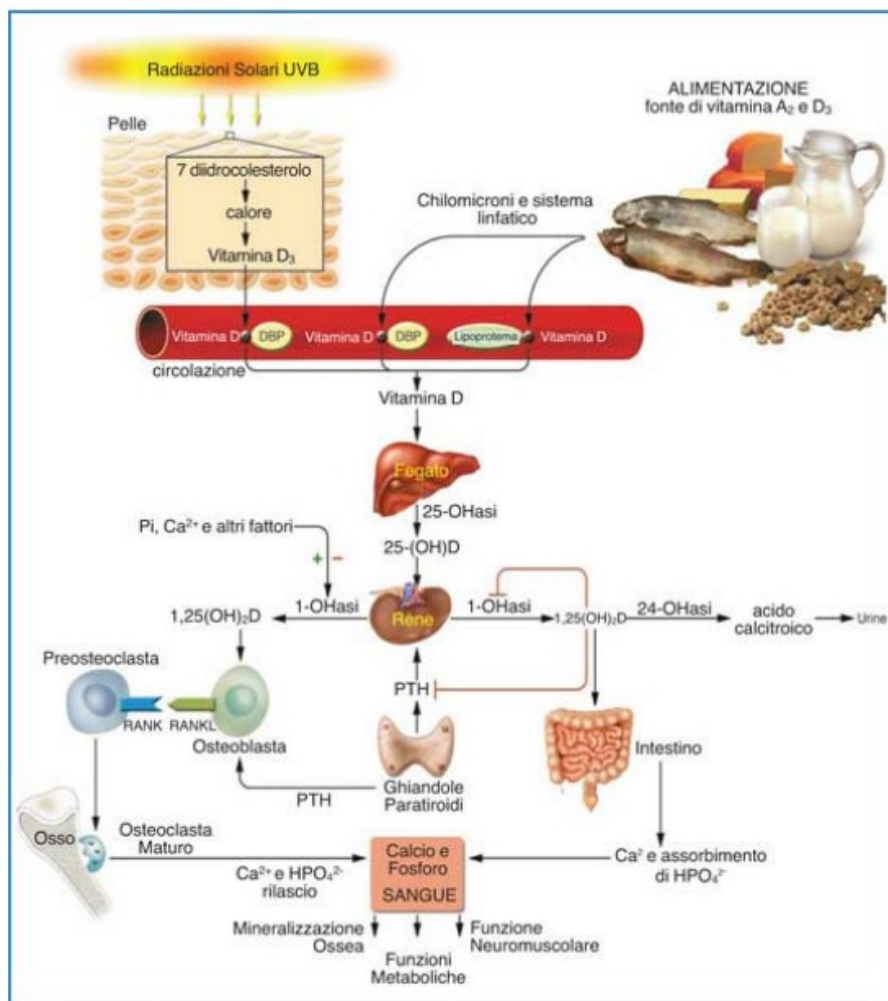


Figura 5 Meccanismi di regolazione del metabolismo fosfo-calcico.

1.3.4 Monitoraggio dei livelli di vitamina D

Nonostante sia un argomento che è stato affrontato in diversi studi, ancora oggi non si conosce il valore ottimale di 25-idrossivitamina D che dovrebbe essere mantenuto per ottenere un discreto livello di salute scheletrica ed extrascheletrica.

Per quanto riguarda il monitoraggio, i livelli di 25-idrossivitamina D correlano con l'ormone assunto con la dieta e con quello di sintesi endogena ed ha un'emivita maggiore rispetto all'isoforma attiva, ma attualmente sono presenti idee controverse per quanto riguarda l'utilità del suo dosaggio, vista la possibile assenza di associazione con i livelli presenti nel distretto corporeo³⁶. Il dosaggio della 25-idrossivitamina D viene però attualmente utilizzato nella pratica clinica, anche perché correla molto bene con la supplementazione, in maniera dose-dipendente. Al contrario la misurazione della 1,25-idrossivitamina D non è molto utilizzata a causa della sua breve emivita e del fatto che la sua concentrazione è fortemente influenzata dai livelli di PTH.

I valori auspicabili di vitamina D nella popolazione pediatrica secondo la Pediatric Endocrine Society e l'American Academy of Pediatrics dovrebbero essere almeno di 50 nmol/L³⁷⁻³⁸. Recenti osservazioni hanno però valutato come per raggiungere tali valori sarebbe necessario un apporto di molto superiore, rispetto a quello assunto giornalmente con la dieta³⁹. Oltre alla vitamina D introdotta con l'alimentazione, una supplementazione dovrebbe essere fornita a quanti sono ad alto rischio di deficienza di vitamina D o di sviluppare fratture multiple a livello osseo o portatori di disordini del metabolismo del calcio. Nella tabella sottostante sono riportati i valori ematici di vitamina D desiderati, sufficienti e insufficienti nella popolazione pediatrica.

TABLE 5 Vitamin D Status in Relation to 25(OH)-D Levels

Vitamin D Status	25(OH)-D Level, nmol/L (ng/mL)
Severe deficiency	≤12.5 (5)
Deficiency	≤37.5 (15)
Insufficiency	37.5–50.0 (15–20)
Sufficiency	50–250 (20–100) ^a
Excess	>250 (100) ^b
Intoxication	>375 (150) ¹⁰⁴

Tabella 4 Livelli soglia di vitamina D per la definizione di deficit, insufficienza, sufficienza di vitamina D in pediatria. Adattato da: Misra M, Pacaud D, Petryk A et al. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. Pediatrics 2008;122, 398–417.

In ogni caso lo screening sulla popolazione pediatrica andrebbe eseguito, qualora vi sia un sospetto di carenza di vitamina D o della presenza di sintomi non specifici quali scarsa crescita, deficit motori, improvvisa irritabilità, oltre a condizioni ambientali (come la presenza di bambini di colore che vivono a elevate altitudini), l'assunzione di alcuni farmaci come anticonvulsivanti e glucocorticoidi, la presenza di particolari patologie che possano determinare malassorbimento, come fibrosi cistica e patologie infiammatorie croniche. Particolarmente importante è anche il monitoraggio in pazienti con frequenti fratture per massimizzare l'assorbimento di calcio⁴⁰.

Le conseguenze a livello osseo di una ipovitaminosi D con conseguente innalzamento del PTH si configurano con il quadro di rachitismo. Il rachitismo è principalmente causato da un deficit primario di vitamina D, ma potrebbe anche essere correlato secondariamente a diminuzione di calcio e fosforo o a patologie genetiche, come il rachitismo familiare ipocalcemico o la mutazione del recettore della vitamina D.

Proprio a causa della mancata differenziazione condrocitaria e della scarsa mineralizzazione della matrice osteoide i bambini rachitici si presentano con deformità ossee come il ginocchio varo o valgo, rotazione interna dell'anca, deformità anteriore del femore, prominenza delle cartilagini osteocondrali ("rosario del rachitico") e perdita di robustezza delle ossa del cranio. Questi bambini sono maggiormente esposti a fratture e si presentano con debolezza muscolare, fino ad arrivare, nei casi più gravi a quadri acuti, con manifestazioni di tetania (specialmente durante lo spurt puberale), cardiopatia e aritmie, a causa delle bassissime concentrazioni di calcio²⁰.



Figura 6 Anomalie scheletriche nel bambino rachitico.

1.3.5 Modalità di somministrazione di vitamina D e calcio

La necessità di incrementare la quantità di vitamina D assunta per raggiungere il cut-off stabilito inizia già durante i primi mesi di vita, dato che con un'assunzione media di 750 ml/die di latte la quantità di vitamina D fornita al lattante è tra 11 e 38 UI/die, che è molto inferiore rispetto al livello desiderabile. Per questo durante i primi sei mesi di vita, il pasto latte viene attualmente supplementato con un dosaggio di 400 UI di vitamina D. Anche successivamente, con il divezzamento, per ottenere valori di 50 nmol/L nella maggior parte della popolazione pediatrica non basterebbe la quantità assunta con la dieta o prodotta in maniera endogena⁴¹. Senza contare il fatto che attualmente, sono conosciuti i rischi di una eccessiva esposizione solare soprattutto per i fototipi 1 e 2 e sono state emesse diverse raccomandazioni per quanto riguarda l'esposizione a raggi UV⁴². Per questo recenti politiche, soprattutto americane e canadesi, hanno consigliato l'utilizzo di cibi fortificati ed emanato delle raccomandazioni riguardo l'uso di alimenti normalmente contenenti la vitamina D⁴³. Per esempio in Europa sono presenti cereali e margarina fortificati, negli Stati Uniti formaggio, pane, latte e diversi altri cibi sono fortificati. Un recente studio danese che ha incluso nella dieta latte e pane fortificati in una coorte costituita da adulti e bambini (4-60 anni) ha mostrato come questa giunta fosse sufficiente per ottenere livelli sierici di 25-(OH)D >50 nmol/L⁴⁴. In conclusione questi e diversi altri studi non sono arrivati ad una decisione finale riguardo alla possibilità di avviare una somministrazione standardizzata a tutti i pazienti pediatrici per raggiungere il target desiderato, a parte che in quei casi di fragilità scheletrica associata a carenza di vitamina D, patologie che determinano un malassorbimento delle vitamine liposolubili a livello intestinale, o alterata attivazione delle stesse. L'integrazione potrebbe essere effettuata utilizzando sia D2 che D3 che sono ugualmente efficaci nel determinare un innalzamento dei livelli della vitamina 25-(OH)D⁴⁵. Per quanto riguarda invece la dose massima di vitamina tollerabile nella popolazione pediatrica, sono presenti molti meno studi rispetto agli adulti, ma alcuni dei lavori precedentemente citati^{26,34} mostrano come anche valori alti di vitamina D in supplementazione siano ben tollerati. Andando maggiormente nello specifico, in tutti i casi in cui è consigliata la supplementazione di vitamina D (perché sono presenti fattori di rischio per deficit, al di fuori della carenza fisiologica durante l'allattamento), questa dovrebbe essere effettuata seguendo delle specifiche indicazioni sulla base dell'età, quindi per normalizzare i livelli di 25-(OH)D per un periodo iniziale dovrebbero essere somministrati:

- 1000 UI/die per bambini < 1 mese;
- 1000-5000 UI/die per bambini con età 1-12 mesi;
- >5000 UI/die per bambini >1 anno.

Dopo questo periodo, effettuato un controllo radiologico e laboratoristico è possibile, passare a una terapia di mantenimento di 400 UI/die⁴⁶.

Come detto sopra, per la funzione fisiologica presentata dalla vitamina D, il deficit della stessa è associato a una diminuzione del calcio biodisponibile. Eventuali carenze calciche andrebbero così trattate:

- Nelle forme più gravi di ipocalcemia acuta e tetania possono essere somministrati boli da 10-20 mg/kg in 5-10 minuti di calcio gluconato al 10% e se necessario possono essere ripetuti diversi boli;
- Mantenimento dei livelli di calcio con terapie orali di calcio carbonato o calcio fosfato tribasico. La dose dovrebbe essere di 30-75 mg/kg/die divisi in 3 dosi;
- Potrebbe essere necessario anche il calcitriolo da 20-100 ng/kg/die in 2 o 3 dosi finché il calcio non si normalizzi;
- Il trattamento con calcio non è più necessario quando i livelli di 25-(OH)D e PTH risultino normalizzati con 400 UI/die di supplementazione.

1.4 L'osteoporosi e l'osteopenia in età pediatrica

Compresi quelli che sono i meccanismi fisiologici di regolazione del metabolismo osseo dovremmo chiederci cosa può succedere qualora vi sia un loro malfunzionamento. Secondo il Ministero della Salute l'osteoporosi può essere definita come "una patologia sistemica cronica caratterizzata da una bassa densità minerale (criterio strumentale) e dall'alterazione della microarchitettura dell'osso (criterio istologico) con conseguente aumento della fragilità ossea". Come recentemente osservato questa non è una condizione presente unicamente in età adulta o anziana, ma sono presenti anche casi pediatrici, qualora vi sia una condizione patologica di ordine genetico-metabolica che determini un aumento della fragilità ossea e del rischio di andare incontro a fratture (principalmente vertebrali).

Le metodiche utilizzabili per la diagnosi di osteoporosi in pediatria, che è prevalentemente strumentale oltre che clinica, sono come approfondito sopra la MOC-DXA e i QUS (hanno un rischio minore di radioesposizione rispetto alle altre). I valori DXA che ci consentono di fare diagnosi di osteoporosi sono BMD Z-score ≤ -2 nei distretti studiati. Valori di BMD Z-score tra -1 e -2 sono invece definibili secondo alcuni studiosi come osteopenia, una condizione in cui seppure l'analisi strumentale riporti valori al limite della normalità, tale densità, compresa nel range osteopenico, potrebbe condurre a ottenere un picco di massa ossea inferiore all'ottimale, con la possibilità di sviluppare nella vita adulta un'aumentata probabilità di andare incontro a fratture³². La definizione di osteopenia è però controversa,

nonostante alcuni autori ne diano una definizione specifica, altre fonti come l'ISCD Pediatric Official Position⁹ sconsiglia di utilizzare il termine di osteopenia perché sarebbe poco specifico e troppo contingente all'utilizzo di popolazioni di riferimento diverse.

Non si andrà a riesporre concetti precedentemente affrontati, ma quello che si vuole fare è focalizzare l'attenzione su aspetti pratici del management del paziente con osteoporosi. Lo schema riportato nella pagina seguente riassume la diagnosi e il trattamento del paziente pediatrico con osteoporosi.

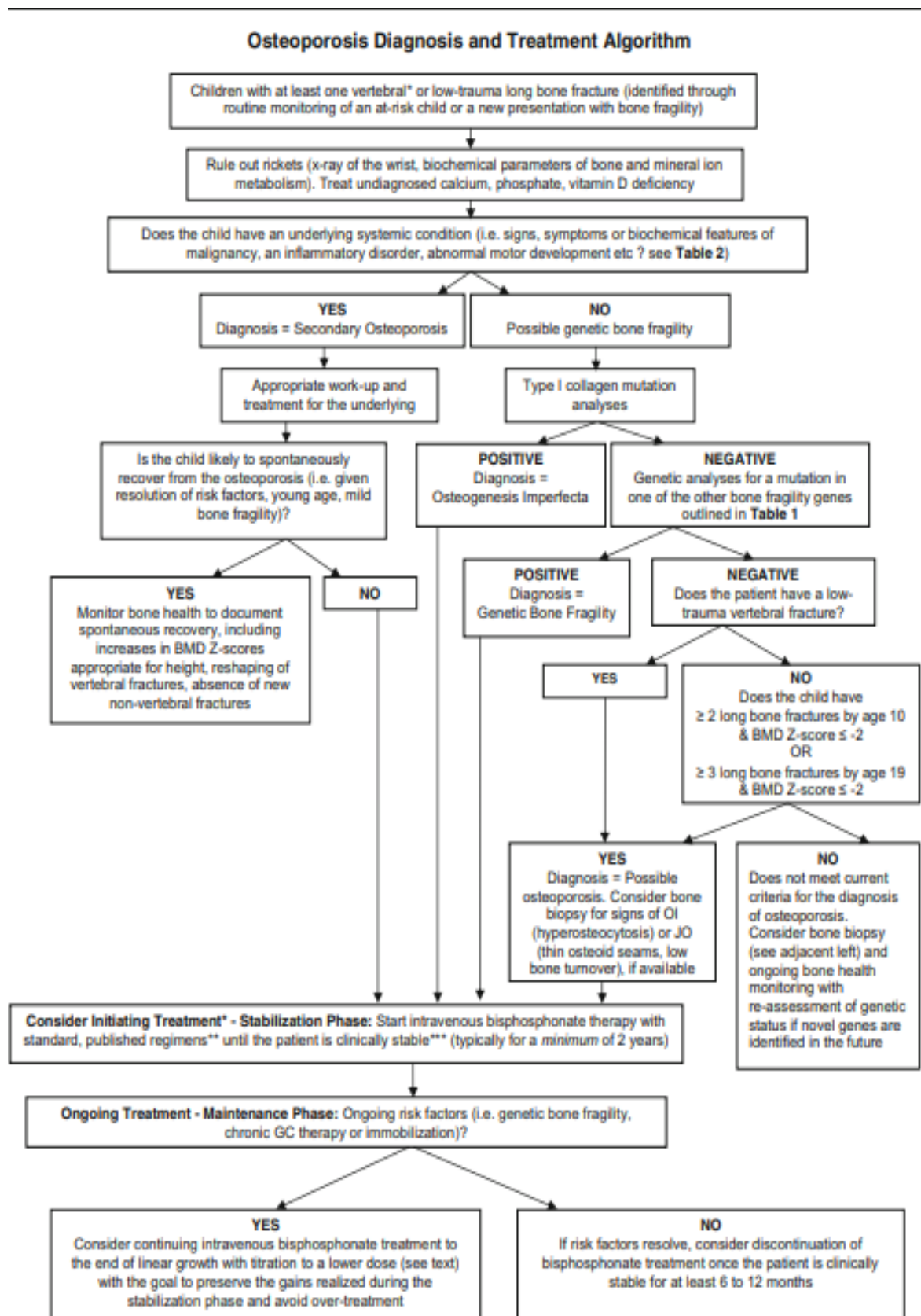


Figura 7 Algoritmo che espone la diagnosi e il trattamento del paziente con fratture associate a osteoporosi. *Adattato da:* Ward, L. M., Konji, V. N., Ma J. Et a. The management of osteoporosis in children. Osteoporosis International, 2016; 27(7), 2147–2179.

Come si può osservare dallo schema l'osteoporosi in età pediatrica si divide in primaria e secondaria. La forma primaria è caratterizzata da mutazioni genetiche che inficiano la formazione della struttura ossea e il prototipo è l'osteogenesi imperfetta, caratterizzata dalla mutazione di regioni specifiche del gene che codifica per il collagene di tipo 1 (mutazioni COL1A1 e COL1A2). Le forme secondarie invece, denotano la presenza di patologie neuromuscolari, endocrine e metaboliche o l'uso di specifiche categorie di farmaci (basti pensare all'artrite idiopatica giovanile che necessita per il suo controllo di dosi anche elevate di corticosteroidi e metotrexate), queste condizioni sono tutte quelle riassunte nella Tabella 2. Qualora non sia possibile identificare il paziente in una delle due categorie viste precedentemente è necessario eseguire una biopsia ossea⁴⁷.

1.4.1 Gestione terapeutica del bambino osteoporotico

Ovviamente la terapia deve sempre seguire l'effettuazione di una diagnosi accurata, una volta individuata la causa dell'osteoporosi si agisce principalmente cercando di trattare la patologia che la determina. Naturalmente si provvede a integrare vitamina D e calcio in situazioni di deficit se il clinico ne stabilisce la necessità, con le modalità e le dosi enunciate nel precedente paragrafo. Ultimamente si è posta anche in luce la possibile funzione dell'attività fisica aerobica moderata che potrebbe essere uno strumento importante soprattutto per quanto riguarda bambini con patologie croniche.

Se questi accorgimenti non dovessero funzionare e i bambini presentassero osteoporosi sintomatica (con dolori ossei che possano limitarne la qualità di vita) o fratture atraumatiche in corrispondenza di vertebre e ossa lunghe, è indicato il trattamento con bifosfonati. Il farmaco attualmente utilizzato nella fase iniziale è il Neridronato, somministrato per via endovenosa, con la dose massima di 1-2 mg/kg/dose per bambini con età superiore a 3 anni (per un massimo di 6 mg/kg/anno). D'altra parte è possibile utilizzare anche l'acido zoledronico (dose massima di 0.1 mg/kg/anno), che è attualmente preferito in clinica per i minori tempi di somministrazione e intervalli tra una somministrazione e l'altra più lunghi. L'uso di bifosfonati per via orale è limitato perché risultano meno efficaci degli altri. Attualmente la strategia terapeutica che si utilizza è quella di effettuare un trattamento continuativo con mantenimento di alte dosi nei primi 2 o 3 anni, per ottenere una condizione di stabilità; per poi continuare con dosi più basse fino al raggiungimento della maturità ossea qualora permangano fattori di rischio (a questo punto, in assenza di controindicazioni si può interrompere la terapia). In assenza di fattori di rischio (come ad esempio l'assunzione di glucocorticoidi o fragilità ossea su base genetica) se la stabilità della condizione valutata con metodiche strumentali è mantenuta per almeno 6 mesi/un anno è

possibile terminare la somministrazione di bifosfonati. Bisogna però sempre prendere in considerazione quelli che sono gli effetti collaterali di una terapia con bifosfonati, che possono presentarsi a breve termine: le tipiche “reazioni di fase acuta” come febbre, malessere, dolore osseo, nausea e vomito dopo 24-72 ore e l'ipocalcemia che può insorgere nei giorni immediatamente successivi (questa condizione va attenzionata e prevista in bambini a rischio di ipocalcemia, effettuando eventualmente un pretrattamento con vitamina D). Gli effetti a lungo termine sono invece caratterizzati da: osteonecrosi della mandibola (molto rara in pediatria) e atipiche fratture subtrocanteriche del femore, che sembrano essere più frequenti e causa di interruzione della terapia. Altre terapie di recente impiego negli adulti, ma ora in studio anche per la popolazione pediatrica sono il Denosumab, anticorpi anti-sclerostina e l'Odanacatib (anticorpo anticatapsina K)⁴⁷.

2 OBIETTIVO DELLO STUDIO

Da un'indagine effettuata in letteratura si evince come siano presenti pochi dati riportati nei pazienti pediatrici sull'utilità della MOC-DXA per lo studio delle patologie genetiche con difetto di mineralizzazione ossea; tale deficit può essere primitivamente riconducibile all'anomalia genetica che è causa della malattia o secondario alle disabilità associate (deficit di alimentazione, ridotta esposizione solare e ipomobilità). Abbiamo quindi voluto approfondire l'uso di tale metodica in alcuni nostri pazienti, scelti sulla base del quadro clinico o laboratoristico, allo scopo di verificarne l'effettiva utilità in qualità di strumento di diagnosi e follow up. Oltre ad includere i risultati della MOC-DXA, sono stati raccolti, i dati biochimici riguardanti le alterazioni fosfo-calciche analizzando con metodiche statistiche la relazione tra i risultati dell'esame e i livelli ematici di vitamina D, PTH, ALP, calcio e fosforo.

In conclusione, si desidera gettare luce su questo argomento anche al fine di poter prevenire e curare precocemente in questi bambini, l'insorgenza di fragilità ossea con conseguente maggiore probabilità nello sviluppo di fratture e aggravamento del quadro clinico complessivo. La scelta dei pazienti non è stata casuale, infatti nella maggior parte dei casi c'è una scarsa attenzione nella pratica clinica al monitoraggio della salute ossea di bambini affetti da patologie rare di natura metabolica e malformativa, che al contrario vengono monitorati per numerosissime altre problematiche associate.

3 MATERIALI E METODI

2.1 Criteri di inclusione nello studio

Per quanto riguarda la selezione del campione sono stati inclusi nello studio tutti i pazienti che presentavano le seguenti caratteristiche:

- Essere in follow up presso l'ambulatorio di Clinica Pediatrica ad indirizzo genetico-metabolico presidio ospedaliero pediatrico "G.Salesi" dell'AOU Ospedali Riuniti di Ancona con ultimo accesso eseguito in un intervallo temporale incluso tra novembre 2017 a gennaio 2020;
- Essere affetti da sindromi malformative o errori congeniti rari del metabolismo con compromissione della mineralizzazione ossea;
- Essere stati sottoposti ad una densitometria ossea e ad esami laboratoristici (Ca^{2+} , P, ALP, vitamina D e PTH) nel periodo immediatamente precedente l'esecuzione dalla MOC-DXA.

Tenuto conto che l'impiego della MOC-DXA in età pediatrica, nel nostro Ospedale è di recente attuazione i pazienti arruolabili in base ai suddetti criteri di inclusione sono 12 bambini dai 6 ai 17 anni, 9 maschi e 3 femmine, affetti dalle seguenti patologie genetiche rare:

- PAZIENTE 1: Neurofibromatosi 1 (maschio, 15 anni)
- PAZIENTE 2: Sindrome di Ehlers-Danlos ipermobile (femmina, 16 anni)
- PAZIENTE 3: Sindrome di Ehlers-Danlos ipermobile (maschio, 12 anni)
- PAZIENTE 4: Sindrome di Ehlers-Danlos cifoscoliotica (maschio, 14 anni)
- PAZIENTE 5: Sindrome di Ehlers-Danlos spondilodisplastica (maschio, 14 anni)
- PAZIENTE 6: Sindrome di Di George (maschio, 15 anni)
- PAZIENTE 7: Mucopolisaccaridosi IIIb (maschio, 17 anni)
- PAZIENTE 8: Acondroplasia (maschio, 15 anni)
- PAZIENTE 9: Pseudoipoparatiroidismo I (maschio, 15 anni)
- PAZIENTE 10: Deficit di ossidazione mitocondriale di acidi grassi (deficit di acetil-CoA deidrogenasi a catena corta), (femmina, 17 anni)
- PAZIENTE 11: Malattia di Gaucher (femmina, 6 anni)
- PAZIENTE 12: Malattia di Gaucher di tipo I (maschio, 10 anni)

Nella fase di selezione dei pazienti sono stati presi in considerazione anche altri due bambini, rispettivamente con sindrome di Di George e Ipofosfatemia X-linked, successivamente esclusi, il primo perché non risultava nei limiti di età stabiliti per poter

essere sottoposto all'esame MOC-DXA, il secondo per non aver ancora eseguito l'esame, pur essendo stato programmato.

2.2 Disegno dello studio

Il nostro studio è di tipo osservazionale retrospettivo. I pazienti sono stati selezionati secondo i criteri di inclusione nell'arco temporale scelto. Di tali pazienti sono state esaminate le cartelle cliniche ed è stato studiato tutto il percorso diagnostico-terapeutico, dalla diagnosi al follow up.

Sono stati estrapolati i risultati dei seguenti esami:

- Mineralometria ossea computerizzata eseguita con metodica DXA. Il macchinario utilizzato per tutti gli esami è stato lo stesso (Lunar Prodigy), in questa maniera è stato possibile eseguire un confronto idoneo per quanto riguarda i risultati;
- Calcemia totale (comprendente la forma legata all'albumina e la forma ionizzata) rilevata su prelievo ematico e valutata con metodica colorimetrica;
- Fosforemia totale rilevata su prelievo ematico e studiata con metodica colorimetrica;
- 25-idrossivitamina D rilevata su prelievo ematico con tecnica CLIA (chemioluminescenza);
- Paratormone intero rilevato su sangue con metodica immunometrica-chemioluminescenza;
- Fosfatasi alcalina totale e laddove diminuita dosaggio dell'isoforma ossea.

Riguardo a questi ultimi esami sono stati considerati nello studio i risultati ottenuti nel periodo di tempo in corrispondenza alla effettuazione dell'esame MOC-DXA cosicché essi potessero essere relazionati con il risultato dell'esame strumentale.

Durante l'analisi della documentazione clinica dei singoli pazienti sono state bene individuate le motivazioni che hanno portato alla decisione di eseguire la MOC. Infatti uno dei principali intenti del nostro studio, è stato quello di approfondire i dati della letteratura sui meccanismi di deficit di mineralizzazione ossea in ciascuna condizione e, in ragione di ciò, sensibilizzare all'uso di tale metodica.

Qui di seguito sono riportate in maniera riassuntiva, la descrizione generale della patologia dei pazienti inclusi nello studio, i meccanismi fisiopatologici che sottendono i danni ossei, lo specifico quadro clinico, il follow up generale e relativo alle alterazioni del metabolismo osseo.

2.3 Paziente 1: Neurofibromatosi 1

2.3.1 Descrizione generale della patologia

La Neurofibromatosi di tipo 1 è una malattia autosomica dominante (o determinata da una mutazione de novo) con una incidenza di circa 1:3000, causata dalla mutazione del gene NF1 codificante per la neurofibromina (situato sul cromosoma 17), proteina di soppressione tumorale inibitrice del metabolismo di Ras. In questa maniera si può avere una alterazione dei segnali che regolano la divisione cellulare. I criteri diagnostici per la caratterizzazione della patologia sono ben strutturati da tempo, risalgono al 1987 e sono stati redatti dal National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Conference. Sono costituiti da criteri clinici ma tengono conto anche della familiarità della condizione, come si può notare dalla tabella sottostante.

Per fare diagnosi di NF1 dovrebbero essere presenti almeno 2 dei criteri sottostanti:

- 1) **6 o più macchie caffelatte** (di dimensioni >0,5 cm in bambini in età prepubere e >1,5 cm in età adulta)
- 2) **2 o più neurofibromi sottocutanei/cutanei oppure 1 o più neurofibromi plessiformi**
- 3) **Lentiginosi ascellare o inguinale**
- 4) **Glioma delle vie ottiche**
- 5) **2 o più noduli di Lisch**
- 6) **Displasia ossea (displasia dell'ala dello sfenoide, incurvamento delle ossa lunghe, con o senza pseudoartrosi)**
- 7) **Presenza di un familiare affetto secondo questi stessi criteri**

Tabella 5 Criteri di diagnosi della NF1 secondo National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Conference.

Le principali caratteristiche, spesso utili per il sospetto di malattia, come si può osservare dalla Tabella 5 sono rappresentate da macchie color caffelatte (riguardano il 90% dei soggetti affetti da NF1), la presenza di 6 o più macchie color caffelatte di dimensioni superiori a 5 mm in un bambino con età prepubere è fortemente indicativo per la patologia), lentiggini ascellari o inguinali e amartomi dell'iride (noduli di Lisch). Le lesioni peculiari della patologia sono però rappresentate dai neurofibromi che sono costituiti da varie combinazioni di cellule di Schwann, fibroblasti, mastociti e cellule vascolari. Questi possono essere localizzati in diverse sedi come ad esempio a livello dermico, sottocutaneo

(neurofibromi plessiformi), a livello viscerale, dei vasi sanguigni o dei nervi periferici. Altri aspetti clinici presentati dal paziente sono costituiti da dolore e astenia, compromissione ossea soprattutto a livello della colonna vertebrale (scoliosi) e della tibia (displasia ossea), anomalie del SNC (astrocitomi cerebrali) che possono dare convulsioni o gliomi del nervo ottico che si manifestano con problemi visivi. Possono inoltre essere presenti disturbi dell'attenzione, dell'apprendimento e alterazioni delle abilità visuo-spaziali. L'aspettativa di vita è sovrapponibile a quella della popolazione generale eccetto che in caso di rara complicanza neoplastica o trasformazione sarcomatosa dei neurofibromi⁴⁸. Nella figura sottostante è riportata la sequenza temporale con cui le manifestazioni cutanee e nervose si presentano in questi pazienti.

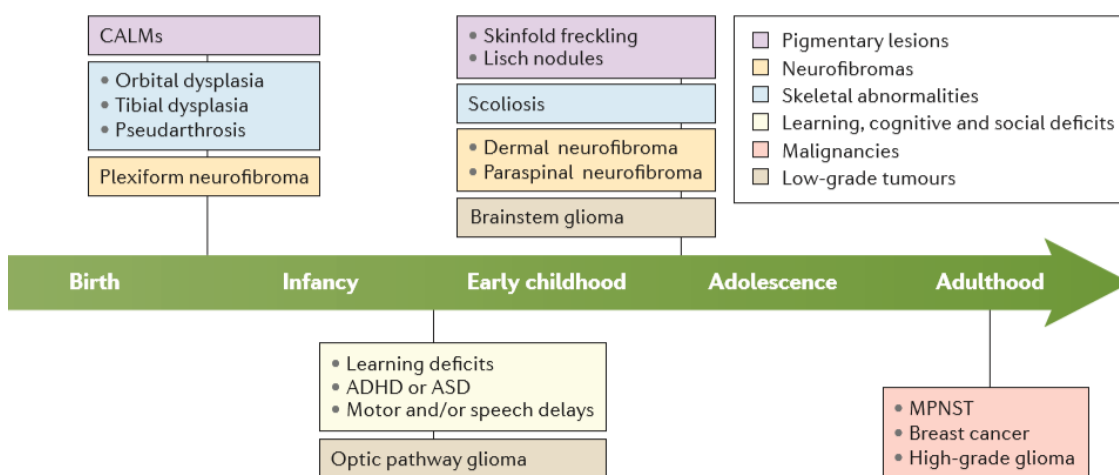


Figura 8 Sviluppo delle varie manifestazioni della Neurofibromatosi di tipo 1. *Adattato da: Gutmann H. D., Ferner E. R., Listerick R. Neurofibromatosis type 1. Nat Rev Dis Primers. 2017, 3:17004.*

2.3.2 Metabolismo osseo e NF1

Quasi il 50% dei pazienti con NF1 presentano deficit a livello della mineralizzazione ossea con cifoscoliosi, deformazione della cassa toracica, pseudoartrosi che determina nel bambino deformità e disabilità crescenti dal punto di vista fisico e sociale. Il meccanismo che determina alterazione dell'ossificazione è ancora per gran parte sconosciuto. La mutazione autosomica dominante che caratterizza la patologia come già detto, prende in considerazione il gene NF1 che codifica per la neurofibromina, proteina ubiquitaria espressa sì dalle cellule del sistema nervoso (cellule di Schwann e oligodendrociti) ma anche da cellule del tessuto osseo come osteoblasti, osteociti, condrociti e osteoclasti. Il ruolo della mutazione della neurofibromina in queste cellule è ancora dibattuto. Un interessantissimo studio eseguito su campioni murini resi Knock-down per il gene ha provato a spiegarne l'azione. Gli autori hanno infatti osservato un abbassamento dei livelli di FGF23 e analizzando le ossa dei campioni esse apparivano essere osteomalaciche e in

particolare la matrice osteoide appariva notevolmente aumentata in corrispondenza dell'osso corticale e trabecolare. Questa alterazione è stata studiata tramite il tempo di mineralizzazione, il volume e lo spessore dell'osteide, facendo intuire il valore della mancata espressione del gene NF1 sulla mineralizzazione dell'osteide⁴⁹. Oltre all'innalzamento del FGF23 in questi topi KO sono stati osservati anche ipofosfatemia, abbassamento del livello di 1,25 (OH)₂D e innalzamento del PTH. La spiegazione di ciò va ricercata nei meccanismi descritti nell'introduzione. Il FGF23 infatti determina l'inibizione del riassorbimento renale di calcio e della idrossilazione in posizione 1 della 25-(OH)D a livello renale, con conseguente innalzamento dei valori di PTH e riassorbimento osseo. La possibilità che questo sia il meccanismo effettivo di determinazione dell'osteomalacia in questi pazienti è anche dovuta all'associazione con una patologia che è determinata dalla mutazione del gene PHEX presente nel rachitismo ipofosfatemico, anche in questo caso è presente un'elevazione dei livelli circolanti di FGF23 e gli effetti sull'osso sono quelli tipici anche di altre forme di rachitismo. Clinicamente l'osso di queste cavie appare porotico e con la corticale assottigliata e questa potrebbe essere la spiegazione dell'aumento di fragilità ossea osservata.

In ultimo, in questo studio è stato riscontrato anche un innalzamento della quantità di fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) come pathway dominante del determinare l'overespressione di FGF23⁴⁹. PI3K è stato ritrovato essere disregolato in bambini con NF1 e pseudoartrosi della tibia che è un'alterazione molto comune in questa patologia.

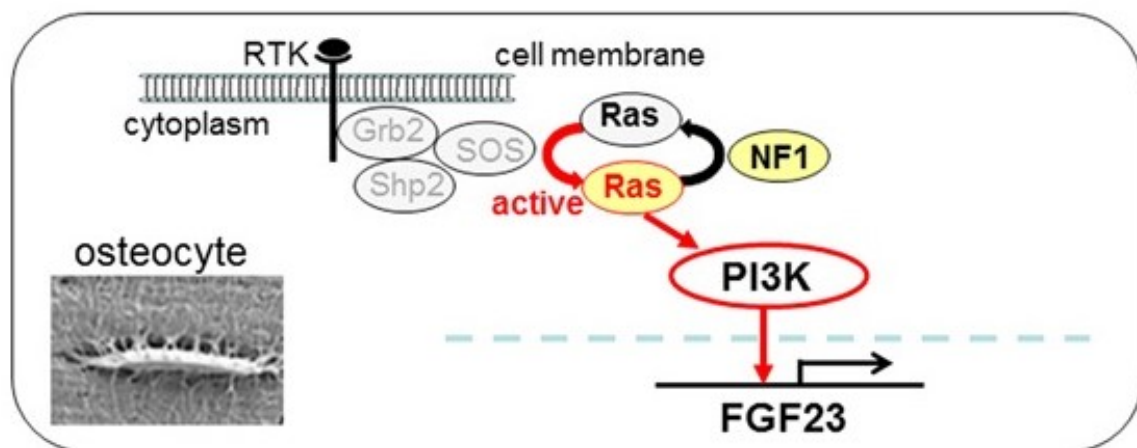


Figura 9 Meccanismo di regolazione del FGF23. Adattato da: Kamiya N, Yamaguchi R, Aruwajoye O. Targeted Disruption of NF1 in Osteocytes Increases FGF23 and Osteoid with Osteomalacia-like Bone Phenotype. *J Bone Miner Res.* 2017; 32(8):1716-1726.

2.3.3 Storia clinica e follow up del paziente 1

Ragazzo di 15 anni, all'anamnesi familiare il paziente riporta nonno, padre e zio affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 (in linea con l'ereditarietà autosomica dominante). La diagnosi di NF1 è stata confermata nel 2005, all'età di un anno quando è stata eseguita l'indagine genetica con rilevazione della mutazione della neurofibromina, in seguito al sospetto di malattia determinato dalla presenza di pseudoartrosi della tibia destra.

Attualmente il paziente presenta alcuni rilievi obiettivi peculiari della patologia quali, macchie cutanee caffè-latte, presenza di noduli di Lisch a livello oculare, presenza di un neurofibroma sottocutaneo a livello addominale e pseudoartrosi della tibia destra con conseguente dismetria degli arti inferiori e scoliosi. Il ragazzo assume vitamina D in seguito al recente riscontro di ipovitaminosi.

Il paziente attualmente è in follow up:

- Dermatologico: per il monitoraggio delle macchie color latte e caffè e del neurofibroma a livello epigastrico;
- Oculistico: per noduli di Lisch ed esame del fundus oculi;
- Ortopedico: per pseudoartrosi della tibia destra e scoliosi destro-convessa.

Motivazione che ha portato all'esecuzione della MOC-DXA: questo esame non rientra nel follow up previsto dalla maggior parte dei PDTA o dalla letteratura per tale patologia. Nonostante ciò in questo caso si è ritenuto di eseguire la MOC-DXA per il riscontro di alterati valori laboratoristici di 25-(OH)D e PTH in un ragazzo con ridotta mobilità dovuta alla pseudoartrosi tibiale. Il risultato dell'esame ha riportato livelli di densità minerale ossea nel range atteso per età.

2.4 Pazienti 2 e 3: Sindrome di Ehlers-Danlos ipermobile

Le sindromi di Ehlers- Danlos sono un gruppo eterogeneo di patologie che riguardano il tessuto connettivo, con coinvolgimento principalmente di cute, articolazioni e apparato cardio-vascolare, ma possibile compromissione anche di altri distretti come quello osseo e oculare.

Le sindromi di Ehlers-Danlos vengono attualmente riportate sulla base della classificazione internazionale aggiornata al 2017, individuando, come possiamo vedere dalla tabella sottostante, 13 sottotipi patologici, in quasi tutti i casi è stata individuata la mutazione determinante.

Tutte queste forme sono caratterizzate in generale dalla triade: iperelasticità che può essere accompagnata a fragilità cutanea, lassità legamentosa e iperfragilità vascolare, anche se ogni forma in virtù del fatto che è caratterizzata dalla mutazione di un gene diverso, può presentare eterogeneità nelle manifestazioni.

TABLE I. Clinical Classification of the Ehlers-Danlos Syndromes, Inheritance Pattern, and Genetic Basis					
	Clinical EDS subtype	Abbreviation	IP	Genetic basis	Protein
1	Classical EDS	cEDS	AD	Major: <i>COL5A1</i> , <i>COL5A1</i> Rare: <i>COL1A1</i> c.934C>T, p.(Arg312Cys)	Type V collagen Type I collagen
2	Classical-like EDS	clEDS	AR	<i>TNXB</i>	Tenascin XB
3	Cardiac-valvular	cvEDS	AR	<i>COL1A2</i> (biallelic mutations that lead to <i>COL1A2</i> NMD and absence of pro $\alpha 2(I)$ collagen chains)	Type I collagen
4	Vascular EDS	vEDS	AD	Major: <i>COL3A1</i> Rare: <i>COL1A1</i> c.934C>T, p.(Arg312Cys) c.1720C>T, p.(Arg574Cys) c.3227C>T, p.(Arg1093Cys)	Type III collagen Type I collagen
5	Hypermobile EDS	hEDS	AD	Unknown	Unknown
6	Arthrochalasia EDS	aEDS	AD	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i>	Type I collagen
7	Dermatosparaxis EDS	dEDS	AR	<i>ADAMTS2</i>	ADAMTS-2
8	Kyphoscoliotic EDS	kEDS	AR	<i>PLOD1</i> <i>FKBP14</i>	LH1 FKBP22
9	Brittle Cornea syndrome	BCS	AR	<i>ZNF469</i> <i>PRDM5</i>	ZNF469 PRDM5
10	Spondylodysplastic EDS	spEDS	AR	<i>B4GALT7</i> <i>B3GALT6</i> <i>SLC39A13</i>	$\beta 4$ GalT7 $\beta 3$ GalT6 ZIP13
11	Musculocontractural EDS	mcEDS	AR	<i>CHST14</i> <i>DSE</i>	D4ST1 DSE
12	Myopathic EDS	mEDS	AD or AR	<i>COL12A1</i>	Type XII collagen
13	Periodontal EDS	pEDS	AD	<i>C1R</i> <i>C1S</i>	C1r C1s

IP; inheritance pattern; AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive, NMD, nonsense-mediated mRNA decay.

Tabella 6 Classificazione clinica delle Sindromi di Ehlers-Danlos. *Adattato da: Malfait F, Francomano C, Byers P, et al. The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2017;175(1):8-26.*

2.4.1 Descrizione generale della sindrome di Ehlers-Danlos ipermobile

La sindrome di Ehlers-Danlos ipermobile rappresenta il 90 % delle sindromi di Ehlers-Danlos che hanno una prevalenza complessiva di 1/5000. Questa patologia si configura come un disordine a ereditarietà autosomica dominante (è possibile che il genitore risulti affetto o che si tratti di una prima mutazione). Non esiste una diagnosi genetica ma solo clinica, diversi studi però hanno ipotizzato mutazioni eterogenee quali un probabile

coinvolgimento del gene della tenascina X, una proteina della matrice extracellulare. Tra le manifestazioni più frequenti vi è l'ipermobilità articolare che viene diagnosticata con lo score di Beighton (vedi Tab. 5), lo score per essere indicativo di ipermobilità dovrebbe risultare con un punteggio maggiore di 6 nei bambini in età prepubere e di 5 dai bambini in età post-puberale fino a 50 anni, mentre se il soggetto ha più di 50 anni è sufficiente uno score di 4. La cute si può presentare come iperestensibile, eccessivamente lassa, fragile e ridondante con la presenza di strie atrofiche. Si può presentare inoltre affaticamento per le attività quotidiane e dolore acuto e cronico spesso causa di disabilità, oltre che dilatazione della radice aortica, prolasso della valvola mitrale, ernie multiple addominali, sintomi gastrointestinali, ipotensione ortostatica, cefalea⁵⁰.

Manovra	Sinistra (punti)	Destra (punti)
Iperestensione del gomito >10°	1	1
Iperestensione del ginocchio >10°	1	1
Dorsiflessione passiva dell'articolazione metacarpo-falangea ≥ 90°	1	1
Opposizione del pollice fino alla parte volare dell'avambraccio	1	1
Appoggio di tutta la superficie della mano a terra senza piegare le ginocchia	1	
Punteggio totale: massimo 9 punti		

Tabella 7 Criteri di Beighton per la definizione di ipermobilità articolare.

Non essendo presente la possibilità di eseguire una diagnosi molecolare (dato che la mutazione non è stata ancora individuata) attualmente si fa diagnosi clinica, in particolare secondo i nuovi criteri risalenti a fine 2017:

- 1) Presenza di ipermobilità articolare generalizzata (Beighton Score);
- 2) Due o più delle seguenti caratteristiche presenti:
 - Criterio A: manifestazioni sistemiche o disordini del tessuto connettivo generalizzati (almeno 5 su 12 di essi riportati in un elenco ben dettagliato)⁵⁰;
 - Criterio B: storia familiare positiva, uno o più familiari di primo grado affetti dalla patologia;
 - Criterio C: complicanze muscoloscheletriche: almeno una delle tre riportate nella lista dei disordini muscoloscheletrici⁵⁰.
- 3) Tutte le seguenti caratteristiche devono essere presenti: assenza di fragilità cutanea associata ad altre condizioni patologiche, esclusione di altre malattie ereditarie del

tessuto connettivo e patologie reumatologiche autoimmuni, esclusione di altre malattie che comportano ipermobilità articolare come ipotonia e lassità del tessuto connettivo.

2.4.2 Metabolismo osseo e sindrome di Ehlers-Danlos ipermobile

La sindrome di Ehlers-Danlos di tipo ipermobile è caratterizzata come accennato sopra, da iperlassità legamentosa, disordini sistemici e complicanze muscolo-scheletriche. Oltre a questi tipici segni conosciuti da tempo, ultimamente sono state descritte alterazioni a livello scheletrico quali una aumentata fragilità per perdita di massa ossea, questa sarebbe causata dalla mutazione di geni implicati nell'eziopatogenesi della malattia. Tra questi è stato identificato SLC39A1 codificante per un trasportatore dello zinco, molto espresso all'interno degli osteoblasti (ha la funzione di regolarne la maturazione) e modelli murini KO per questo gene hanno riportato perdita di tono calcico sull'osso al livello trabecolare e corticale⁵¹. Un altro gene implicato sarebbe PRDM5 che codifica per una proteina del collagene di tipo 1, molecola fondamentale per la costituzione della matrice extracellulare su cui si organizzano i meccanismi di mineralizzazione.

Come causa di alterazione in questo gruppo di pazienti ci sarebbe anche la perdita di rigidità tendinea e ciò porterebbe alla mancata trasmissione della forza meccanica al livello osseo che è fondamentale per la strutturazione delle specifiche caratteristiche ossee di forza e robustezza. Diversi studi, caratterizzati da pazienti che presentavano sindrome di Ehlers-Danlos di diversi sottotipi (e questo potrebbe risultare un fattore confondente se si vuole studiare specificatamente il sottotipo ipermobile) hanno mostrato come questi pazienti presentino alterazioni della densità ossea rilevata con MOC-DXA⁵². Mentre altri studi, tra cui il più autorevole comprendente una popolazione pediatrica di 205 bambini con sindrome di Ehlers-Danlos hanno mostrato come il 19 % di questi abbiano una storia di fratture traumatiche e da stress⁵³.

Quindi anche se bassi livelli di densità minerale ossea sono stati prevalentemente riscontrati in determinati sottotipi di sindrome di Ehlers-Danlos come per esempio l'artrocalasia, la forma cifoscoliotica, la spondilodisplastica e la forma classica, un accurato studio densitometrico risulterebbe utile anche in questo caso. In aggiunta ad esso, nel sottotipo cifoscoliotico occorre prevedere uno studio radiologico seriato della colonna per il monitoraggio della presenza di alterazioni del profilo vertebrale e il rischio di fratture⁵⁴.

2.4.3 Storia clinica e follow up del paziente 2

Ragazza di 16 anni, all' anamnesi familiare risulta la madre affetta da Parkinson giovanile con lieve iperlassità legamentosa. Il fratello di 8 anni ha presentato invece ritardo psicomotorio nei primi anni di vita con successivo recupero, distress respiratorio alla nascita e plagiocefalia severa corretta mediante protesi.

La paziente è nata a 38 sg dopo gravidanza caratterizzata da gestosi gravidica. Decorso neonatale e sviluppo psico-motorio nella norma. La bambina sin dalla prima infanzia ha presentato una marcata lassità legamentosa. Successivamente si sono evidenziate frequenti sublussazioni rotulee ma anche al livello della spalla e delle articolazioni metacarpo-falangee, stanchezza muscolare per minimi sforzi, rottura spontanea di piccoli vasi al palmo delle mani e alle dita, incoordinazione della deglutizione con frequente blocco dell'articolazione mandibolo-temporale, alterazioni della motilità oculare e diplopia, episodi di cefalea e di reflusso gastro-esofageo, per cui la diagnosi è stata sospettata, sulla base dei dati clinici. Altre alterazioni presenti sono: formazione cistica del rene destro in posizione polare inferiore, a livello encefalico cisti nel corno posteriore del ventricolo laterale destro.

È stata eseguita una NGS (Next Generation Sequencing) per il pannello dei geni relativo alle patologie del collagene che ha evidenziato una mutazione di COL4A1 presentata anche dal padre, ma non causativa del quadro clinico.

La paziente attualmente è in follow up:

- Ortopedico: per la presenza di iperlassità legamentosa con piattismo del piede, lussazione della rotula sinistra, frequenti lussazioni di spalla e delle articolazioni metacarpo falangee, scoliosi, stanchezza muscolare per minimi sforzi, episodi di blocco dell'articolazione mandibolo- temporale;
- Cardiologico: per minimo reflusso transvalvolare mitralico ed episodi di cardiopalmo;
- Nefrologico: per il monitoraggio della cisti renale destra;
- Neurologico: per la presenza di cefalea intensa;
- Oculistico: per diplopia e per le possibili complicanze oculistiche.

Motivazione che ha portato all'esecuzione della MOC-DXA: In questo caso la MOC-DXA è stata eseguita dato l'alto sospetto clinico di deficit di mineralizzazione ossea, anche in relazione all'esame di RMN eseguito al ginocchio sinistro per l'approfondimento della sublussazione rotulea, che mostrava un'alterazione osteostrutturale a livello della metafisi distale femorale, non riferibile a esiti di natura traumatica. In ogni caso la sindrome di Ehlers-Danlos rientra tra le malattie genetiche che necessitano di un approfondimento dello stato

di mineralizzazione ossea, citata anche nella Tabella 2 (indicazioni all'esecuzione della MOC-DXA). Alla MOC-DXA è risultato un valore di BMD nel range atteso per età.

2.4.4 Storia clinica e follow up del paziente 3

Ragazzo di 12 anni, all'anamnesi familiare presenta un nonno paterno con iperlassità legamentosa e problemi cardiaci non ben specificati. Il padre presenta iperlassità legamentosa, valgismo a livello dei piedi, dolori al ginocchio destro e ai polsi. Inoltre vengono riportate distorsioni al ginocchio destro e presenza di vene varicose per cui è stato sottoposto ad intervento.

Il paziente è nato da parto eutocico, con periodo neonatale normodecorso. All'età di 15 mesi, quando ha iniziato a deambulare si è manifestata per la prima volta iperlassità legamentosa. Ha presentato anche un ritardo del linguaggio per problemi nella pronuncia. Per questo ha richiesto psicomotricità e sedute logopediche dai 3 agli 8 anni. Nel 2014, all'età di 6 anni è stato sottoposto presso l'ospedale "Bambin Gesù" di Roma, ad uno screening dei collagene prodotti dai fibroblasti cutanei in vitro, che ha evidenziato anomalie del collagene, ma non ha confermato la diagnosi di sindrome di Ehlers-Danlos né di tipo classico, né di tipo vascolare. Tuttavia sulla base dei dati clinici, nel 2018 presso l'ambulatorio della Clinica Pediatrica ad indirizzo genetico dell'ospedale "G. Salesi" viene formulata la diagnosi di sindrome di Ehlers-Danlos di tipo ipermobile. Nel 2019 viene anche studiato il pannello genetico per le varianti patogenetiche della sindrome di Ehlers-Danlos, senza il riscontro di una mutazione specifica, ciò non esclude la diagnosi in quanto per la sindrome di Ehlers-Danlos ipermobile non sono stati ancora identificati i geni caratterizzanti.

Attualmente il paziente presenta iperlassità legamentosa ed ipotonia diffusa (per cui sta eseguendo attività fisica dedicata con esercizi propriocettivi), rotoscoliosi lombare destro-convessa, cute iperelastica e piede piatto bilaterale di 4° grado, (per cui sta facendo uso di plantare correttivo). Sono inoltre presenti facile faticabilità, dolori periarticolari e muscolari diffusi, miopia, insufficienza tricuspide lieve, episodi di blocco dell'articolazione temporo-mandibolare di destra.

Il paziente attualmente è in follow up:

- Ortopedico: per scoliosi lombare destro-convessa e piede piatto bilaterale;
- Fisiatrico: per la presenza di iperlassità legamentosa, ipotonia e dolori muscolari diffusi attualmente in trattamento con un programma riabilitativo specifico;
- Cardiologico: per insufficienza tricuspide lieve;

- Oculistico: per la presenza di miopia, ma soprattutto per il rischio di sublussazione del cristallino;
- Odontoiatrico: per gli episodi di blocco a livello dell'articolazione temporo-mandibolare destra;
- Allergologico: per la presenza di rinite allergica e prurito oculare, soprattutto in primavera.

Motivazione che ha portato all'esecuzione della MOC-DXA: in questo caso il paziente è stato sottoposto all'approfondimento con MOC-DXA per la valutazione dello stato della mineralizzazione ossea in quanto i pazienti con sindrome di Ehlers-Danlos ipermobile come specificato in letteratura, possono presentare perdita del tono calcico. In questo caso dato che il BMD Z-score è risultato conforme al range atteso per età è stato indicato di ripetere l'esame dopo 3-4 anni.

2.5 Paziente 4: Sindrome di Ehlers-Danlos cifoscoliotica

2.5.1 Descrizione generale della patologia

La sindrome di Ehlers-Danlos di tipo cifoscoliotico è una forma molto rara la cui prevalenza è di 1:100.000 nati vivi; in passato era chiamata anche di tipo 6 o oculo-scoliotico. Come caratteristiche cliniche presenta, oltre all'iperlassità articolare generalizzata, alla fragilità cutanea e all'ipotonia muscolare, che è presente anche in altre forme, alcuni segni clinici più specifici della malattia come la scoliosi congenita progressiva, un habitus marfanoide e in alcuni casi si può riscontrare anche fragilità dei bulbi oculari. Possono inoltre essere presenti anche malformazioni aortiche come la dilatazione o la dissezione aortica che sono le complicanze che maggiormente possono mettere a rischio la vita del paziente.

Questa patologia ha un'eziologia genetica, la mutazione del gene PLOD1 che codifica per la lisil-ossidasi che svolge il ruolo di modifica post-traduzionale delle procatene α del collagene. Questo gene mappa a livello del cromosoma 1, la mutazione è trasmessa con ereditarietà autosomica recessiva ma potrebbe anche trattarsi di una mutazione de novo. La diagnosi può essere sospettata sulla base della clinica; in particolare dovrebbero essere presenti 3 criteri maggiori: ipotonia congenita muscolare, cifoscoliosi congenita, iperlassità articolare (con sublussazione/dislocazione del ginocchio e della spalla). Oltre a questi, sono presenti dieci criteri minori, la diagnosi può essere effettuata se sono presenti due criteri maggiori e almeno tre criteri minori o tutti i criteri maggiori. Per la diagnosi finale deve essere fatto il test genetico con la ricerca della mutazione. La maggior parte dei pazienti sono

caratterizzati da mutazione biallelica del gene PLOD1 anche se recentemente, mutazioni bialleliche sono state identificate anche su FKBP14 in pazienti che hanno un fenotipo molto simile alle forme PLOD1 mutate. L'assenza della mutazione non esclude la presenza della patologia e questo è dovuto al fatto che esisterebbero altri geni che, se mutati, potrebbero determinare questo sottotipo della sindrome di Ehlers-Danlos. Esistono dei test genomici che includono un panel di geni diversi a seconda del laboratorio e del medico che fa la richiesta. Possono essere effettuate inoltre delle conferme con le analisi di laboratorio con cromatografia sulle urine per valutare il rapporto tra le lisil-piridinole e idrossilisil-piridinoline. Questo rapporto di solito è di circa 0,2, mentre appare aumentato (fino a 6) nella sindrome di Ehlers-Danlos cifoscoliotica PLOD1 mutata⁵⁵.

2.5.2 Metabolismo osseo e sindrome di Ehlers-Danlos cifoscoliotica

Mentre per altre forme della sindrome di Ehlers-Danlos il meccanismo che porta ad un deficit nella mineralizzazione ossea è più conosciuto, in questo caso i meccanismi eziopatogenetici sono meno noti. Nonostante ciò uno studio ha riportato un aumento delle fratture nel 23 % dei soggetti in un campione di 23 pazienti con sindrome di Ehlers-Danlos cifoscoliotica associata a mutazione di FKBP14, ma anche le forme associate a mutazione di PLOD1 sono caratterizzate da alterazioni della mineralizzazione ossea. Sebbene i meccanismi non siano ancora noti, la mancanza di funzionalità del gene LH1 determina una diminuita idrossilazione dei residui di lisina e diminuzione nella glicosilazione dei residui di idrossilisina che porta ad una alterazione della formazione dei cross-link nella molecola di collagene α , con conseguente instabilità strutturale non solo a livello cutaneo e vascolare ma anche a livello osseo (alterata mineralizzazione ossea). Proprio per le ragioni spiegate sopra, in un recentissimo studio è stato dimostrato come sia importante, in virtù del rischio che questi pazienti hanno di andare incontro a osteopenia e osteoporosi, un adeguato follow up con MOC-DXA e radiografia spinale. La figura sottostante riporta la prevalenza di fratture, di osteopenia e osteoporosi in tutti i sottotipi di sindrome di Ehlers-Danlos individuati dalla Classificazione Internazionale del 2017, facendo anche luce su quello che è il follow up che dovrebbe essere attuato⁵⁶.

Table 2 EDS type according to the 2017 International Classification and associated information on fractures and BMD					
EDS subtype	IP	Gene (protein)	Fracture present	Low BMD	Recommended bone assessments at diagnosis
Classical ^{&*}	AD	Major ^{&} : <i>COL5A1</i> , <i>COL5A1</i> (collagen type V) Rare [*] : <i>COL1A1</i> (collagen type I) c.934C>T, p.Arg312Cys			No specific recommendations BMD
Classical-like [*]	AR	<i>TNXB</i> (tenascin XB)			No specific recommendations
Cardiac-valvular [*]	AR	<i>COL1A2</i> (bi-allelic mutations that lead to absence of pro α2(I) collagen chains)		+	BMD
Vascular [8]	AD	Major: <i>COL3A1</i> (collagen type III) Rare: <i>COL1A1</i> (collagen type I) c.934C>T, p.Arg312Cys, c.1720C>T, p.Arg574Cys, c.3227C>T, p.Arg1093Cys			No specific recommendations
Hypermobile	AD	Unknown			
Arthrochalasia [*]	AD	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i> (collagen type I)	+		BMD + skeletal survey
Dermatosparaxis [*]	AR	<i>ADAMTS2</i> (ADAMTS2)	++	+	No specific recommendations
Kyphoscoliotic [*]	AR	<i>PLOD1</i> (LH1) <i>FKBP14</i> (FKBP22)	+	+++	BMD + spine X-rays
Brittle cornea syndrome [*]	AR	<i>ZNF469</i> (ZNF469); <i>PRDM5</i> (PRDM5)	+	+	No specific recommendations
Spondylodysplastic [*]	AR	<i>B4GALT7</i> (B4GALT7) <i>B3GALT6</i> (B3GALT6) <i>SLC39A13</i> (ZIP13)	+	+++	BMD + skeletal survey
Musculocontractural [*]	AR	<i>CHST14</i> (D4ST1); <i>DSE</i> (DSE)		+	BMD + skeletal survey
Myopathic [*]	AD/AR	<i>COL12A1</i> (collagen type XII)			No specific recommendations
Periodontal [*]	AD	<i>C1R</i> (C1R); <i>C1S</i> (C1S)			No specific recommendations

Tabella 8 Classificazione di EDS e associazione con presenza di fratture e BMD. *Adattato da: Basalom, S., & Rauch, F. Bone Disease in Patients with Ehlers–Danlos Syndromes, 2020. Current Osteoporosis*

2.5.3 Storia clinica e follow up del paziente 4

Ragazzo di 14 anni, nato in India, è stato adottato, per cui è in Italia dal 2011. Anamnesi familiare non pervenuta.

Dato il riscontro clinico di marcata iperlassità legamentosa, fragilità cutanea ed ipotonia generalizzata il paziente esegue nel 2013 una biopsia cutanea con riscontro di disomogeneità delle fibre collagene. Lo screening dei collagene prodotti da fibroblasti cutanei in vitro non ha confermato la diagnosi di sindrome di Ehlers-Danlos né di tipo Classico né di tipo Vascolare. Nel 2014 il rapporto delle piridinoline urinarie (desossipiridinoline/piridinoline) appare più alto rispetto alla normalità se rapportato all'età (il valore è di 8,8) e questo suggerisce una possibile diagnosi di sindrome di Ehlers-Danlos di tipo cifoscoliotico, confermata successivamente mediante il test molecolare che ha riscontrato una mutazione sull'esone 19 del gene *PLOD1*. Il paziente presenta iperlassità e lieve fragilità cutanea, iperlassità legamentosa, affaticamento intenso, dolori periarticolari, muscolari, aggravati dal movimento, scoliosi sinistro-convessa ad ampio raggio e cifosi. In seguito a ciò, il paziente ha un deficit ventilatorio di tipo restrittivo di grado moderato. Negli anni il quadro si è complicato con la comparsa di lussazioni e sublussazioni recidivanti, con

la rottura spontanea dell'arteria poplitea sinistra (trattata con posizionamento di plug e fasciotomia della gamba sinistra) e con la tachicardia posturale ortostatica (sintomo frequentemente riscontrato nei pazienti con sindrome di Ehlers-Danlos). Da segnalare che il bambino presenta anche ipoplasia del rene sinistro. In seguito al riscontro di ipovitaminosi D il paziente è al momento in terapia sostitutiva.

Il paziente è attualmente in follow up:

- Dermatologico: per le lesioni cutanee;
- Ortopedico: per ipotonia muscolare, iperlassità legamentosa e alterazione cifo-scoliotica al livello del rachide;
- Fisiatrico: per deficit stenico e iperlassità legamentosa per cui sta conducendo una terapia riabilitativa;
- Cardiologico: per episodi di presincope nel passaggio da clino a ortostatismo e malformazione del bulbo aortico;
- Vascolare: per follow up del trattamento della ricostruzione con plug dell'arteria poplitea sinistra;
- Respiratorio: per effettuazione di spirometria per deficit restrittivo;
- Nefrologico: per la valutazione della funzionalità renale a causa della presenza di rene sinistro ipoplasico.

Motivazione che ha portato all'esecuzione della MOC-DXA: il paziente in questo caso è stato sottoposto a MOC-DXA in seguito ad un precedente riscontro di ipovitaminosi D (legato anche al colore brunastro della pelle) in trattamento con vitamina D. L'esito dell'esame MOC-DXA ha riportato la presenza di BMD nel range di riferimento per sesso, età ed etnia.

2.5 Paziente 5: Sindrome di Ehlers-Danlos spondilodisplastica

2.5.1 Descrizione generale della patologia

Precedentemente classificata come Sindrome di Ehlers-Danlos Progeroide di tipo 2, attualmente viene chiamata spondilodisplastica sulla base dell'ultima classificazione risalente al 2017. E' una forma particolarmente rara (prevalenza 1:1.000.000) ed è a trasmissione autosomica recessiva, determinata dalla mutazione del gene B4GALT7 che mappa sul cromosoma 5 e che codifica per il proteodermatan-solfato che è una proteina della matrice extracellulare. Le mutazioni possono riguardare anche altri geni come B3GALT6 (codifica per una proteina che costituisce il tessuto connettivo) e SLC39A13 (un

trasportatore transmembrana dello zinco); sulla base del tipo di mutazione le manifestazioni potrebbero essere in parte diverse. Il soggetto ha un fenotipo peculiare caratterizzato da viso piatto e di forma triangolare, occhi distanziati, proptosi, labbra sottili, impianto basso delle orecchie, capelli radi, problemi di dentizione. La cute è iperestensibile e delicata, c'è marcata ipermobilità articolare, problemi oculari come fragilità del bulbo oculare. Il paziente affetto può presentare anche bassa statura ed ipotonia muscolare. Dal punto di vista osseo possono essere presenti sinostosi radio-ulnare, cifoscoliosi, sublussazione della testa del radio ma anche osteopenia. La diagnosi della patologia può essere sospettata sulla base di criteri clinici, suddivisi in criteri maggiori e minori, in particolare i criteri maggiori sono caratterizzati da: bassa statura, ipotonia muscolare e presenza di ossa lunghe degli arti recurvate. I criteri minori sono invece costituiti da: iperestensibilità della cute (che si presenta come delicata, pastosa e traslucida), piedi piatti, ritardo nello sviluppo motorio, osteopenia, ritardo cognitivo. La presenza di almeno due criteri maggiori e tre criteri minori suggeriscono la diagnosi di sindrome di Ehlers-Danlos di tipo spondilodisplastico. Esistono inoltre dei criteri minori specifici per tipologia di gene mutato. La conferma diagnostica andrebbe sempre eseguita con la ricerca delle mutazioni genetiche caratterizzanti⁵⁷.

2.5.2 Metabolismo osseo e sindrome di Ehlers-Danlos spondilodisplastica

Come precedentemente scritto questo sottotipo patologico è quello che maggiormente è stato associato a fragilità ossea e la causa è correlata alla mutazione del gene che determina il fenotipo patologico. In questo caso infatti, il gene mutato è prevalentemente B4GALT7 che codifica per la proteina galattosiltrasferasi 1. Il quadro clinico è caratterizzato da displasia degli spondili, lassità articolare, ipermetropia, bassa statura ma anche alterazioni nella mineralizzazione ossea. Esistono diverse tipologie di mutazione del gene che comprendono alterazioni nucleotidiche all'estremità carbossiterminale proteica, sito catalitico della proteina

L'effetto diretto della mutazione in omozigosi di B4GALT7 è la diminuzione della glicosilazione della decorina, proteina che prende parte alla costituzione del GAG fondamentale per assemblare la matrice extracellulare. Il glicosaminoglicano ha una funzione importantissima nell'organizzazione del reticolo delle fibre collagene (fibrillazione), guida l'organizzazione cellulare e la deposizione di idrossiapatite. In pazienti con la mutazione anche le fibre elastiche sono alterate. Possono verificarsi inoltre aumenti compensatori di enzimi che si occupano della formazione di condroitinsolfato e di altre molecole linker per arginare la perdita delle catene GAG⁵⁹⁻⁶⁰.

La forma caratterizzata dalla mutazione di p.Leu41Pro invece è inerente al dominio transmembrana che influenza la localizzazione della proteina in corrispondenza della membrana di Golgi. Si ha una diminuzione della formazione dell'isoforma fenotipicamente attiva della proteina con impossibilità da parte dei fibroblasti nella formazione del GAG (glicosaminoglicano), fondamentale componente della matrice extracellulare di tendini, capsule articolari, cartilagine e osso. Naturalmente a seconda del tipo di mutazione l'attività dell'enzima può essere compromessa in parte o del tutto. Una recente review ha raccolto le principali mutazioni che sono state correlate con le caratteristiche fenotipiche della patologia (vedi Tabella 8).

2.5.3 Storia clinica e follow up del paziente 5

Ragazzo di 14 anni, all'anamnesi familiare sono riportate coxiti nella linea paterna e displasia dell'anca nella nonna e nelle zie materne. Il paziente è nato a 38 settimane di gestazione da taglio cesareo per ipertensione arteriosa materna, dopo una gravidanza caratterizzata da rilievo di idronefrosi fetale sinistra. Alla nascita riscontro di cardiopatia congenita e malformazioni multiple tra cui macrocrania e camptodattilia, iperlassità legamentosa e cutanea, displasia bilaterale delle anche, più accentuata a sinistra e rene sinistro di aspetto atrofico con idro-ureteronefrosi.

Le analisi per la definizione della patologia sono iniziate nel 2006, quando è stata esclusa con indagine genetica la sindrome di Beals. Dopo l'esecuzione di una biopsia muscolare e di un array-CGH che non sono risultati informativi, il paziente viene sottoposto a SNP-array per sospetta sindrome di Larsen, ma l'analisi non conferma il sospetto diagnostico. Al test dei collagene prodotti dai fibroblasti in provetta (indagine eseguita nel 2013), risulta una diminuzione della produzione del collagene di tipo 1, cui fa seguito l'analisi delle piridinoline urinarie per l'esclusione della Sindrome di Ehlers-Danlos di tipo cifoscoliotico; nel 2016 viene eseguito un "whole exon sequencing" a Losanna, che identifica una mutazione in omozigosi in corrispondenza dell'esone 1 del gene B3GALT6, specifica per la sindrome di Ehlers-Danlos di tipo spondilodisplastico.

Attualmente il paziente presenta iperlassità severa di capsule e legamenti, ipotrofia e ipotonìa muscolare grave generalizzata, difficoltà alla deambulazione, scoliosi, cifosi dorsale e ridotta lordosi lombare. Inoltre presenta un'uropatia malformativa, lieve insufficienza mitralica e polmonare, compromissione delle funzioni cognitive, prevalentemente legate alla stanchezza cronica e alla marcata iperlassità legamentosa alle mani che non gli permette di scrivere con facilità, sono presenti inoltre disturbi del linguaggio ed emotivo-relazionali. Il paziente ha frequentato la seconda media con sostegno scolastico

con buon profitto, riferisce deficit di concentrazione. Fa attualmente fa uso di scarpe correttive ma non riesce a deambulare correttamente; effettua attività motoria in acqua per rinforzare la muscolatura. Il paziente sta eseguendo supplementazione con calcio e vitamina D in seguito al riscontro di ipovitaminosi e per il quadro di alterazione della mineralizzazione ossea riportato alla MOC-DXA.

Il paziente è attualmente in follow up:

- Ortopedico: per le problematiche precedentemente riportate, in particolar modo legate all'iperlassità legamentosa e all'ipotonia generalizzata;
- Cardiologico: per la lieve insufficienza mitralica con ispessimento e ridondanza di entrambi i lembi;
- Neurologico: per compromissione delle funzioni cognitive/neuromotorie e emotivo-relazionali;
- Nefrologico: per la presenza di una uropatia malformativa con frequenti episodi di batteriuria in assenza di rialzo termico.

Motivazione che ha portato all'esecuzione della MOC-DXA: l'esame è stato effettuato per il riscontro di una generalizzata riduzione del tono calcico ad una telespinografia eseguita per monitorare l'evoluzione della cifo-scoliosi, oltre che per il rischio di osteoporosi presente nel sottotipo spondilodisplastico della sindrome di Ehlers-Danlos. In questo caso il quadro riportato è quello di osteoporosi con valori di BMD Z-score al rachide di -2,6; allo scheletro intero di -2 e allo scheletro intero meno la testa di -2,1.

2.6 Paziente 6: Sindrome di Di George

2.6.1 Descrizione generale della patologia

La sindrome di Di George o velo-cardio-facciale ha una prevalenza di 1:3000-1:6000 casi. È una patologia caratterizzata dalla delezione del gene 22q11.2 che può essere a trasmissione autosomica dominante, ma nella maggior parte dei casi si presenta come nuova mutazione. Il gene 22q11.2 comprende 4 regioni costituite da sequenze altamente ripetute, la delezione spesso avviene per la presenza di un crossing over meiotico ineguale. La mutazione però non è omogenea (ad esempio alcuni presentano la delezione TBX1) e questo corrisponde al fatto che i pazienti con sindrome di Di George si possano presentare con un quadro clinico diverso. La delezione determina un alterato sviluppo di tutte le strutture che prendono origine dalla terza e quarta tasca brachiale e dal quarto arco branchiale, con lo sviluppo di anomalie cardiache, timiche e paratiroidi che comportano

cardiomiopatie, deficit immunitari e ipocalcemia soprattutto in età neonatale. Il paziente può quindi presentare a livello dell'apparato cardio-vascolare (in ordine di frequenza): tetralogia di Fallot, atresia polmonare, tronco arterioso, arco aortico interrotto e difetti del setto ventricolare, più rara può essere l'ipoplasia delle arterie polmonari.

I pazienti si presentano inoltre con ipoplasia timica che determina diminuzione dei linfociti T soprattutto CD3+ circolanti, con un'aumentata probabilità di sviluppo di infezioni virali alle alte vie respiratorie; alcuni hanno anche ipogammaglobulinemia e una aumentata predisposizione allo sviluppo di patologie autoimmuni come artrite idiopatica giovanile, malattie ematologiche autoimmuni, porpora trombocitopenica, malattia celiaca. Accompagnata all'ipoplasia timica vi è inoltre quella a livello delle paratiroidi, con conseguente insufficienza nella produzione di paratormone e deficit della regolazione del calcio ematico. I quadri possono essere diversi a seconda che sia presente agenesia o ipoplasia delle paratiroidi e in questo ultimo caso la sintomatologia si manifesta prevalentemente in epoca neonatale con tetania o durante i periodi di stress metabolico (patologia o periodo puberale). Se c'è la completa assenza delle paratiroidi, al paziente dovrebbe essere somministrato continuamente calcio per via orale e vitamina D.

Sono poi frequenti difetti a livello del palato, debolezza muscolare velo-faringea che determina compromissione dell'acquisizione della capacità fonatoria e deglutitoria. Nella maggior parte dei casi sono presenti dismorfismi facciali che si configurano come ipoplasia della regione malare, ptosi, ipertelorismo, epicanto e radice nasale prominente. I genitori possono inoltre riferire rallentamenti nell'acquisizione delle capacità motorie e nello sviluppo intellettuale (il QI medio infatti è di 70) insieme a disordini della sfera comportamentale e disordini neuropsichici, difficoltà nell'apprendimento di livello lieve o medio, spesso associato a difetti visuo-spaziali e difficoltà di attenzione. Altre alterazioni meno frequenti sono: malformazioni dell'apparato gastro-intestinale (atresia esofagea, malattia di Hirshprung, ano imperforato, fistola tracheo-esofagea), a livello renale (displasia renale), alterazioni cerebrali e oculari osservabili alla RMN, infine possono essere presenti alterazioni delle vertebre soprattutto a livello cervicale con emivertebre e vertebre a farfalla⁶¹.

2.6.2 Metabolismo osseo e sindrome di Di George

Le manifestazioni che riguardano la struttura ossea dei pazienti con questa sindrome sono presenti nella maggior parte dei casi, basti pensare che il 60% dei soggetti affetti da sindrome di Di George presentano scoliosi. Altre alterazioni sono: instabilità cervicale, valgismo delle ginocchia e piedi piatti. Un' autorevole revisione della letteratura⁶² ha

individuato le principali alterazioni presentate. Il 95-100% dei pazienti analizzati aveva alterazione della giunzione cranio-cervicale, la più comune è la platibasia con appiattimento della base del cranio con angolo cranico superiore ai soliti 136°. Anche le prime vertebre possono risultare alterate nella morfologia; tra le più comuni malformazioni ci sono l'arco aperto della prima vertebra cervicale e dismorfismo del dente di C2 a forma di simbolo della Nike, oppure ci potrebbe essere una fusione delle prime vertebre. Tutte queste anomalie determinano una restrizione del canale midollare, con possibili problemi neurologici soprattutto da compressione delle radici nervose del plesso brachiale. Per la valutazione di queste alterazioni, in prima istanza è necessaria una radiografia cervicale in flessione-estensione. Ugualmente comuni in questi pazienti sono le alterazioni al livello degli arti superiori e inferiori: piede piatto e dislocazione rotulea nell'arto inferiore, valgismo del gomito, deformità della spalla e polidattilia nell'arto superiore. Queste malformazioni anatomiche potrebbero essere le prime anomalie a condurre i bambini con sindrome di Di George all'attenzione di un ortopedico e in generale all'attenzione di una figura medica che potrebbe ipotizzare la diagnosi. Nella review⁶² non sono riportati nei bambini studiati, deficit di crescita se non in alcuni casi in cui erano presenti alterazioni cardiovascolari. La figura sottostante fa una panoramica delle principali alterazioni ortopediche e degli esami eseguibili per la loro rilevazione.

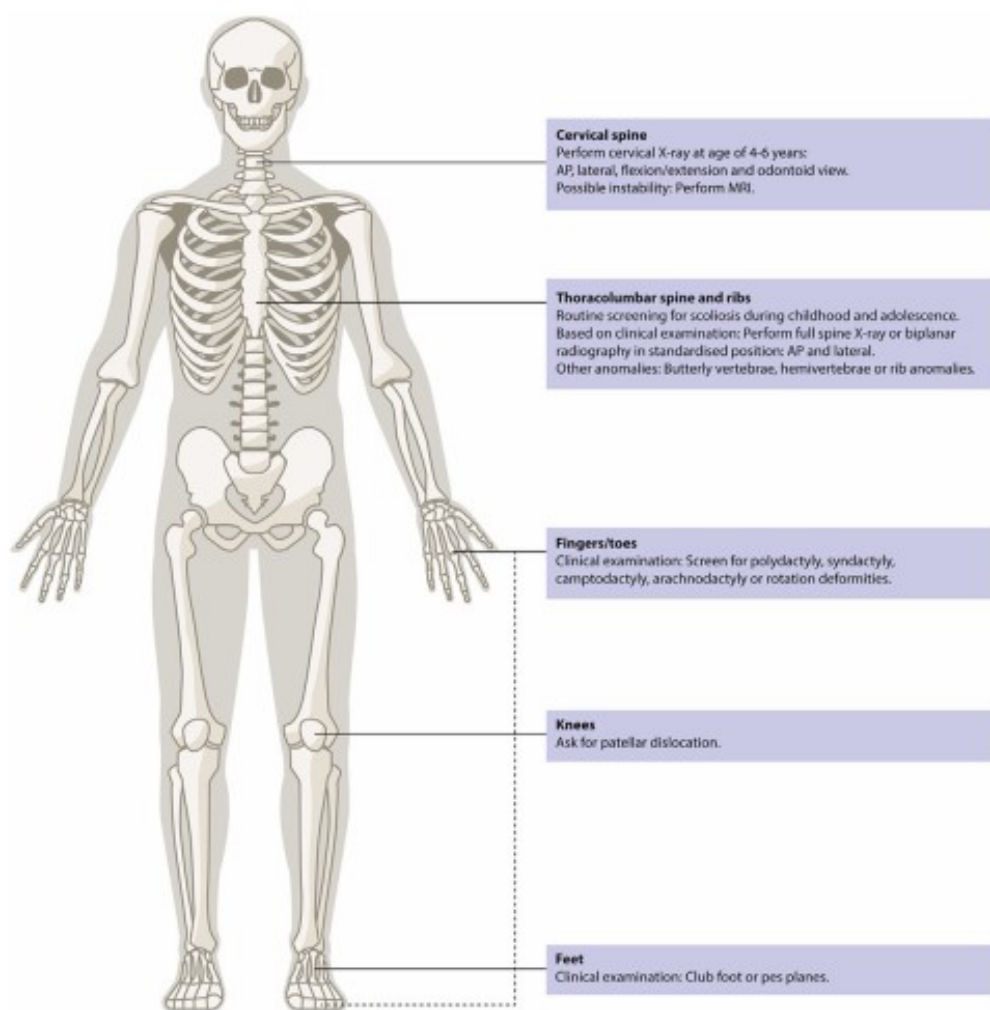


Figura 10 Screening delle deformità ortopediche nel paziente con sindrome di Di George.
Adattato da: Homans JF, Tromp IN, Colo D. Orthopaedic manifestations within the 22q11.2 Deletion syndrome: A systematic review. *Am J Med Genet A*. 2018;176(10):2104-2120.

In letteratura sono stati inoltre rilevati casi di diminuzione della densità minerale ossea alla rilevazione con MOC-DXA. In particolare il gruppo di Ficcadenti et al.⁶³ ha studiato con la densitometria ossea un gruppo di 8 bambini con sindrome di Di George. Hanno rilevato la presenza in 6 pazienti su 8 di crisi ipocalcemiche, 3 di questi con necessità di integrare vitamina D a causa di una ipovitaminosi, e rilevazione con metodica DXA di una diminuzione dello Z-score rispetto a bambini di identica età, senza però andare sotto il valore di -2 DS, che viene solitamente usato per la definizione di osteoporosi in età pediatrica. Un altro lavoro meno recente ma pionieristico in questo campo, è quello effettuato da Stagi et al.⁶⁴ che hanno studiato 28 pazienti con delezione 22q11DS ed hanno osservato una diminuzione dello Z-score rispetto ai controlli, ma anche riduzione dei valori di calcio ematico totale e ionizzato e del PTH.

In conclusione questi due studi ci lasciano comprendere come, sebbene oggi non sia presente una chiara indicazione nei pazienti con sindrome di Di George per l'effettuazione della MOC-DXA come screening per la perdita di massa ossea, in questi bambini un'attenzione particolare va posta a questo aspetto. La maggior parte di pazienti con delezione del cromosoma 22 necessita, saltuariamente o costantemente, di supplementazione di vitamina D e di calcio. Questo aspetto è molto frequente in epoca neonatale ed è dovuto all'alterato sviluppo delle paratiroidi, ghiandole implicate nella regolazione dei livelli di calcio nel sangue. Tale alterazione tende a correggersi nel tempo grazie a dei meccanismi di compenso messi in atto dal tessuto paratiroideo residuo. Va sottolineato che i sintomi legati all'ipocalcemia possono manifestarsi anche tardivamente, in una forma di ipoparatiroidismo tardivo.

Il calcio è un elemento fondamentale come specificato precedentemente, per la funzione di nucleazione dei cristalli di idrossiapatite specialmente nel momento cruciale della pubertà dove il conseguimento di un adeguato picco di massa ossea, determina negli anni successivi la prevenzione dei processi involutivi che avvengono durante l'età adulta in una porzione della popolazione. Sicuramente bisogna considerare il paziente come parte di un contesto complesso, caratterizzato anche da una ridotta attività fisica, determinata dalla presenza di alterazioni del sistema cardiovascolare e dalle deformità ortopediche viste. Ulteriori studi saranno necessari per comprendere meglio i meccanismi patologici che causerebbero il peggioramento dello Z-score.

2.6.3 Storia clinica e follow up del paziente 6

Ragazzo di 15 anni, con diagnosi prenatale di tetralogia di Fallot con stenosi polmonare severa. La diagnosi di sindrome di Di George viene effettuata poco dopo la nascita, sulla base del fenotipo, ma soprattutto della cardiopatia congenita, utilizzando la metodica FISH che evidenzia una delezione a carico della regione q11.2 di un cromosoma 22.

Il quadro cardiologico del paziente si presenta come molto complesso già dalla nascita: tetralogia di Fallot con stenosi polmonare severa, per cui esegue un primo intervento a 10 giorni di vita e successivi interventi da cui attualmente residua insufficienza polmonare. Il paziente presenta inoltre frequenti episodi di broncospasmo in corso di ricorrenti episodi di infezione, dolori articolari soprattutto alle caviglie e alle mani al mattino (ANA positività), ha un discreto calo della sottopopolazione T CD4+ compensato da un lieve incremento dei linfociti B e delle cellule NK. Attualmente sta eseguendo un trattamento con Eutirox in seguito alla diagnosi di ipotiroidismo eseguita nel 2010. Per ciò che riguarda il metabolismo calcio-fosforo, il paziente, portatore di ipoplasia delle paratiroidi in linea con il quadro clinico

di sindrome di Di George, ha presentato ipocalcemia alla nascita trattata per i primi sei mesi di vita con vitamina D e calcio, successivamente ad un episodio di ipocalcemia avvenuto nel 2015 viene nuovamente impostata una terapia con vitamina D ed una minima supplementazione di calcio.

Il paziente è attualmente in follow up:

- Cardiologico: per tetralogia di Fallot con stenosi polmonare severa, operata alla nascita;
- Immunologico: per discreto calo della sottopopolazione T CD4+, con espansione di cellule NK CD3 16+56+ e dei linfociti CD19+;
- Pneumologico: per frequenti episodi di broncospasmo e dispnea in corso di flogosi delle alte e basse vie aeree;
- Reumatologico: per dolori articolari agli arti inferiori, soprattutto in corrispondenza di caviglie e mani al mattino con ANA positività;
- Ortopedico: per presenza di piedi piatti e ginocchia valghe, grave cifosi con iniziale gibbo;
- Endocrinologico: per ipotiroidismo e ipoparatiroidismo.

Motivazione che ha portato all'esecuzione della MOC-DXA: In questo caso si è deciso di sottoporre il paziente a MOC-DXA a causa del sospetto clinico di riduzione di BMD e per il monitoraggio dell'ipoparatiroidismo in trattamento con calcio e vitamina D. All'esame è stato riportato BMD entro il range per età.

2.7 Paziente 7: Mucopolisaccaridosi IIIb

2.7.1 Descrizione generale della patologia

La mucopolisaccaridosi IIIb anche detta Sindrome di Sanfilippo, fa parte di un ampio gruppo di patologie chiamate mucopolisaccaridosi caratterizzate dalla mancanza degli enzimi di catabolismo dei mucopolisaccaridi (o glicosaminoglicani, GAG) che si raccolgono all'interno dei lisosomi delle cellule dove essi dovrebbero essere distrutti. Così facendo queste macromolecole si accumulano e determinano alterazioni a livello di diversi tessuti come cute, cartilagine, fegato, cornea, cellule del SNC. La tabella sottostante elenca le diverse forme di mucopolisaccaridosi.

Type	Common name	Major symptoms	Deficient enzyme	GAGs	Enzyme replacement therapy
MPS IH	Hurler syndrome	Progressive involvement of the heart (cardiomyopathy cardiac valve and coronary infiltration), skeleton, and airways. Frequent obstructive sleep apnea. Possible cervical spine involvement. Progressive intellectual disability	α -L-iduronidase	Heparan sulfate Dermatan sulfate	Aldurazyme
MPS IHS	Hurler-Scheie syndrome	Intermediate severity, onset in early childhood with mild to cognitive impairment			
MPS IS	Scheie syndrome	Least severe, onset in childhood with no cognitive impairment			
MPS II	Hunter syndrome	Wide range (mild to severe forms). In severe forms progression similar to MPS IH. Cardiac valve and coronary infiltration cardiomyopathy. Frequent obstructive sleep apnea. Intellectual disability may be absent in mild form	Iduronate sulfate sulfatase	Heparan sulfate Dermatan sulfate	Elaprase
MPS IIIA	Sanfilippo syndrome A	Developmental delay, severe hyperactivity, behavioral problems. Somatic manifestations are generally less severe than other MPS	Heparan-5-sulfaminidase	Heparan sulfate	Not available
MPS IIIB	Sanfilippo syndrome B	Symptoms and disease progression are less severe than IIIA	N-acetyl- α -D-glucosaminidase		
MPS IIIC	Sanfilippo syndrome C		Acetyl-Co-A glucosaminidase		
MPS IIID	Sanfilippo syndrome D		N-Acetylglucosidase N-acyltransferase		
MPS IVA	Morquio syndrome A	Severe skeletal dysplasia usually leading to pulmonary compromise. Hypoplasia of the odontoid process causing atlanto-axial instability and cervical subluxation. Aortic valve involvement common. Usually intellectually normal	Galactosamine-6-sulfate sulfatase	Keratan sulfate Chondroitin 6-sulfate	Elosulfase alfa
MPS IVB	Morquio syndrome B	Milder than MPS IVA			
MPS VI	Maroteaux-Lamy syndrome	Severe skeletal dysplasia, spinal cord compression from GAGs. Progressive cardiac valve degeneration with stenosis and/or incompetence	N-acetyl-galactosamine α -4-sulfate sulfatase	Dermatan sulfate	Galsulfase, Naglazyme
MPS VII	Sly syndrome	Highly variable developmental delay and progressive intellectual disability may be present	β -glucuronidase	Dermatan sulfate, heparan sulfate, chondroitin sulfate	recombinant human β -glucuronidase
MPS IX		Periarticular soft tissue masses, mild short stature, and acetabular erosions without classical MPS features It is very rare	Hyaluronidase 1	Hyaluronan	

GAG glycosaminoglycan

Tabella 9 Classificazione e principali caratteristiche delle MPS. Adattato da: *Moretto et al. Italian Journal of Pediatrics* 2018, 44(Suppl 2):116.

Il tipo MPS IIIb è una patologia a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata dalla mutazione del gene per l'enzima α -N-acetilglucosaminidasi che è presente a livello lisosomiale (patologia da accumulo lisosomiale) e si occupa della distruzione dell'eparan solfato. Sono state individuate 166 mutazioni del gene che codifica per l'enzima in questione e questo testimonia l'estrema variabilità delle manifestazioni presenti⁶⁵. La prevalenza della patologia è di 1-9: 1.000.000 di bambini. Le manifestazioni cliniche cominciano ad essere evidenti a 3-4 anni con alterazioni comportamentali e del ritmo sonno-veglia. Intorno ai 10 anni cominciano a comparire deficit neurologici più gravi (perdita delle capacità motorie, di comunicazione e insorgenza di crisi convulsive). In aggiunta si può avere anche epatosplenomegalia con lieve ipertransaminasemia e valvulopatie cardiache, dismorfismi facciali sono più lievi che nelle altre forme. L'aspettativa di vita di

questi soggetti è di circa 20-30 anni. Di particolare importanza è il dosaggio su sangue e urine di mucopolisaccaridi che si accumulano, a cui fa seguito il monitoraggio della funzione enzimatica, ma la diagnosi definitiva è il dosaggio enzimatico con possibilità di conferma molecolare⁶⁶. Non è presente al momento alcuna terapia efficace, mentre è in fase di sperimentazione la terapia genica. Le opzioni terapeutiche presenti attualmente sono infatti la terapia enzimatica e il trapianto di cellule staminali del midollo osseo ematopoietico allogenico, che possono ridurre la morbidità del paziente e migliorare la qualità di vita con persistenza di malattia residua in particolare al livello neurocognitivo e muscoloscheletrico.

2.7.2 Metabolismo osseo e Mucopolisaccaridosi IIIb

La patologia non è caratterizzata da compromissione osteoarticolare al contrario delle altre forme, che presentano disostosi multiple. Alcune alterazioni che sono state descritte nella forma IIIb sono scoliosi e displasia dell'anca, ma non così severa da richiedere trattamento chirurgico, rigidità articolare anche se in misura minore rispetto alle altre forme e sindrome del tunnel carpale⁶⁷. Nei tipi di MPS in cui la compromissione osteoarticolare è maggiore (I, II, IV, VI e VII), il meccanismo che determina alterazioni a questo livello è dovuto all'accumulo di glicosamminoglicani (GAG) parzialmente degradati nei lisosomi delle cellule del tessuto connettivo e dei condrociti⁶⁸, conosciamo infatti il ruolo dei fibroblasti e dei condrociti nella determinazione dell'organizzazione della matrice ossea, fondamentale per il processo di mineralizzazione. Il monitoraggio del livello di mineralizzazione ossea con MOC-DXA però è importante anche nei pazienti con sindrome di San Filippo in quanto il rischio di osteopenia e osteoporosi è alto per possibile malnutrizione, riduzione di attività fisica per dolore e scarsa tolleranza dell'esercizio fisico⁶⁹.

Nur et al.⁷⁰ hanno studiato con MOC-DXA 15 pazienti con MPS III riscontrando un abbassamento del BMD Z-score in 5 di questi 15 soggetti e riportando un'insufficienza dei valori di vitamina D in 6 di essi e questa alterazione correlava con la perdita di densità ossea. Quindi in questo caso è stato evidenziato anche un altro meccanismo alla base dell'insorgenza di osteoporosi: l'ipovitaminosi D. In uno studio di Hsiang-Yu et al.⁷¹ effettuato su un campione di pazienti con MPS viene mostrato come, utilizzando la DXA, è stata riscontrata nel 31 % dei casi osteopenia e nel 15% osteoporosi in pazienti sotto i 19 anni. In 8 di questi pazienti invece l'utilizzo della DXA è stata importante per rilevare l'aumento di BMD nei pazienti malati, dopo aver ricevuto almeno un anno di trattamento con terapia sostitutiva.

In questo contesto quindi uno studio di Kim et al.⁷² sostiene la necessità di controllare il paziente con esami strumentali quali radiografia, RMN e mineralometria con metodica DXA. Queste avrebbero la funzione di:

- supportare la diagnosi;
- monitorare il decorso cronico e progressivo della patologia;
- pianificare l'intervento terapeutico;
- verificare che la terapia stia funzionando.

La DXA in particolare viene nominata in questo lavoro come un esame fondamentale per diagnosticare una diminuita mineralizzazione ossea dovuta anche a malnutrizione e riduzione dell'attività fisica causata da dolore. Quindi, seppur non sia inclusa nel follow up della patologia, la mineralometria sarebbe importante nei pazienti con MPS per ridurre il rischio di fratture⁶⁹.

2.7.3 Storia clinica e follow up del paziente 7

Ragazzo di 17 anni, in anamnesi patologica remota riportata crescita e sviluppo psicomotorio regolare fino all'età di 3 anni circa, quando le insegnanti hanno iniziato a notare una difficoltà nel gioco. Per tale motivo è stato ricoverato presso il reparto di Neuropsichiatria infantile dell'Ospedale Salesi ed è stato sottoposto a diversi accertamenti tra cui uno screening metabolico che ha segnalato la presenza di mucopolisaccaridi urinari aumentati con pattern alterato. In seguito a tale riscontro ha eseguito il dosaggio enzimatico con evidenza di deficit della N-acetil-alfa-D-Glucosamidasi che ha confermato la diagnosi di MPS IIIb. Il bambino ha manifestato negli anni un progressivo peggioramento neurologico ed un fenotipo suggestivo della patologia. Nel 2009 ha effettuato una RMN che ha dimostrato la presenza di lieve accentuazione degli spazi periencefalici e ventricolari, con ampliamento della cisterna magna e dilatazione degli spazi liquorali, dal 2017 è in trattamento anticomiziale in seguito alla comparsa di crisi epilettiche.

Attualmente frequenta la scuola Bignamini, presenta grave ritardo mentale, assenza di linguaggio e irritabilità, fa uso di melatonina la sera per facilitare l'addormentamento. Altre condizioni patologiche sono: lieve insufficienza della valvola mitrale e insufficienza tricuspide, frequenti episodi di infezione respiratoria alle alte vie, valgismo delle ginocchia ed equinismo del piede che rendono difficoltosa la deambulazione, sclerosi acetabolare e riduzione del tono minerale calcico riscontrati ad una radiografia del bacino eseguita per follow up nel 2015. Sulla base di tale dato, associato al deficit di vitamina D sta eseguendo attualmente una terapia integrativa.

Il paziente è attualmente in follow up:

- Neurologico: per il ritardo mentale, diretta conseguenza della MPS IIIb;
- Cardiologico: insufficienza lieve della valvola mitrale e lieve insufficienza tricuspide;
- Ortopedico: per alterazione della deambulazione dovuta ad atteggiamento dei piedi in equinismo e valgismo delle ginocchia, tendenza alla deambulazione sulle punte dei piedi in miglioramento;
- Gastrointestinale: è presente epatomegalia e disfagia per solidi e liquidi per cui assume cibi frullati e aggiunge addensante nelle bevande.

Motivazione che ha portato all'esecuzione della MOC-DXA: Al paziente viene prescritto questo esame in seguito al riscontro di riduzione del tono minerale calcico riscontrato alla radiografia del bacino, la decisione è stata supportata dalla conoscenza delle possibili manifestazioni osteo-articolari della malattia. In questo caso con la MOC-DXA è stato possibile eseguire lo studio solamente della BMD relativa al rachide, dato che il paziente avendo un ritardo mentale grave non è stato collaborativo durante l'esame. Il BMD Z-score relativo al rachide è risultato essere di -2,3 ossia indicativo di osteoporosi.

2.8 Paziente 8: Acondroplasia

2.8.1 Descrizione generale della patologia

L'acondroplasia è una patologia che ha una prevalenza di 1-9:100.000. È dovuta a mutazioni del gene del recettore del fattore di crescita dei fibroblasti 3 (FGFR3), che codifica per un recettore transmembrana importante per la regolazione della crescita lineare delle ossa. Il fenotipo con cui si presenta il bambino alla nascita è così peculiare che è molto difficile non diagnosticare la patologia. Alcune caratteristiche tipiche sono: bassa statura con marcata asimmetria tronco/arti, particolarmente per quello che riguarda i primi segmenti (rizomelia), macrocrania con bozze frontali prominenti, configurazione delle mani a tridente. Oltre al gibbo toraco-lombare quando il bambino inizia a camminare si può presentare anche lordosi lombare, può inoltre essere presente ipotonia muscolare. I bambini hanno inoltre collo corto (possibile causa di apnee ostruttive del sonno che può essere conseguente anche all' ipoplasia medio-facciale, con ipertrofia delle adenoidi e delle tonsille), con possibile ristrettezza del canale vertebrale e conseguente compressione a livello cervicale del midollo. L'otite media cronica molto spesso presentata da questi bambini, può causare disturbi dell'udito. Alterazioni cardiovascolari e stenosi del canale

midollare al livello lombare sono invece manifestazioni che si presentano durante l'età adulta⁷³.

L'altezza media a cui un adulto affetto da acondroplasia potrebbe arrivare è di circa 130 cm per gli uomini e 124 per le donne⁷⁴. Il QI risulta generalmente normale, la possibile insorgenza di idrocefalo o alterazioni del sistema nervoso centrale possono correlare con una riduzione delle capacità mentali. La diagnosi della patologia viene eseguita già alla nascita in seguito alla presenza di tratti morfologici caratteristici della malattia, ma deve essere sempre confermata con l'analisi genetica per la ricerca della mutazione del gene che codifica per FGFR3.

2.8.2 Metabolismo osseo e Acondroplasia

L'unica mutazione conosciuta che sia la causa di acondroplasia è l'alterazione di un allele del gene che codifica per FGFR3, è una mutazione gain of function che determina una iperattivazione della proteina con una precoce differenziazione dei condrociti del piatto di crescita e differenziazione osteogenica oltre che una precoce mineralizzazione della matrice ossea; tutto ciò si rende evidente nella diminuzione della crescita soprattutto delle ossa lunghe⁷⁵. I meccanismi molecolari alla base di questa chiusura precoce delle cartilagini articolari possono essere spiegati dal fatto che, mentre normalmente durante lo sviluppo embrionale FGFR3 è espresso dai condrociti ipertrofici; durante la formazione della cartilagine di accrescimento nella fase della crescita ossea postnatale, i meccanismi del signaling di FGFR3 determinano una diminuzione della proliferazione dei condrociti.

Oltre alla diminuzione dell'accrescimento delle ossa lunghe che si manifesta nel paziente con nanismo disarmonico, l'osso sembra essere caratterizzato da una diminuita BMD.

In uno studio effettuato sui topi⁷⁶ è stato osservato come questa mutazione sia associata a diversi meccanismi che prendono in causa una diminuzione della deposizione di osteoide e un aumento del riassorbimento osseo. In particolare, è stato possibile appurare come il pathway FGF/FGFR sia implicato nel signaling di maturazione degli osteoblasti dalle cellule progenitrici mesenchimali; nei topi con FGFR3 mutato gli osteoblasti risultavano essere in numero minore rispetto a quelli wild-type. Questo fatto è stato avvalorato dal riscontro di diminuzione dell'osteoide e della matrice inorganica (con, allo stesso tempo normali livelli di calcemia). Oltre alla diminuzione del numero, un altro meccanismo di danno sarebbe caratterizzato dalla disfunzione dell'attività degli osteoblasti che mostravano, nello studio, una marcata espressione del gene della fosfatasi alcalina (ALP) oltre che dei geni per ostopontina e dell'osteocalcina (marker di attivazione osteoblastica). I meccanismi che

determinano una diminuzione della mineralizzazione sembrano essere associati quindi ad una disregolazione del pathway di Erk 1/2 e di p38 (la cui funzione però è ancora da approfondire). Oltre alla diminuzione della formazione di osteoide e di tessuto osseo mineralizzato, prende parte al processo anche un aumento del riassorbimento trabecolare da parte degli osteoclasti, che sono attivati tramite signaling osteoblastico. Nello studio questo aumentato riassorbimento è stato confermato oltre che da studi molecolari, anche dalla rilevazione microscopica di aumento degli osteoclasti attivi sul campione osseo prelevato (queste cellule tendono infatti ad assumere una forma cuboidale quando svolgono la loro funzione riassorbitiva).

Attualmente alcuni recenti studi hanno provato a dimostrare la presenza di ridotta mineralizzazione ossea nei pazienti affetti da acondroplasia utilizzando la MOC-DXA: uno studio italiano⁷⁷ ha riportato osteopenia/osteoporosi in 5 degli 11 pazienti acondroplastici esaminati, mentre uno studio giapponese⁷⁸ su 18 acondroplastici ha mostrato uno Z-score medio di 1.1 ± 0.8 inferiore rispetto allo standard, riportando anche una lieve correlazione tra BMD e BMI.

2.8.3 Storia clinica e follow up del paziente 8

Il paziente di 15 anni, è nato a 39+2 sg da taglio cesareo dopo gravidanza caratterizzata da minaccia d'aborto nel primo trimestre. Dalla 20° SG riscontro ecografico di micromelia e polidramnios. Alla nascita il bambino presentava un fenotipo classico per acondroplasia per la presenza di facies tipica, FA molto ampia (8x5 cm), arti corti, isodattilia. Per tale motivo viene eseguita l'indagine genetica specifica, da cui è risultata la mutazione G380R del gene FGFR3, responsabile del 90% dei casi di acondroplasia.

Dal punto di vista ortopedico il paziente presenta minima limitazione all'attività motoria per pseudo-valgismo femoro-tibiale, legato anche al sovrappeso, iperlordosi con lieve cuneizzazione anteriore dei somi di L1 ed in minor misura di L2 ad una telespinografia eseguita nel 2018. Sempre il medesimo esame rileva apparente riduzione del tono minerale calcico, per cui viene eseguita una MOC-DXA e in base al risultato viene impostata una terapia con sostituto della vitamina D e acido Neridronico ev.

Il ragazzo presenta un livello cognitivo lievemente ridotto (QI= 80-89 all'ultima valutazione neuropsichiatrica). Il ragazzo frequenta la terza media con sostegno, senza programma differenziato e discreto profitto.

Il paziente è attualmente in follow up:

- Ortopedico: per la valutazione delle deformità scheletriche, in particolare l'iperlordosi, le alterazioni dell'articolazione del gomito e lo pseudo-valgismo femoro-tibiale;
- Otorinolaringoiatrico: per lieve ipoacusia trasmissiva bilaterale e simmetrica;
- Odontoiatrico: per grave morso aperto anteriore da tettarella. Il paziente esegue anche delle sedute logopediche per la presenza di deglutizione atipica infantile.

Motivazione che ha portato all'esecuzione della MOC-DXA: In questo caso è stato deciso di effettuare la MOC-DXA in virtù della telespinografia eseguita in corso di follow up, che riportava diminuzione del tono calcico e i risultati hanno riportato una BMD inferiore al range atteso per età (Z-score relativo al rachide di -2,5, Z-score scheletro intero di -2 e Z-score scheletro intero meno la testa di -2,3).

2.9 Paziente 9: Pseudoipoparatiroidismo di tipo I

2.9.1 Descrizione generale della patologia

Lo pseudoipoparatiroidismo è una patologia genetica rara, in alcuni casi a ereditarietà autosomica dominante caratterizzata da una prevalenza di 0,8: 100.000. In questo caso vi è la presenza di bassi livelli di calcio ematico e alti livelli di fosfati e ciò è dovuto, non alla diminuzione della produzione di PTH che risulta anzi elevato, ma all' alterazione dei meccanismi molecolari recettoriali che costituiscono il target dell'ormone stesso. Esistono diverse varianti della patologia:

1. Pseudoipoparatiroidismo di tipo 1 (che si suddivide in 1a, 1b, 1c: PHP 1a, 1b, 1c);
2. Pseudoipoparatiroidismo di tipo 2 (PHP 2);
3. Pseudopseudoipoparatiroidismo (PPHP).

Le forme PHP-1a, PPHP e PHP-1b sono tutte dovute a deficit molecolari nello stesso locus genico, ossia a livello di *GNAS* (20q13.2-q13.3) che codifica per la subunità α della proteina di signaling intracellulare Gs associata alla trasduzione del segnale relativo all'attivazione del recettore del PTH. Queste mutazioni configurano il quadro di osteodistrofia di Albright, che se ereditata dalla madre, risulta essere caratterizzata da resistenza ormonale, se ereditata dal padre invece il paziente può presentare il quadro di PPHP senza resistenza ormonale, questo sarebbe determinato da differente imprinting del gene che causa la

patologia. Le anomalie genetiche responsabili per i sottotipi PHP2 e PHP1c non sono ancora ben conosciute anche se, i pazienti con PHP1c potrebbero avere mutazioni eterozigoti di GNAS, invece PHP2 potrebbe essere determinato da un difetto secondario alla mancanza di vitamina D. La sindrome di Albright è una patologia caratterizzata da brachidattilia, viso rotondo, bassa statura, obesità centrale, calcificazioni eterotopiche e ritardo mentale di vario grado molto frequente, specialmente in PHP 1a di diverso grado (in questa forma possono essere anche presenti difetti dell'olfatto). Le ossificazioni eterotopiche si conformano come noduli intramembranosi che in alcuni pazienti possono progredire verso i tessuti profondi.

Tutte le forme di PHP si possono presentare già dall'infanzia, con segni e sintomi relativi all'ipocalcemia come ad esempio parestesie, irrigidimento, contrazioni muscolari involontarie e spasmi fino ad arrivare a tetania. I pazienti con PHP possono presentare sintomi di resistenza anche ad altri ormoni come TSH, gonadotropine, GHRH. Problemi dentali, cataratta e calcificazioni intracraniche sono invece complicazioni che possono comparire a lungo termine⁷⁹.

TABLE 1. Classification of PHP-I, POH, and PPHP

	AHO	Hormone resistance	Heterotopic ossification	PTH infusion	GNAS defect
PHP-Ia	Yes	Multiple: PTH, TSH, Gn, GHRH	Yes, superficial	↓ cAMP ↓ phosphaturia	Maternal inactivating mutations
PPHP	Yes	No	Yes, superficial	Normal	Paternal inactivating mutations
PHP-Ib	No	PTH, TSH	No	↓ cAMP ↓ phosphaturia	Imprinting dysregulation
PHP-Ic	Yes	Multiple: PTH, TSH, Gn	Yes, superficial	↓ cAMP ↓ phosphaturia	Few inactivating mutations reported
POH	No	No	Yes, deep	NA	Paternal inactivating mutations

Tabella 10 Meccanismi molecolari patogenetici dei sottotipi di Pseudoipoparatiroidismo. Adattato da: Bilezikian, J. P., Brandi M. L., Cusano N. E. et al. *Management of Hypoparathyroidism: Present and Future. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2016; 101(6), 2313–2324.

2.9.2 Metabolismo osseo e Pseudoipoparatiroidismo di tipo I

I meccanismi che determinano un'alterazione del metabolismo osseo sono ben conosciuti, per esempio il PTH, che in questa patologia risulta alto, ma non funzionale come precedente detto nell'introduzione è il principale attore nella regolazione della calcemia, agendo a livello di rene, osso e intestino (indirettamente attraverso la stimolazione della produzione di calcitriolo). A livello renale infatti, normalmente il PTH determina una diminuzione del riassorbimento di fosfati (risposta all'iperfosfatemia) e l'idrossilazione in posizione 1 della 25-(OH)D, con conseguente riassorbimento di calcio e fosforo al livello intestinale e questa è la causa del fatto che in pazienti con sindrome di Albright, particolarmente nella forma I, si osserva ipocalcemia e iperfosfatemia, accompagnate ad un ulteriore innalzamento dei

livelli di PTH e riduzione dei valori di vitamina D attivata. Molto interessante però risulta l'osservazione che, nonostante sia diminuita l'escrezione di fosforo, la funzione del PTH inerente alla diminuita escrezione del calcio sembra essere mantenuta e ciò è evidente nel fatto che questi pazienti non presentano la formazione di calcoli renali⁸⁰.

Le manifestazioni a livello osseo sono meno ben definite spaziando dalla diminuzione della massa ossea, all'osteite fibrosa cistica fino all'osteosclerosi^{81,82}. Ci sono però dati contrastanti riguardo alla fisiopatologia ossea in questa condizione, è ipotizzabile che l'estrema eterogeneità del quadro metabolico sia dovuta alla diversificazione della resistenza al PTH nei vari distretti, alla differenziazione dei suoi livelli circolanti e alla diminuzione di vitamina D attivata.

In un recente studio⁸³ sono stati individuati i fattori direttamente implicati con il peggioramento del quadro osseo. In questo caso infatti, è stato possibile osservare come vi fosse una correlazione inversa tra i livelli di PTH e i valori di BMD Z-score analizzati, sottolineando l'azione del PTH sul riassorbimento osseo. La sede con valori di Z-score più bassi risultava essere caratterizzata dal rachide lombare, ma soprattutto è stato osservato un interessamento in corrispondenza dei siti con una maggior quantità di osso corticale come il terzo distale dell'avambraccio, il collo del femore e il bacino. Questo potrebbe essere spiegato con un maggiore effetto del PTH in corrispondenza dell'osso corticale con conseguente aumento della porosità in quei compartimenti. Questa differente recettività al PTH può essere spiegata sulla base della diversa espressione tissutale non solo a livello di cellule ossee presenti in diverse sedi ma anche in tessuti differenti del corpo, del mediatore intracellulare GNAS; questo spiegherebbe la resistenza al PTH di diversi organi (rene, SNC e tiroide) e la sensibilità al paratormone del tessuto osseo. Inoltre è stato osservato come la somministrazione di Ca^{2+} e correzione del P debbano portare il più possibile i livelli del PTH entro i range di normalità, per migliorare il quadro DXA del paziente (la correzione deve essere però adeguata, con valori di PTH mantenuti nella normalità senza oscillazioni intermittenti del valore stesso). I markers principalmente utilizzati per l'assessment della funzione di riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti sono la osteocalcina, la fosfatasi tartrato-dipendente, la deossipiridinolina e la fosfatasi alcalina (che però in questo studio non è stata osservata variare dipendentemente al PTH, dato comprensibile se si considera l'estrema aspecificità del marker). In conclusione nuovi studi sono necessari per delucidare al meglio la fisiopatologia ossea dello Pseudoipoparatiroidismo.

2.9.3 Storia clinica e follow up del paziente 9

Ragazzo di 15 anni, nato in Ungheria e adottato, in Italia da marzo del 2012. È nato da parto cesareo a 29 sg per oligoidramnios e IUGR. Il peso riportato alla nascita è di 730 g (peso estremamente basso) e l'Apgar score pari a 7. Il neonato ha presentato alla nascita un distress respiratorio trattato in TIN con ventilazione meccanica (ossigeno-dipendenza per i primi 10 giorni di vita).

In seguito alla presenza di valori di PTH costantemente innalzati fin dall'arrivo in Italia (nel 2012) nel sospetto di pseudoipoparatiroidismo è stata eseguita l'analisi molecolare del gene GNAS che è risultato essere mutato (variante c.431 + 1 G>A) nell'introne 5, questa variante è descritta in HGMD come associata a Osteodistrofia ereditaria di Albright e in OMIM a Pseudoipoparatiroidismo di tipo Ia, Pseudoipoparatiroidismo e Eteroplasia ossea. Dal momento che non è stato possibile studiare i genitori lo pseudoipoparatiroidismo è stato classificato come tipo Ia/b.

Dal punto di vista ortopedico sono presenti iperlordosi lombare, scoliosi dorso-lombare sinistro-convessa ad ampio raggio confermata alla telespinografia, calcificazioni nel contesto dei tessuti molli sottocutanei al calcagno destro ed in corrispondenza della parte esterna del ginocchio, al di sotto della rotula, in corrispondenza del terzo distale della diafisi della gamba e del terzo prossimale della diafisi del femore destro.

Il paziente presenta inoltre ritardo mentale (QI=56), deficit di coordinazione motoria con disprassia, presenza di atteggiamenti autolesionistici, comportamenti evitativi e fobici con tendenze ossessive, in parte legati all'anamnesi neonatale ed al possibile danno da alcool materno durante la gravidanza.

Altre condizioni riportate sono: ipotiroidismo in trattamento con Eutirox, minimo rigurgito mitralico, ipoplasia della cuspidale valvolare di sinistra della valvola aortica; strabismo convergente con componente verticale e ambliopia per cui è stato applicato un trattamento correttivo con occhiali e bendaggio, ipoacusia trasmissiva bilaterale lieve con componente maggiore a sinistra, deficit respiratorio restrittivo.

Il paziente attualmente è in follow up:

- Endocrinologico: per ipotiroidismo in trattamento con Eutirox, pseudoipoparatiroidismo in trattamento con calcio e colecalciferolo;
- Ortopedico: per la scoliosi, oltre che per la condrocalcinosi sottocutanea diffusa;
- Neurologico-psichiatrico: per attuale ritardo mentale di grado moderato con presenza di disturbo di ansia sociale e dell'umore, bassa autostima e scarso senso di autoefficacia (derivanti dal fatto che il bambino è un grave ex-prematuro);
- Cardiologico: per rigurgito mitralico e valvola aortica con asimmetria delle cuspidi associata ad un minimo rigurgito;
- Oculistico: per strabismo convergente con ambliopia;
- Otorinolaringoiatrico: per ipoacusia trasmissiva bilaterale di lieve entità, e otite cronica bilaterale fibroadesiva a timpano aperto a sinistra senza otorrea;
- Nefrologico: per iperuricemia in terapia con allopurinolo, recente basso filtrato glomerulare (90 ml/min/1,73mq) associato a bassa riserva glomerulare.

Motivazione che ha portato all'esecuzione della MOC-DXA: In questo caso viene eseguita una MOC-DXA per la messa in evidenza di eventuali alterazioni strumentali da correlarsi alle alterazioni biochimiche, che rileva una BMD nel range atteso per età.

2.10 Paziente 10: Deficit di Acil-CoA Deidrogenasi a catena corta

2.10.1 Descrizione generale della patologia

Si tratta di una patologia rarissima, la prevalenza è di 1: 50.000 casi nei Paesi Bassi. E' una malattia metabolica autosomica recessiva caratterizzata dalla mutazione di entrambi gli alleli di un gene che codifica per un enzima di degradazione degli acidi grassi (ACADS) con varianti di suscettibilità 511C>T e 625G>A. Questa patologia entra in diagnosi differenziale con l'encefalopatia etilmalonica e il deficit multiplo di acil-coA deidrogenasi. SCAD (short-chain acyl-coa dehydrogenase deficiency) è il primo enzima della catena di β -ossidazione degli acidi grassi a catena corta e determina la deidrogenizzazione-FAD dipendente del butirril-CoA C4 che si accumula, come anche i metaboliti intermedi come C-estere della carnitina, la butirril-carnitina C4, la butirrilglicina, il butirrato e l'acido etilmalonico. Questi prodotti di scarto, si possono ritrovare nel sangue (butirril-carnitina C4 e di butirrilglicina) e nelle urine (acido etilmalonico) e la determinazione della loro soglia è molto importante per la diagnosi della patologia, la loro rilevazione dovrebbe avvenire in due misurazioni distinte. La diagnosi di SCADD può poi essere confermata grazie alla misurazione dell'attività

enzimatica nel muscolo, nei fibroblasti e nei linfociti; questo viene solitamente effettuato per mezzo di un prelievo di sangue, mentre la biopsia muscolare per lo studio della funzionalità dei miociti è considerata una tecnica troppo invasiva per essere eseguita di routine in una SCADD, questo viene effettuato attraverso degli studi funzionali in vivo e in vitro e attraverso l'esecuzione di dosaggi enzimatici. La conferma della diagnosi viene però solitamente effettuata con le analisi molecolari del DNA, eseguito solitamente su un campione di sangue, attualmente sono presenti più di 60 mutazioni inattivanti il gene ACADS⁸⁴, ma le due sopra riportate sono quelle più frequenti e riferite alle nostre varianti geniche. La mutazione di entrambi gli alleli conferisce suscettibilità alla patologia, per la manifestazione clinica è infatti importante che siano compresenti anche fattori ambientali. Attualmente solo alcuni stati hanno incluso la determinazione della butirrilcarnitina (C4) nel sangue nei programmi di screening neonatale, questo è probabilmente la conseguenza del fatto che i meccanismi molecolari esatti che collegano le varianti di ACADS e l'elevazione dei metaboliti intermedi con i sintomi clinici sono attualmente sconosciuti. Le manifestazioni cliniche presenti in questa patologia sono dovute alla combinazione di diversi meccanismi fisiopatologici: l'accumulo di metaboliti intermedi e il misfolding dell'enzima Acil-CoA Deidrogenasi a catena corta che si accumula all'interno delle cellule potrebbero portare alla formazione di ROS e allo sviluppo di stress ossidativo cronico, ciò determinerebbe tossicità cellulare e diminuita produzione di energia, quest'ultima è causata anche dalla diminuzione del metabolismo degli acidi grassi. In funzione dell'estrema variabilità del quadro genomico della patologia e della compresenza di fattori ambientali, la clinica può essere estremamente eterogenea comprendendo quadri asintomatici e patologici che si possono manifestare solitamente entro i primi tre anni di vita. Le manifestazioni tipiche sono caratterizzate da dismorfismo facciale, difficoltà nell'alimentazione, acidosi metabolica, epilessia, ipoglicemia chetonica, disturbi nello sviluppo, letargia, distonia, miopatia e ipotonia. Altri sintomi più raramente presenti sono invece caratterizzati da disfunzione epatica, atrofia ottica bilaterale e vomito, come anche è riportata in alcuni casi steatoepatite, preclampsia e sindrome HELPP nella madre durante la gravidanza. Attualmente non ci sono indicazioni per una terapia sicura da effettuare, ma le raccomandazioni di cui si dovrebbe tenere conto sono di evitare il digiuno nei lattanti per più di 12 ore per evitare l'insorgenza di ipoglicemia e acidosi metabolica ed effettuare pasti piccoli e frazionati, ma attualmente non è presente l'indicazione all'esecuzione di una dieta povera di acidi grassi. Durante le crisi di acidosi metabolica acuta dovrebbero essere somministrati fluidi endovena con destrosio al 10%, con o senza l'utilizzo di insulina, questo è tanto più vero quando la crisi si manifesta anche con nausea e vomito⁸⁵. Attualmente non esistono evidenze accertate per il possibile funzionamento del trattamento con alte dosi di riboflavina in pazienti asintomatici, anche se alcuni studi hanno riportato dei miglioramenti in termini di

diminuzione dell'escrezione dell'EMA e miglioramento clinico soggettivo. Sicuramente un monitoraggio dei pazienti specialmente se presentanti frequenti crisi metaboliche (facilitate solitamente da stati di stress come febbre e digiuno), è indicato con esami di primo livello come glicemia, acidi grassi liberi (NEFA), uricemia, ammoniemia, emogasanalisi, transaminasi, creatin chinasi (CK)⁸⁶.

2.10.2 Metabolismo osseo e Malattia da deficit di Acetil-CoA Deidrogenasi a catena corta

Questa raro difetto enzimatico della beta ossidazione degli acidi grassi a catena corta determina una ridotta produzione di energia con conseguente danno muscolare che si manifesta con ipotonia generalizzata⁸⁵ oppure quadri di rabdomiolisi. Alcuni pazienti riportano anche miopatia tra cui la rara forma di miopatia multiminicore. Sebbene dopo un'attenta analisi della letteratura si sia riscontrata l'assenza di una diretta correlazione tra la malattia e alterazioni del metabolismo calcico la deficitaria formazione ossea potrebbe essere derivata dalla miopatia o dall' ipotonia e astenia generalizzata con secondaria diminuzione dell'attività fisica.

2.10.3 Storia clinica e follow up del paziente 10

Ragazza di 13 anni, anamnesi familiare senza riportate patologie di particolare rilievo, fatto salvo per un nonno materno con recente diagnosi di amiloidosi. La bambina è nata dopo una gravidanza decorsa regolarmente fino all'8° mese, quando si è presentata ipertensione materna. Apgar score 8-8 e periodo neonatale nella norma.

In seguito al riscontro di ritardo dello sviluppo psicomotorio con l'incapacità di mantenere la posizione seduta all'età di 12 mesi e per il riscontro di sindrome ipertonica con il coinvolgimento degli arti e della muscolatura paravertebrale la bambina è giunta all'osservazione clinica ed ha eseguito una RMN encefalo che ha mostrato una dilatazione degli spazi perivascolari e incompleta mielinizzazione, oltre alla presenza di cisti in corrispondenza della ghiandola pineale.

Alla luce di tale referto sono stati eseguiti esami ematici ed urinari (mucopolisaccaridi urinari, β glucuronidasi siero/plasma, esosaminidasi A e B siero/plasma, acilcarnitine ematiche) risultati nella norma. Successivamente nel 2009 viene osservata la presenza di un picco riferibile a Acido Etilmalonico nelle urine, per cui è stata eseguita l'indagine genetica specifica per encefalopatia etilmalonica (gene ETHE1) risultata anch'essa negativa. In seguito viene eseguita una biopsia muscolare con il riscontro di una lieve

riduzione dell'attività enzimatica del CH. Per tale motivo nel 2010 viene effettuata la conferma genetica con la rilevazione della presenza del polimorfismo 625 AA nel gene SCAD codificante per Acil-CoA Deidrogenasi a catena corta in forma omozigote.

Negli anni la bambina ha presentato un ritardo mentale lieve/moderato ed ipertono degli arti inferiori con diminuita autonomia (necessità di sostegno per il cammino). Alla RMN eseguita nel 2014 appare una cavitazione siringomielica dorsale.

Nel 2016 viene eseguito un intervento di allungamento del tricipite bilateralmente per atteggiamento dei piedi in equinismo e nel 2018 una tenotomia percutanea degli adduttori bilaterali per sindrome ipertonica. La bambina presenta anche una modesta rotoscoliosi del rachide lombare sinistro-convessa e ginocchia valghe, oltre che una sindrome ipertonica. Attualmente è in terapia medica e riabilitativa per diplegia spastica e deambula con ausili.

La paziente è attualmente in follow up:

- Neurologico: per diplegia spastica sintomatica e ritardo mentale lieve-moderato;
- Ortopedico/neurofisiatico: per il quadro sopra riportato di diplegia spastica, rotoscoliosi sinistro-convessa, valgismo delle ginocchia, in terapia riabilitativa.

Motivazione che ha portato all'esecuzione della MOC-DXA: In questo caso è stato scelto di effettuare una mineralometria con DXA in ragione della ridotta mobilità e delle alterazioni della mineralizzazione sospettate dalle precedenti radiografie, all'esame è stata rilevata BMD nel range atteso per età.

2.11 Pazienti 11 e 12: Malattia di Gaucher

2.11.1 Descrizione generale della patologia

La malattia di Gaucher è una patologia da accumulo lisosomiale caratterizzata da aumento di sfingolipidi che sono degli importati componenti ubiquitari della membrana cellulare; è la più frequente tra le malattie lisosomiali. È una patologia autosomica recessiva che si presenta nella popolazione generale con una prevalenza di 1:40.000-1:60.000, caratterizzata dalla mutazione del gene GBA1 che mappa sul cromosoma 1⁸⁷. Questa mutazione porta alla perdita di funzione dell'enzima glucocerebrosidasi, in alcuni casi può mancare invece l'attivatore dell'enzima (la saposina C)⁸⁸. L'accumulo di glucocerebrosidi all'interno dei macrofagi configura la formazione di cellule di Gaucher la cui presenza si rileva a livello di midollo osseo, milza, fegato. La linea cellulare monocito-macrofagica è alterata anche perché deve assolvere alla funzione di eliminare eritrociti e leucociti che

accumulano glicosfingolipidi. Il quadro immunologico della malattia risulta complesso, dato che recenti studi hanno mostrato anche la derivazione delle cellule di Gaucher dalla linea M2 e il coinvolgimento di citochine proinfiammatorie come IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α ⁸⁹. Sono coinvolti anche l'osso e il SNC e SNP, probabilmente per un basso turn-over di glucocerebrosidi al livello neuronale.

La sintomatologia in generale si può definire con la presenza di anemia, trombocitopenia, leucopenia ed epatosplenomegalia, coinvolgimento neurologico e osseo, ma esistono sottotipi patologici con differente sintomatologia⁹⁰.

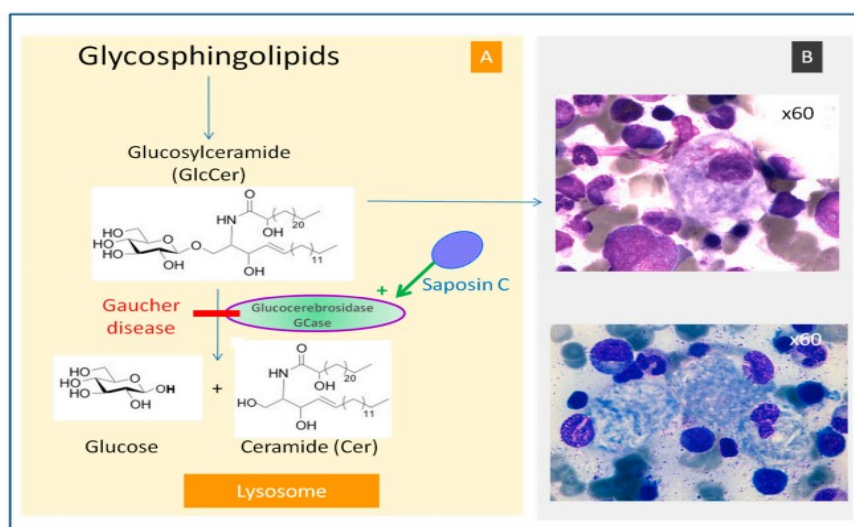


Figura 11 Meccanismo patogenetico della Malattia di Gaucher (A); Cellula di Gaucher (B). Adattato da: Stirnemann, J., Belmatoug, N., Camou (2017). A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J. of Mol. Science*, 18(2), 441.

I diversi fenotipi patologici sono caratterizzati da:

- Malattia di Gaucher di tipo1: è la forma più comune di malattia, si distingue per l'assenza di coinvolgimento neurologico; a livello di fegato e milza si possono presentare alterazioni che vanno da epatosplenomegalia, fino a lesioni dette gaucheromi, o addirittura linfomi e tumori epatocellulari⁹¹. Sono presenti sintomi da citopenia come emorragie per deficit piastrinico (per la splenomegalia infiltrativa) e dei fattori della coagulazione (diminuzione di alcuni fattori della coagulazione probabilmente dovuta al consumo, per una costante attivazione di basso grado dei meccanismi coagulativi)⁹², anemia e leucocitopenia sono invece rari. Il 50% dei pazienti presentano affaticamento, e questo ha un importante impatto sulla qualità di vita del bambino. Particolarmente importante risulta essere anche il coinvolgimento osseo. Rare manifestazioni sono invece costituite da interessamento polmonare, con accumulo delle cellule di Gaucher che comporta la

formazione di fibrosi interstiziale ed ipertensione polmonare⁹³ anche conseguente a sindrome epato-polmonare, nei casi non frequenti di insorgenza di cirrosi epatica. Proteinuria ed ematuria sono invece derivanti da accumulo delle cellule di Gaucher nei glomeruli renali⁹⁴. Molto più rari sono infine: depositi vitreo-retinici, patologie valvolari cardiache e amiloidosi.

- Malattia di Gaucher di tipo 2: l'età di insorgenza è solitamente intorno a 3-6 mesi di vita e, oltre ad epatosplenomegalia, sono presenti rilevanti sintomi neurologici, tra i più frequenti: rigidità a tronco e collo, segni bulbari, paralisi dell'oculomotore, ma possono essere presenti anche trisma e ipertonica con rigidità piramidale e extrapiramidale. Nel bambino piccolo si possono presentare spasmi laringei, compromissione dello sviluppo psicomotorio e ritardo della crescita. Sono presenti sintomi respiratori ma non ossei⁹⁵. L'exitus è entro due-tre anni di vita.
- Malattia di Gaucher di tipo 3: in questa forma sono presenti epatosplenomegalia e sintomi neurologici che però sono eterogenei all'interno di questo gruppo e possono andare dalla sola presenza di oftalmoplegia orizzontale fino a epilessia mioclonale progressiva, atassia cerebellare o spasticità⁹⁶. L'insorgenza dei primi sintomi si ha solitamente a 2 anni di età.
- Esistono anche delle forme fetali che sono caratterizzate da idrope fetale, epatosplenomegalia, ittiosi, dismorfismi facciali e trombocitopenia fetale. Sono casi rari ma che devono essere conosciuti perché c'è la possibilità di fare una diagnosi prenatale tramite il counseling, si tratta comunque di forme gravi che di solito muoiono in utero o subito dopo la nascita⁹⁷.

La diagnosi viene confermata attraverso il dosaggio dei livelli di glucocerebrosidasi nei leucociti del sangue e successivamente con l'indagine molecolare che attesti la presenza della mutazione in omozigosi.

Al momento sono disponibili sul mercato due trattamenti specifici, la terapia enzimatica sostitutiva e l'inibitore del substrato. La terapia sostitutiva enzimatica, che utilizza l'analogo imiglucerasi, resta la terapia di elezione ed è indicata per i pazienti affetti dalla malattia tipo 1 e tipo 3. La terapia basata sulla diminuzione del substrato, che utilizza il miglustat, rappresenta un trattamento di seconda scelta. È importante che i pazienti siano trattati il più precocemente possibile, prima della comparsa delle sequele che non rispondono a tali terapie.

2.11.2 Matabolismo osseo e Malattia di Gaucher

Alterazioni a livello osseo riguardano ad oggi il 90% dei malati, soprattutto per quello che riguarda la malattia di Gaucher di tipo 1 e 3, mentre non sembrano esserci correlazioni per quello che riguarda il tipo 2.

Nei meccanismi che determinano l'alterazione ossea sembrano essere implicati sia l'osso che il midollo. La deposizione di glucocerebrosidi non metabolizzati al livello del midollo osseo determina un ampliamento della cavità dove si trova il midollo rosso (cosiddetta infiltrazione midollare). In particolare essi si accumulano all'interno dei macrofagi che hanno la funzione di distruggere questi lipidi, ma a causa della mancanza del loro enzima di degradazione questo non è possibile, per cui le cellule di Gaucher (che è il nome che assumono questi macrofagi) si depositano in varie porzioni, inizialmente a livello di pelvi, vertebre e diafisi femorale e poi successivamente anche in altri segmenti ossei.

In seguito alle analisi istologiche è stato possibile osservare come l'osso patologico in particolare, sia costituito da aree di midollo rosso con infiltrazione di cellule di Gaucher, aree fibrotiche e cellule necrotiche con materiale osseo non vitale. La deposizione di questo materiale soprattutto a livello periferico nel midollo osseo determina un aumento della pressione, con successive trombosi vascolari e alterazione della circolazione che determina una necrosi ossea. Nell'immagine di RMN sottostante è possibile visualizzare alterazioni ossee causate dall'accumulo di cellule di Gaucher⁹⁸. Non a caso la RMN è l'esame fondamentale per studiare l'osso nelle fasi precoci^{99,100}.

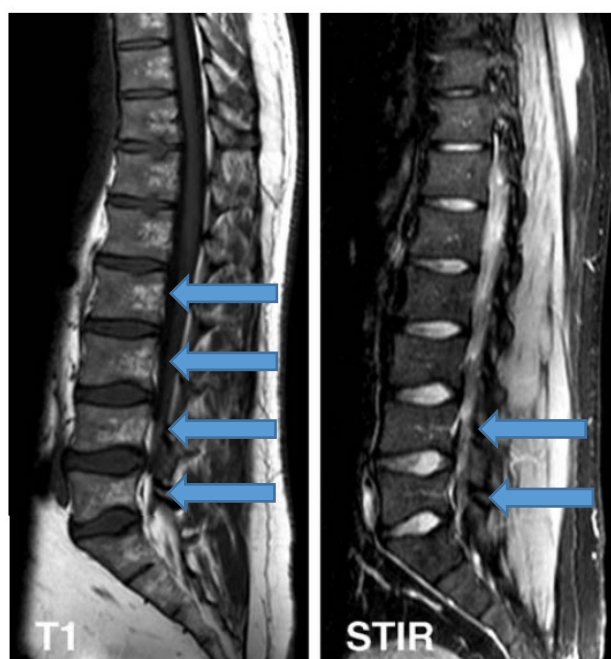


Figura 12 Sequenze T1 e STIR alla RMN spinale toracica e lombare. *Adattato da: Mikosch P., Hughes D. An overview on bone manifestations in Gaucher disease. Wiener Medizinische Wochenschrift, 2010; 160(23-24), 609–624.*

Oltre a questo, l'accumulo di glucocerebrosidi sembra determinare anche l'attivazione dei macrofagi con conseguente quadro infiammatorio dovuto alla produzione di citochine. Le più importanti tra di esse sono IL-10 che determina l'inattivazione degli osteoblasti, mentre IL-1b, IL-6 e M-CSF determinano il riassorbimento osseo agendo sul relativo recettore presente sulla membrana degli osteoclasti. Anche un'altra molecola, il MIP-1 α che causa il riassorbimento osseo nel mieloma multiplo, sembra contribuire al danno osseo presente nella malattia di Gaucher. L'infiammazione a livello locale ha anche l'effetto di determinare microfratture trabecolari che possono aggravare il quadro.

Ciò determina tutta una serie di alterazioni al livello osseo che vanno dalla necrosi ossea, all'assottigliamento della corticale, lesioni cistiche ossee, osteosclerosi, osteoporosi ed osteopenia e raramente osteomielite dovuta ai processi infiammatori. Dal punto di vista clinico il paziente può presentare dolore a livello osseo (crisi dolorose) e fratture che possono portare ad una riduzione della qualità della vita. Nei bambini affetti da sindrome di Gaucher è presente un ritardo della crescita e in assenza di terapia si può assistere ad un aggravamento del quadro osseo. Per spiegare meglio la complessità di queste condizioni una recente review¹⁰¹ ha diviso le alterazioni ossee in 3 gruppi:

1. Modificazioni primarie: sono dovute alla conseguenza dell'alterato pathway infiammatorio e all'aumento della pressione locale. Queste lesioni sono reversibili in seguito all'effettuazione della terapia sostitutiva enzimatica;
2. Modificazioni secondarie: sono caratterizzate da necrosi successiva alla deposizione di glucocerebrosidi nel midollo osseo (clinicamente si manifesta con il dolore osseo);
3. Modificazioni terziarie: sono derivanti da progressione di danni secondari.

Lo schema sottostante riassume questa organizzazione in livelli di complessità crescenti. Viene anche citata una particolare alterazione ossea che è la deformità di Erlenmeyer a livello della regione femorale metafisaria, questa è frequente durante l'età infantile e può essere riscontrata anche solo grazie all'esecuzione di una semplice radiografia.

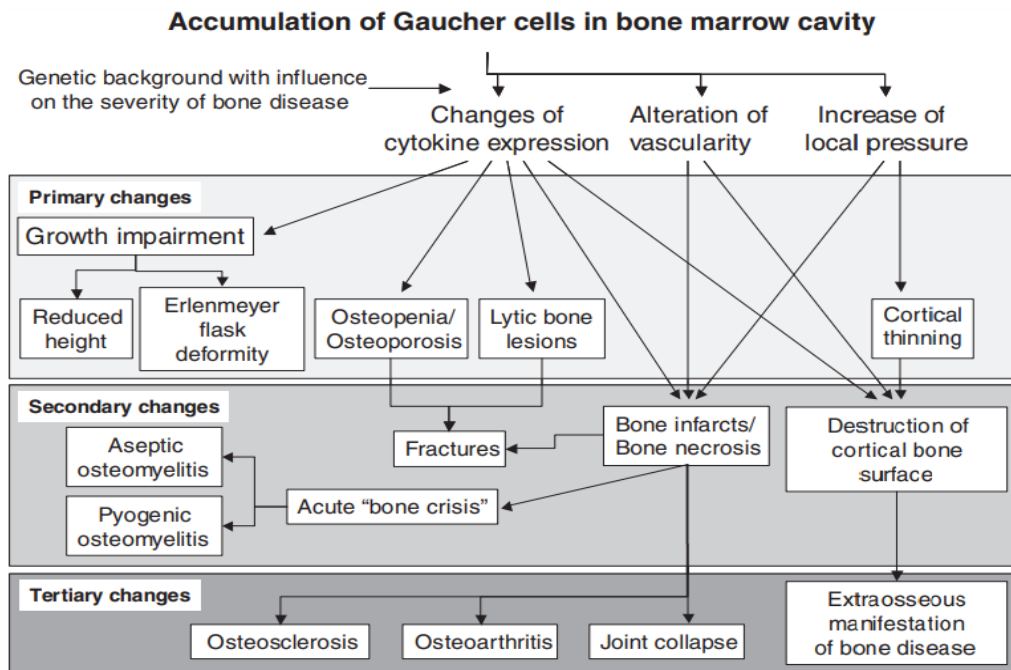


Figura 13 Descrizione delle principali alterazioni strutturali nella malattia di Gaucher. Adattato da: Mignot C., Gelot A., Bessieres B et al. *Perinatal-lethal Gaucher disease. Am. J. Med. Genet. Part A* 2003, 120A, 338–344.

Attualmente secondo le indicazioni di diversi lavori, la MOC-DXA può essere utilizzata per fare diagnosi di osteoporosi qualora ve ne sia il sospetto, ma anche per il follow up dei pazienti al fine di valutare lo stato del soggetto in funzione della terapia enzimatica somministrata: il controllo strumentale sembra infatti essere più specifico rispetto al dosaggio dei markers biochimici di riassorbimento osseo¹⁰². La densità minerale ossea andrebbe monitorata come da PDPA, ogni due anni con metodo BMB score e MOC-DXA. Le alterazioni ossee correlate alla patologia sono monitorate con radiografia dell'anca e della colonna, RMN addome, bacino, femore e colonna ogni 1-2 anni.

2.11.3 Storia clinica e follow up della paziente 11

La bambina presenta attualmente 10 anni, è nata a termine dopo gravidanza normodecorsa. Dal sesto mese viene riportata una scarsa crescita staturo-ponderale, per cui all'età di un anno e mezzo ha eseguito degli approfondimenti diagnostici: esami ematici che hanno riportato una lieve anemia microcitica; è stato inoltre eseguito lo studio dei markers per celiachia e dosaggio degli ormoni tiroidei che sono risultati entrambi nella norma. Nel 2013 (all'età di 3 anni) la bambina viene ricoverata per inalazione di corpo estraneo e in questa occasione viene eseguito un emocromo che rileva anemia e piastrinopenia e un'ecografia addominale che riporta "marcato aumento volumetrico della milza (diametro bipolare circa 16 cm) che occupa l'emiaddome di sinistra senza evidenti

immagini di lesioni ecostrutturali focali". Nel sospetto di malattia di Gaucher viene prima dosata la betaglucosidasi leucocitaria e successivamente a conferma diagnostica eseguita l'indagine genetica con il riscontro di una mutazione L444P in omozigosi, per cui viene intrapresa la terapia con imiglucerasi che è tutt'ora in corso. La bambina attualmente non presenta più citopenia né splenomegalia e la crescita staturo-ponderale è nettamente migliorata con la terapia. Il suo sviluppo cognitivo rientra nel range di intelligenza per Ritardo Mentale Lieve.

La paziente è in follow up:

- Ematologico: per pregressa piastrinopenia e splenomegalia in completa risoluzione già dopo un anno dall'avvio della terapia enzimatica;
- Neuropsichiatrico: per Ritardo Mentale Lieve;
- Pneumologico: per la presenza di apnee/ipopnee ostruttive e centrali associata a desaturazioni >4 %;
- Otorinolaringoiatrico: per presenza di ipertrofia adenoidea ostruente.

Motivazione che ha portato all'esecuzione della MOC-DXA: come indicato nel protocollo di follow up della patologia (ogni 2 anni o secondo indicazione clinica). I risultati della MOC-DXA hanno rilevato una BMD entro il range atteso per età.

2.11.4 Storia clinica e follow up del paziente 12

Il ragazzo di 10 anni, all'anamnesi familiare non presenta dati di particolare rilievo a parte un fratello di 5 anni con infezioni respiratorie ricorrenti, gravidanza ed epoca neonatale del paziente normodecorsa. La madre riferisce una storia di infezioni respiratorie ricorrenti, in particolare tonsilliti streptococciche sintomatiche alternate a episodi di positività al tampone faringeo per SBEGA senza sintomi, trattate tutte le volte con antibiotico.

A dicembre del 2018 riscontro di lieve piastrinopenia (130.000/mmc, 153.000 dopo 2 settimane) con lieve splenomegalia (diametro longitudinale 15 cm) in assenza di altri reperti di rilievo sia laboratoristici che strumentali. Eseguita visita ematologica, che consiglia follow up (la piastrinopenia poteva essere attribuita ad un processo reattivo post- infettivo).

Nel 2019 ha eseguito una ecografia addominale che ha evidenziato epato-splenomegalia con colecisti contratta e morfo-volumetria renale nella norma. Nel novembre del 2019, anche a fronte della lieve piastrinopenia (149.000 piastrine/mmc) viene eseguito il dosaggio della chitotriosidasi che risulta aumentata, per cui esegue poi un dosaggio della β -glucocerebrosidasi e della sfingomielinasi acida, entrambe indicative per la malattia di

Gaucher. La diagnosi di conferma viene eseguita per mezzo dell'analisi genetica da cui risulta una mutazione di entrambi gli alleli del gene GBA1. In seguito all'accertamento della diagnosi di Malattia di Gaucher di tipo I viene avviato il trattamento con imiglucerasi. Nel gennaio del 2020 ad una RMN total-body eseguita per follow-up, viene osservata una modesta omogenea ipointensità di segnale sospetta per iniziale localizzazione di malattia in corrispondenza del rachide lombare, per questo viene eseguita una MOC-DXA di controllo.

Per il resto il paziente presenta un normale sviluppo cognitivo, frequenta la quarta elementare con buon profitto. In questo caso la diagnosi di malattia di Gaucher è stata eseguita recentemente per cui dovrà essere avviato un follow up come da linee guida per la patologia.

Motivazione che ha portato all'esecuzione della MOC-DXA: come da protocollo di follow up del paziente con malattia di Gaucher, ancor più avvalorata dal riscontro di alterazione del rachide lombare alla RMN ossea. L'esame ha rilevato la presenza di BMD nel range atteso per età.

2.12 Analisi statistica

In ragione della eterogeneità del campione analizzato, non è stato possibile fare un'analisi statistica che tenesse conto delle diverse patologie. D'altro canto, è stato possibile analizzare i dati biochimici inerenti il metabolismo calcio-fosforo di ogni singolo paziente ed è stata eseguita una correlazione tra i valori dello Z-score riportati sui referti degli studi MOC-DXA e i valori ematici riscontrati di calcemia, fosforemia, paratormone, 25-idrossivitamina D2+D3 e fosfatasi alcalina per valutare la correlazione tra la variazione di questi ultimi parametri (variabili dipendenti) e il valore del BMD Z-score (variabile indipendente) relativo alla misurazione in corrispondenza di:

- Rachide (vertebre da L1 a L4);
- Corpo intero con la testa (TB);
- Corpo intero senza testa (TBLH).

Per valutare la forza della correlazione tra i vari gruppi di parametri è stato utilizzato il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman, indicato come Spearman ρ (rho), test non parametrico che ci consente di confrontare due variabili quantitative in un campione piccolo come quello riportato da questo studio. Il valore assunto da ρ può andare da -1 a +1 indicando in questo modo il tipo di correlazione (diretta e indiretta) e la forza della correlazione. La formula che è stata utilizzata per calcolare ρ dopo la conversione dei ranghi è la seguente:

$$\rho_s = \frac{\sum_i (r_i - \bar{r})(s_i - \bar{s})}{\sqrt{\sum_i (r_i - \bar{r})^2} \sqrt{\sum_i (s_i - \bar{s})^2}}.$$

Successivamente dopo aver stabilito il livello di significatività α come 0,05, sono stati confrontati i valori di p con i valori critici della tabella Spearman p per $n-2$ e il valore α . In seguito è stata eseguita un'analisi di correlazione con annessa visualizzazione grafica della relazione tra le variabili.

Per l'analisi è stata presa in considerazione anche la possibilità di utilizzare il test di correlazione di Pearson, ipotesi scartata per il numero del campione inferiore a $n=20$.

3 RISULTATI

In riferimento ai valori del BMD Z-score, possiamo constatare che il 25% dei pazienti inclusi (3 su 12) hanno valori di densità ossea al di sotto del range atteso per sesso, età ed etnia.

In riferimento ai parametri biochimici, il 17% dei pazienti (2 su 12) presenta valori alterati di PTH, il 67% (8 su 12) ha valori di vitamina D nel sangue inferiori al limite auspicabile per età, il 25% (3 su 12) presenta valori alterati di fosfati nel sangue, mentre in nessun paziente sono state riscontrate alterazioni della calcemia, questo probabilmente anche in considerazione del fatto che più della metà di essi (58% dei casi) sono attualmente in terapia sostitutiva con analoghi della vitamina D. Il 100% dei pazienti invece ha riportato valori di fosfatasi alcalina nel range considerato. Nella tabella sottostante è presente una sintesi dei livelli osservati per ciascuno dei parametri nominati.

Pazienti	calcemia	fosforemia	PTH	VITAMINA D	Fosfatasi alcalina	Terapia sostitutiva
Paziente 1	8,9	5,2	107	11,7	335	sì
Paziente 2	9,5	4,1	44,8	8,7	132	no
Paziente 3	9,7	6,1	36	54,3	146	no
Paziente 4	9,9	6,5	76	22,3	197	sì
Paziente 5	8,8	4,2	32	35,5	162	sì
Paziente 6	8,2	7,8	35	19,1	156	sì
Paziente 7	8,3	2,5	57	8,2	229	sì
Paziente 8	9,4	4	62	19,4	130	sì
Paziente 9	9,8	3,7	95	67,7	127	sì
Paziente 10	9,1	4,4	70	20,8	199	no
Paziente 11	9,6	5	42	5,3	219	no
Paziente 12	8,6	4,3	58	32	142	no

Tabella 11 Valori ematici dei parametri considerati.

I risultati ottenuti sono stati interpretati sulla base del range di riferimento che è quello preso in considerazione dal laboratorio dell'ospedale pediatrico Salesi, ossia:

- Calcemia: 8,5-10,5 mg/dl;
- Fosforemia: 2,5-4,5 mg/dl (adt) 4-7 mg/dl (b);
- PTH: 14-85 pg/ml;
- 25-IDROSSIVITAMINA D+ D3: Auspicabile >30 ng/ml, relativa insufficienza 10-30,0 ng/ml; insufficienza severa 0-10 ng/ml
- Fosfatasi alcalina: <1 anno: 70-110 UI/L, 1-10 anni: 110-550 UI/L, 10-15 anni: 130-700 UI/L.

Per quello che riguarda i risultati dell'esame strumentale MOC-DXA, nella tabella sottostante sono raggruppati i valori relativi alle misurazioni effettuate in ciascuna delle

sezioni corporee precedentemente descritte. Si deve considerare che nel caso del paziente 7 (con mucopolisaccaridosi IIIb) non è stato possibile ottenere dati riguardanti il BMD Z-score relativo al corpo intero ed al corpo intero meno la testa in quanto il paziente era agitato e non collaborante durante l'esecuzione dell'esame.

Pazienti	Z-score rachide	Z-score intero	Z-score intero meno testa
Paziente 1	-0,3	0,1	-0,2
Paziente 2	-0,3	-0,6	-0,9
Paziente 3	0	1	0,3
Paziente 4	0,2	-0,2	-1
Paziente 5	-2,6	-2	-2,1
Paziente 6	0,7	1,9	0,7
Paziente 7	-	-	-2,3
Paziente 8	-2,5	-2	-2,3
Paziente 9	-0,6	0,3	-0,5
Paziente 10	-0,1	-0,2	-1,2
Paziente 11	-0,3	0,6	-0,8
Paziente 12	0,5	2,1	0,9

Tabella 12 Valori BMD Z-score riportati dai pazienti alla densitometria ossea con metodica DXA.

Come precedentemente commentato, in questo caso abbiamo riportato come valori patologici per la definizione di osteoporosi livelli di BMD Z-score ≤ -2 , essendo controversa in letteratura la possibilità di definire l'osteopenia in ambito pediatrico. Come si può osservare dalla tabella sovrastante, valori di Z-score patologici si possono notare per il paziente 5, 7 e 8 che hanno rispettivamente la sindrome di Ehlers-Danlos spondilodisplastica, la Mucopolisaccaridosi di tipo IIIb e l'Acondroplasia. Correlando questi valori con l'analisi laboratoristica si può notare come nel paziente 5 non sia presente alcuna alterazione dei parametri considerati, nel paziente 7 in cui è stato definito un quadro di osteoporosi sulla base dei risultati della MOC-DXA, si sono riscontrati invece bassi valori di fosforemia e di vitamina D (rispettivamente di 2,5 mg/dl i fosfati e 8,2 ng/ml i livelli di vitamina D). Infine nel paziente 8, che riporta i risultati di BMD Z-score più bassi tra tutti gli altri, si riscontrano solamente valori al limite inferiore di vitamina D (19,4 ng/ml).

Una volta raccolti i dati, come precedentemente esposto, essi sono stati analizzati con il test di correlazione di Spearman. I risultati dell'analisi possono essere descritti dalla tabella sottostante, che mostra i valori riscontrati del p di Spearman. Questi devono essere confrontati con i valori critici riportati nella Tabella 13; in questo modo è possibile individuare la soglia di correlazione (diretta o indiretta) tra i parametri scelti, per il livello di significatività impostato ($\alpha=0,05$) e i gradi di libertà riportati nello studio ($n-2=10$).

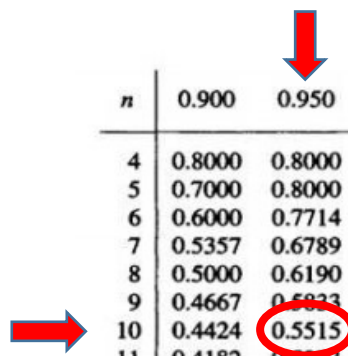
	calcemia	fosforemia	PTH	VITAMINA D	Fosfatasi Alcalina
z score rachide	-0,31	0,66	-0,23	0,01	0,11
z score intero	-0,04	0,56	-0,13	0,16	-0,10
z score intero meno testa	0,11	0,68	-0,08	0,32	-0,32

Tabella 13 Valori dell'indice di Spearman ricavati.

Come possiamo notare dalla tabella, i valori di p sono relativi alla correlazione tra la variazione di ciascuno dei parametri riportati in ascissa (calcemia, fosforemia, PTH, vitamina D, fosfatasi alcalina) con quelli riportati in ordinata (Z-score rachide, Z-score corpo intero e Z-score corpo intero senza testa). Ogni cella si presenta di un colore diverso e di una gradazione di colore diverso, sulla base della correlazione che può essere positiva o negativa e della forza della correlazione:

- Casella rossa: correlazione inversa (al crescere del parametro lo Z-score diminuisce);
- Casella verde: correlazione diretta (al crescere del parametro lo Z-score aumenta);
- Casella gialla: correlazione neutra (il parametro non correla nel suo andamento con lo Z-score).

Si procede andando a vedere quale valore critico di Spearman considerare, per accettare o rifiutare con un buon margine di rischio (si esclude in questo modo la possibile partecipazione del caso nella proporzionalità) la correlazione, sulla base dei valori riscontrati.



<i>n</i>	<i>p</i>					
	0.900	0.950	0.975	0.990	0.995	0.999
4	0.8000	0.8000	—	—	—	—
5	0.7000	0.8000	0.9000	0.9000	—	—
6	0.6000	0.7714	0.8286	0.8857	0.9429	—
7	0.5357	0.6789	0.7450	0.8571	0.8929	0.9643
8	0.5000	0.6190	0.7143	0.8095	0.8571	0.8929
9	0.4667	0.5833	0.6833	0.7667	0.5167	0.9000
10	0.4424	0.5515	0.6364	0.7333	0.7818	0.8667
11	0.4182	0.5273	0.6091	0.7000	0.7455	0.8364
12	0.3986	0.4965	0.5804	0.6713	0.7273	0.8182
13	0.3791	0.4780	0.5549	0.6429	0.6978	0.7912
14	0.3626	0.4593	0.5341	0.6220	0.6747	0.7670
15	0.3500	0.4429	0.5179	0.6000	0.6536	0.7464
16	0.3382	0.4265	0.5000	0.5824	0.6324	0.7265
17	0.3260	0.4118	0.4853	0.5637	0.6152	0.7083
18	0.3148	0.3994	0.4716	0.5480	0.5975	0.6904
19	0.3070	0.3895	0.4579	0.5333	0.5825	0.6737
20	0.2977	0.3789	0.4451	0.5203	0.5684	0.6586
21	0.2909	0.3688	0.4351	0.5078	0.5545	0.6455
22	0.2829	0.3597	0.4241	0.4963	0.5426	0.6318
23	0.2767	0.3518	0.4150	0.4852	0.5306	0.6186
24	0.2704	0.3435	0.4061	0.4748	0.5200	0.6070
25	0.2646	0.3362	0.3977	0.4654	0.5100	0.5962
26	0.2588	0.3299	0.3894	0.4564	0.5002	0.5856
27	0.2540	0.3236	0.3822	0.4481	0.4915	0.5757
28	0.2490	0.3175	0.3749	0.4401	0.4828	0.5660
29	0.2443	0.3113	0.3685	0.4320	0.4744	0.5567
30	0.2400	0.3059	0.3620	0.4251	0.4665	0.5479

Tabella 14 Valori critici dell'indice di Spearman per *n* e *p*

In questa tabella viene riportato *p* e non α , ma il valore di *p* può essere facilmente calcolato come $1-\alpha = 1-0,05 = 0,95$; mentre come precedentemente enunciato $n = 10$. Ciò ci consente di selezionare il valore critico di 0,55. Quindi in riferimento alla tabella dei risultati, possiamo considerare significativi solo i valori di $p > 0,55$ o $p < -0,55$. Detto ciò, appare evidente come vi sia una correlazione statisticamente significativa direttamente proporzionale tra i valori dei fosfati e il valore di BMD Z-score in tutti i distretti (al crescere dei valori ematici dei fosfati migliora il livello di mineralizzazione ossea). Per quanto le altre correlazioni non risultino statisticamente significative secondo in valore di *p* selezionato, occorre andare a porre l'attenzione agli altri risultati, in quanto molto interessanti: risulta essere presente una correlazione direttamente proporzionale tra i valori di vitamina D e lo Z-score, mentre per quanto riguarda il paratormone si può osservare come al diminuire dello stesso migliora il livello della mineralizzazione ossea e questo, come vedremo inseguito, è ampiamente confermato dalla letteratura. Non sono presenti risultati significativi per quanto riguarda l'associazione tra la mineralizzazione ossea e i livelli di fosfatasi alcalina in circolo anche se da quello che è riportato in letteratura, alti valori di questo enzima correlano con

condizioni di osteoporosi. Anche tra la calcemia e il BMD Z-score non è stata riportata alcuna relazione.

	calcemia	fosforemia	PTH	VITAMINA D	Fosfatasi Alcalina
z score rachide	-0,31	0,66	-0,23	0,01	0,11
z score intero	-0,04	0,56	-0,13	0,16	-0,10
z score intero meno testa	0,11	0,68	-0,08	0,32	-0,32

Tabella 15 Valori di p significativi riscontrati dopo il confronto.

I grafici sottostanti consentono invece di visualizzare quella che è un'analisi di correlazione sulla base dei parametri studiati: quanto più i punti si raccolgono intorno alla linea tanto più forte sarà la correlazione intesa come proporzionalità diretta. Si può quindi notare, come anticipato sopra, come vi sia soprattutto una relazione diretta tra i valori ematici di fosfati e il miglioramento dello stato di mineralizzazione ossea descritto dallo Z-score di tutti i distretti analizzati, mentre vi sia una correlazione inversa tra il PTH e il tono calcico. Per quanto riguarda i valori relativi a calcemia e fosfatasi alcalina si può notare come l'andamento dei punti sia diffuso all'interno del grafico e questo ricalca l'assenza di significatività della correlazione.

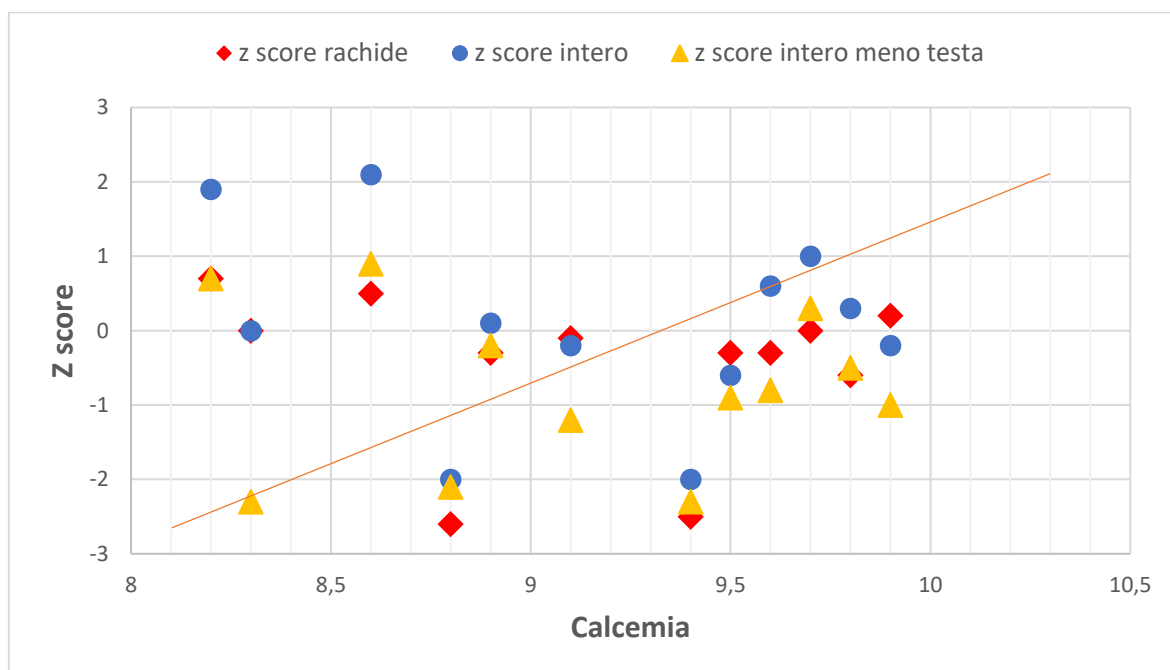


Grafico 1: Analisi di correlazione tra calcemia e Z-score.

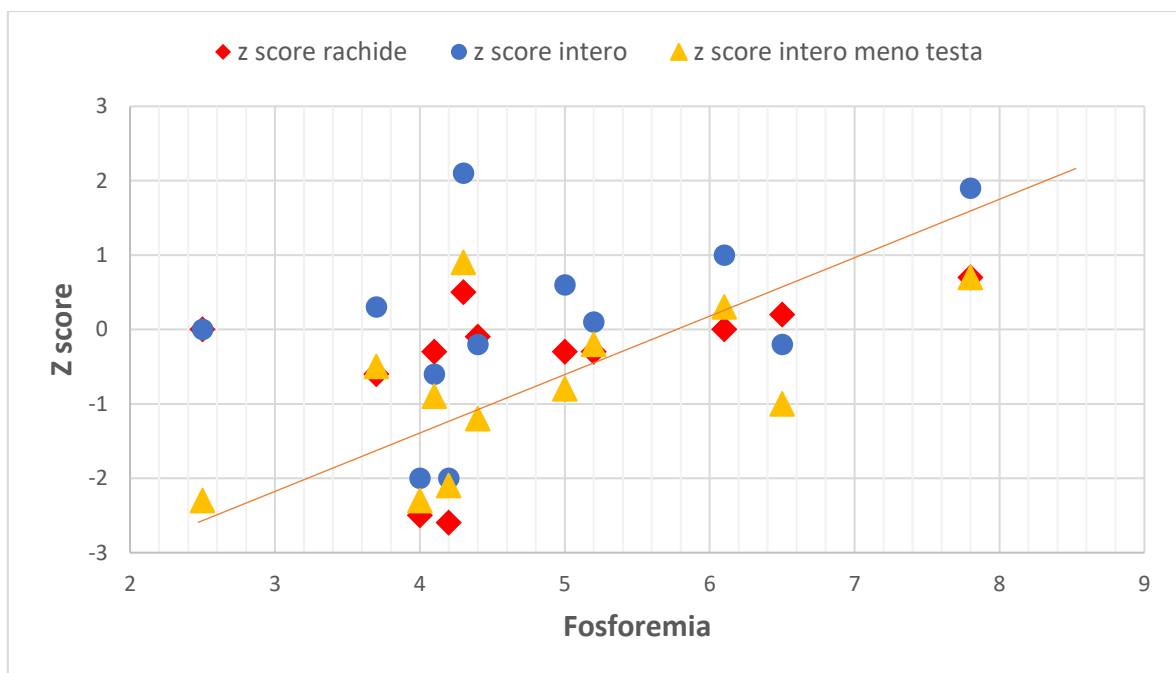


Grafico 2: Analisi di correlazione tra fosforemia e Z-score.

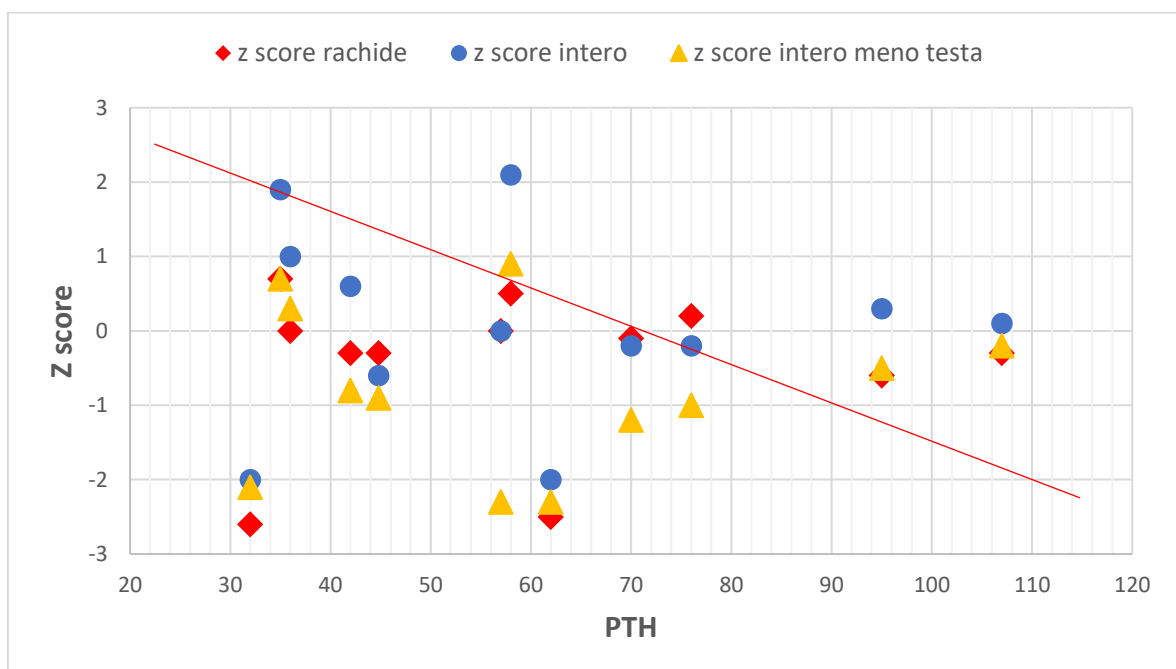


Grafico 3: Analisi di correlazione tra PTH e Z-score.

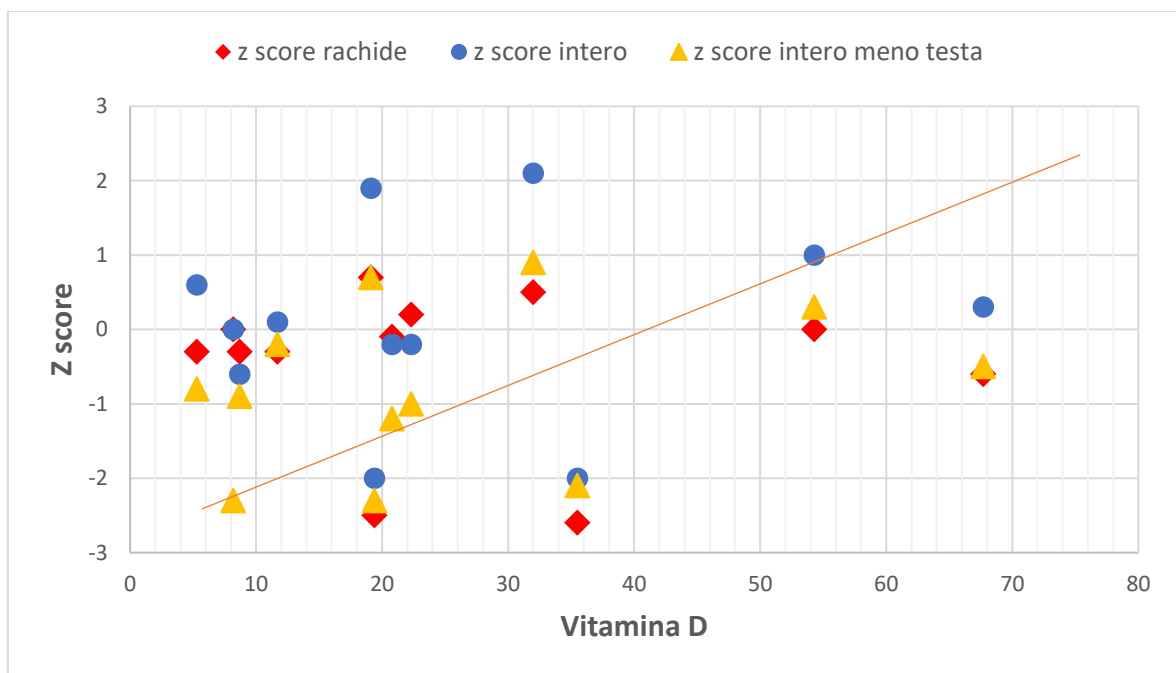


Grafico 4: Analisi di correlazione tra vitamina D e Z-score.

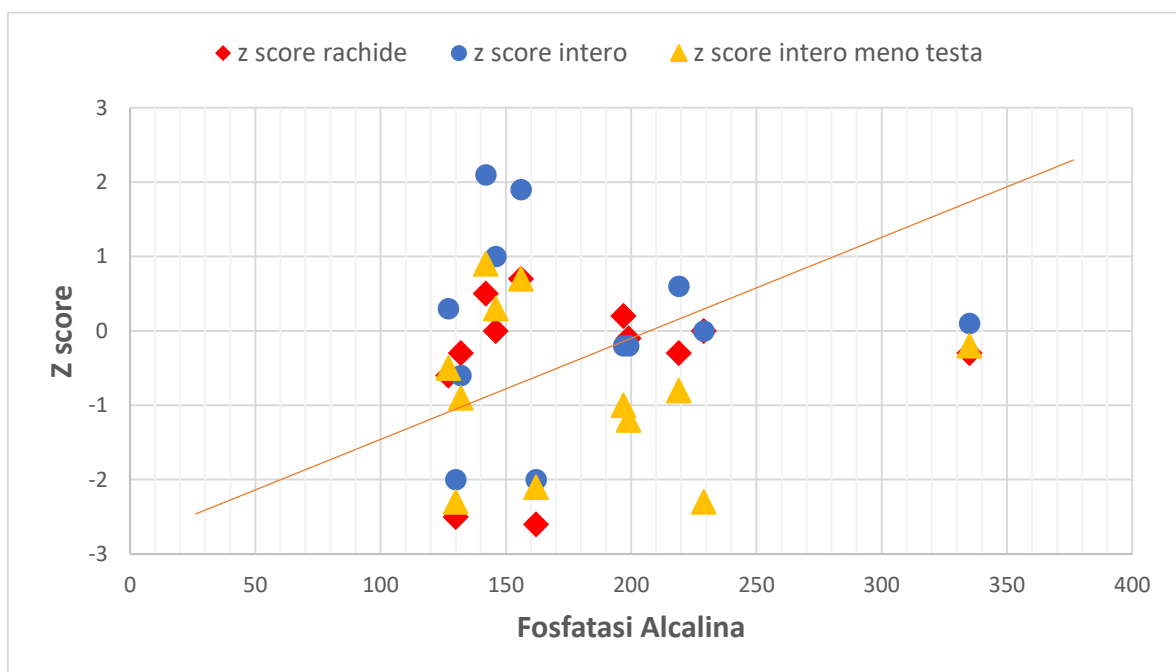


Grafico 5 Analisi di correlazione tra Fosfatasi Alcalina e Z-Score

4 DISCUSSIONE

Il metabolismo dell'osso, caratterizzato da meccanismi di mineralizzazione e riassorbimento che avvengono in continuo, è un tema complesso da studiare, specie in età pediatrica, in cui sono presenti i meccanismi fisiologici dell'accrescimento. In questa trattazione sono stati approfonditi gli stati di cosiddette osteopenia e osteoporosi. Come esposto nei capitoli precedenti, attualmente c'è comune accordo per quanto concerne la definizione della condizione di osteoporosi in età pediatrica che è determinabile con un valore di BMD Z-score ≤ -2 rilevato con la MOC-DXA; al contrario, in letteratura non c'è consenso universale sulla definizione di osteopenia. In particolare secondo alcuni, si potrebbe definire osteopenia la presenza di BMD Z-score compreso tra -2 e -1 , mentre secondo altri⁹ non avrebbe senso dare questa definizione in un paziente pediatrico per la difficoltà nell'individuazione di cut off precisi in un soggetto in accrescimento continuo. Lo scopo di questo studio è quello di indagare gli stati di insufficiente mineralizzazione ossea in una coorte di 12 pazienti pediatrici di età compresa tra 6 e 17 anni, in follow presso l'ambulatorio di Clinica Pediatrica ad indirizzo genetico-metabolico del presidio ospedaliero pediatrico "G.Salesi", affetti da patologie genetiche rare di natura malformativa e metabolica. La scelta del campione non è stata casuale, poiché i pazienti scelti, affetti dalle sindromi considerate, ossia Neurofibromatosi 1, Sindrome di Ehlers-Danlos (sottotipi ipermobile, cifoscoliotico e spondilodisplastico), sindrome di Di George, Mucopolisaccaridosi di tipo IIIb, Acondroplasia, Pseudoipoparatiroidismo di tipo I, Deficit di Acil-CoA Deidrogenasi, Malattia di Gaucher, presentano tutti multiple comorbidità e necessitano di controlli periodici di tipo multidisciplinare all'interno dei quali può accadere che lo studio del metabolismo osseo passi in secondo piano. In conseguenza a questo c'è la possibilità di andare incontro a osteopenia, osteoporosi che portano ad aumento della fragilità dell'osso. All'inizio dello studio erano stati inclusi anche due pazienti con Ipofosfatemia X-linked e sindrome di Di George in seguito esclusi, il primo per non aver eseguito ancora la MOC-DXA (seppur in programma) e il secondo perché non ha ancora compiuto 3 anni, perciò è risultato troppo piccolo per effettuare l'esame. Sono stati inoltre approfonditi nello studio i meccanismi fisiopatologici che determinano l'alterazione del metabolismo osseo in ciascuna patologia. Per studiare l'osso è stato utilizzato l'esame strumentale principe per lo studio scheletrico, ossia la mineralometria ossea computerizzata con metodica DXA, esame da tempo utilizzato per l'adulto e negli ultimi anni anche nel bambino, data la scarsa radioesposizione, i bassi costi di esecuzione e la grande affidabilità di questa metodica. I livelli di mineralizzazione ossea indicati come BMD Z-score in corrispondenza del rachide lombare, dello scheletro intero e intero senza testa sono stati poi confrontati con i parametri laboratoristici utilizzati nella pratica clinica e validati dalla

letteratura per lo studio biochimico del metabolismo osseo. In particolare abbiamo preso in considerazione: la calcemia, la fosforemia, i livelli ematici di vitamina D, PTH e fosfatasi alcalina. Non abbiamo utilizzato altri parametri biochimici quali l'osteocalcina (importante marker di riassorbimento osseo) e il protocollagene (precursore del collagene di tipo I importante per la formazione della trama su cui avviene la deposizione dei cristalli di idrossiapatite), su di essi attualmente vi è un crescente interesse. Recenti lavori sono stati importanti per la definizione dei livelli soglia nella popolazione pediatrica non patologica¹⁰³, tuttavia saranno necessari ulteriori studi.

I risultati delle valutazioni tramite la MOC-DXA sono stati correlati attraverso il test di Spearman, con i valori degli esami laboratoristici elencati sopra e si è visto come esista una correlazione statisticamente significativa ($p > 0 < 0,55$) in particolar modo tra la variazione dei livelli di fosforemia e l'alterazione della mineralizzazione ossea evidenziata alla MOC-DXA; in particolare la diminuzione dei livelli di fosforemia correla negativamente con la neoformazione ossea. Questo è esattamente in linea con le informazioni che si possono trovare a riguardo in letteratura. Per quanto concerne gli altri markers studiati, anche se la correlazione tra i livelli di vitamina D e i risultati della MOC-DXA non ha un valore propriamente statistico si può notare come un mantenimento dei valori della vitamina nel range fisiologico, sia connesso con la presenza di un metabolismo osseo adeguato. Anche se non significativo, il risultato della correlazione inversa tra PTH e mineralizzazione ossea è suffragato dalla letteratura, infatti sappiamo che ad un diminuito valore di PTH corrisponde ad un miglioramento della salute scheletrica, data la funzione riassorbitiva presentata dall'ormone. Infine non è stata riportata alcuna correlazione tra l'esame strumentale e gli esami laboratoristici di calcemia e fosfatasi alcalina. Sicuramente quanto riscontrato ci conferma l'efficacia di un costante monitoraggio dei valori di vitamina D e calcio che abbiamo fatto negli anni precedenti nel nostro Centro allo scopo di prevenire una possibile carenza. Non sempre ciò è sufficiente per cui abbiamo riscoperto l'utilità della DXA, che solo da alcuni anni è possibile fare sui bambini nella nostra Azienda.

Dobbiamo certamente tener presente alcune limitazioni che questo studio riporta. Innanzitutto, l'esiguo numero di pazienti inclusi, poiché trattasi di soggetti con malattie genetiche rare, la cui prevalenza per definizione è minore o uguale a 5 casi ogni 10.000 persone e che in alcuni casi arriva fino a 1:1.000.000 (basti pensare al sottotipo spondilodisplastico della sindrome di Ehlers- Danlos). Nonostante ciò, la metodica di analisi è stata adeguata al campione di ridotte dimensioni, attraverso l'utilizzo del test di correlazione di Spearman (test non parametrico quantitativo che prende in considerazione lo studio dei ranghi).

In secondo luogo, i pazienti inclusi nello studio sono tutti affetti da patologie diverse, che comunque hanno direttamente o indirettamente un interessamento osseo e per le quali è importante quindi prevenire e trattare un eventuale dismetabolismo calcico. Inoltre per molte di tali patologie è descritta in letteratura l'eventuale comparsa di osteoporosi. Il nostro campione è comunque composto da pazienti con malattie eterogenee con ampio spettro fenotipico e con vario grado di severità e questo potrebbe aver influenzato i risultati ottenuti.

Di seguito si andrà brevemente a correlare ciò che abbiamo riscontrato dall'analisi statistica con le conoscenze attualmente presenti all'interno della comunità scientifica, al fine di comprendere correttamente il significato dei risultati ottenuti.

4.1 PTH e MOC-DXA

Nel nostro studio tra PTH e mineralizzazione ossea, è stata osservata la presenza di una proporzionalità inversa ma non significativa, ossia al diminuire del paratormone in circolo i risultati della MOC-DXA sembrano migliorare. Come si potrebbe spiegare questa correlazione sulla base delle conoscenze attuali sull'argomento?

Il paratormone, la cui funzione è quella di mantenere la concentrazione del calcio costante nel sangue, a livello osseo ha funzioni diverse a seconda che si consideri il suo effetto in acuto o in cronico.

Sicuramente sono noti gli effetti benefici del PTH nei pazienti affetti da ipoparatiroidismo, condizione che può avere diverse cause, quali la rimozione iatrogena delle paratiroidi, la distruzione autoimmune, patologie genetiche come la sindrome di Di George (uno dei pazienti inclusi nello studio ha proprio questa patologia). Infatti, in uno studio recente riportato da Pooja et al.¹⁰⁴ vengono riportati due casi clinici nei quali vengono evidenziati molto bene i benefici del trattamento con teriparatide (un ormone ricombinante simile al PTH) in un paziente con sindrome da mutazione del gene AIRE (poliendocrinopatia autoimmune), con ipoparatiroidismo autoimmune e in un altro caso di asportazione iatrogena delle paratiroidi. Le due bambine oggetto dei case reports hanno riportato un miglioramento rapido e duraturo dei livelli di calcemia (innalzamento) e della fosforemia (riduzione dei livelli ematici), questo tipo di approccio terapeutico quindi si configura come un trattamento migliore rispetto alla sola somministrazione di calcio gluconato, di chelanti del fosforo o di vitamina D. Anche diversi studi su animali di laboratorio hanno mostrato come la somministrazione di PTH, meglio se in associazione a GH, determina il miglioramento dello stato di densità minerale ossea in animali con osteoporosi indotta da immobilità legata alla somministrazione di tossina botulinica¹⁰⁵. Questo riguarda però una

condizione patologica in cui il beneficio della supplementazione del PTH è prevalentemente dovuto alla sua scarsa produzione.

Gli effetti a lungo termine infatti determinano un aumento della componente cellulare a livello dell'osso, sia di osteoclasti che di osteoblasti con un effetto positivo sul rimodellamento osseo; un'esposizione continua a elevati livelli di PTH (infusione prolungata sugli animali) porta ad un aumentato riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti con diminuzione della densità (ciò è testimoniato anche dall'effetto dei valori del PTH cronicamente elevati, in pazienti con insufficienza renale cronica che possono arrivare a presentare osteite fibrosa). Tuttavia la somministrazione intermittente di PTH per 1 o 2 ore al giorno determina una stimolazione netta della neoformazione ossea più che una sua diminuzione. Addirittura i risultati di un recente trial hanno evidenziato come la somministrazione intermittente in monoterapia è in grado di determinare una marcata diminuzione delle fratture osteoporotiche. Quindi sicuramente gli effetti sono diversi sulla base delle modalità di somministrazione e della durata dell'innalzamento dei valori ematici dell'ormone¹⁰⁶.

D'altra parte sono noti da molto tempo gli effetti di innalzamenti cronici di PTH e la corrispondente conseguenza a livello della minerale ossea. Questo aspetto è stato anche evidenziato in un recente studio di Soeira et al.¹⁰⁷ dove sono stati presi in considerazione 42 bambini con insufficienza renale di grado 5 in dialisi e sono state osservate le correlazioni tra i livelli di fosfatasi alcalina, PTH, vitamina D e danno osseo studiato con la biopsia ossea e con la DXA. Prendendo in considerazione il livello della correlazione tra PTH e DXA, si è osservato come valori più alti di paratormone, in questo caso secondari all'abbassamento della vitamina D, correlavano con quadri peggiori di mineralizzazione ossea studiata alla MOC. In aggiunta a ciò, gli autori hanno osservato anche una correlazione tra alti valori di PTH, bassi valori di BMD e bassa statura, dimostrando come questi processi di riorganizzazione ossea possano essere implicati nei meccanismi fisiologici di crescita del paziente.

4.2 Vitamina D e MOC-DXA

Nel nostro studio è stata riportata una correlazione positiva anche se non significativa, tra i valori di vitamina D e il livello di mineralizzazione ossea. Questo aspetto è in linea con i noti effetti della vitamina D sull'osso e con i numerosi studi eseguiti a tal riguardo.

Il recettore dell'1,25(OH)₂D si ritrova infatti in vari distretti del corpo e in particolare a livello osseo VDR è espresso dagli osteoblasti. L'ormone legato al recettore, funge a livello

nucleare da fattore di trascrizione fondamentale per l'espressione di geni che codificano per le proteine della matrice ossea: l'osteocalcina e l'osteopontina, come anche del collagene di tipo 1. La vitamina D è anche fondamentale per l'espressione di RANKL che legandosi a RANK ha la funzione di determinare la differenziazione degli osteoclasti, ciò è importantissimo per il meccanismo di riassorbimento osseo.

Al tempo stesso la vitamina D inibisce anche la trascrizione del PTH e questo ci spiega gli effetti benefici sul metabolismo osseo determinati dal trattamento con analoghi della vitamina D in pazienti con iperparatiroidismo secondario a insufficienza renale cronica. Sono evidenti gli importanti effetti di questi ormoni sul benessere dell'osso nel rachitismo, una patologia causata da una ridotta produzione di $1,25-(OH)_2 D$ che può essere attribuita a cause genetiche (ipofosfemia familiare, rachitismo vitamina D dipendente di tipo 1 e di tipo 2) e non genetiche (deficit nutrizionali, malassorbimento, mancata fotosintesi, patologie epatiche e renali, ipoparatiroidismo e iatrogena per l'utilizzo di farmaci quali i barbiturici e i corticosteroidi). In questi bambini possiamo osservare i quadri ossei particolarmente gravi già riportati, ossia ritardo nella chiusura delle fontanelle, rosario rachitico, ginocchia valghie o vare e solco di Harrison al di sotto della linea costale (Figura 6). Un quadro radiologico tipico è determinato dalla riduzione della densità ossea osservabile alla radiografia, ma soprattutto con la MOC-DXA, che in questi pazienti viene sempre effettuata per il follow up della terapia sostitutiva. Anche se l'effetto della supplementazione della vitamina D è maggiormente evidente nei bambini con rachitismo, uno studio che ha coinvolto 76 bambini, tutti con età tra i 6 e i 18,5 anni con osteoporosi primitiva o ridotta massa ossea, ha dimostrato come vi sia associazione tra la supplementazione di vitamina D (somministrata alla dose di 658 UI/die) e un miglioramento nei parametri densitometrici, in particolare del BMD Z-score relativo al rachide lombare¹⁰⁸.

In uno studio di Rao et al.¹⁰⁹ vengono studiate le somministrazioni in 3 formule diverse di vitamina D e calcio a dosaggi diversi in bambini con sindrome carenziale, monitorando i pazienti nel tempo; dopo 12 settimane gli autori hanno potuto osservare un miglioramento nel BMD e nel BMC, non talmente differenziato da poter comprendere quale somministrazione fosse la migliore, ma sicuramente dimostrativo dell'effetto della supplementazione di calcio e vitamina D in questi pazienti. Uno studio analogo di Viljakainen et al.¹¹⁰ mostra anche effettivamente quali siano le zone maggiormente interessate da questo aumento della mineralizzazione. In questo caso è stato studiato l'effetto della somministrazione della vitamina D su un gruppo di ragazze adolescenti confrontandolo dopo la randomizzazione con un altro gruppo a cui era stato somministrato il placebo. In questo caso si è visto come, a rispondere maggiormente alla somministrazione, fosse stato il rachide più che il comparto femorale distale e che il

meccanismo che portava all'aumento del BMD fosse principalmente una diminuzione del riassorbimento, più che un aumento della deposizione di osso e questo si poteva dedurre dalla diminuzione dei marker di riassorbimento osseo.

4.3 Fosfatasi alcalina e MOC-DXA

In questo studio non è stato riportato alcun risultato statisticamente significativo per quanto riguarda la correlazione tra fosfatasi alcalina e lo stato di mineralizzazione ossea. Questo enzima è però un importantissimo marker dello stato di salute dell'osso, ad esempio esso può essere alto nei processi riassorbitivi importanti come l'osteoporosi o il morbo di Paget. È anche vero che nel bambino, durante le fasi di rapido accrescimento, i suoi livelli potrebbero essere più alti del normale (rialzo fisiologico). Proprio per questa estrema variabilità dei suoi valori in funzione della crescita ossea, esistono valori di riferimento per età e sesso, a cui noi ci siamo attenuti; è stato proposto di definire la variazione di questo parametro in età pediatrica sulla base di curve di percentile come attualmente si fa per l'individuazione dell'altezza e del peso¹¹¹.

Nell'uomo esistono tre geni che codificano per l'isoenzima della fosfatasi alcalina, con ristretta espressione tissutale che sono la forma "intestinale", "placentare" e "germinale", ma esiste anche una forma non tessuto-specifica. Quest'ultima rappresenta il 95% della fosfatasi alcalina totale circolante ed è costituita da due forme quantitativamente equivalenti, quella epatica e quella ossea, differenti non per la struttura primaria ma per il diverso grado di glicosilazione. La fosfatasi alcalina ossea, prodotta dagli osteoblasti, ha un ruolo chiave nel processo di mineralizzazione ossea: ha un'azione di clivaggio sul pirofosfato, un potente inibitore della mineralizzazione, favorendo la deposizione del materiale minerale sulla matrice organica dell'osso in formazione. Questo enzima è costituito da tre siti leganti i metalli che sono M1 e M2 occupati dallo Zn^{2+} e M3 occupato da Mg^{2+} , è inoltre presente anche un altro dominio che è M4 legante il Ca^{2+} , che è importante per ottenere la struttura terziaria della proteina. Quando tutti gli ioni sono legati al proprio sito, l'enzima può svolgere la sua funzione catalitica sul pirofosfato. Con il processo di mineralizzazione ossea però, i livelli di calcio si innalzano e questo ione si lega ai siti normalmente occupati da zinco e magnesio, in questa maniera la fosfatasi alcalina non tessuto specifica viene inattivata¹¹².

La fosfatasi alcalina non tessuto specifica inoltre si trova normalmente legata alla membrana plasmatica mediante un'ansa costituita da fosfatidilinositolo e i suoi livelli circolanti (dovuti all'azione delle fosfolipasi) sono un importante marker per lo studio della

funzionalità epatica e ossea. Le mutazioni degli alleli del gene che codifica per l'isoforma non specifica della fosfatasi alcalina, che possono essere trasmesse con modalità autosomica recessiva, determinano il quadro di ipofosfatasia. Questa patologia si può manifestare in epoca neonatale e infantile come rachitismo e in età adulta come osteomalacia. Il meccanismo patologico è dovuto alla scarsa funzione dell'enzima con conseguente accumulo dei suoi substrati fisiologici quali la fosfoetanolamina, il pirofosfato inorganico e il piridossal-5'-fosfato. Il PPI accumulandosi interferisce con la mineralizzazione, agendo come potente inibitore della deposizione dei cristalli di idrossiapatite. La forma infantile della malattia si manifesta solitamente con deformità scheletriche quali deficit di crescita, deformità rachitiche, craniosinostosi funzionale; se non trattata può portare ad alterazioni nella deambulazione, bassa statura e perdita precoce della dentatura decidua. Da un punto di vista biochimico, il paziente presenta bassi livelli di fosfatasi alcalina e innalzamento della calcemia e della fosfatemia senza variazioni del PTH e della vitamina D.

La fosfatasi alcalina è un importante marker di patologia del metabolismo osseo ma anche epatico ed è per questo che, qualora si osservino innalzamenti o diminuzioni dei suoi valori è possibile andare ad indagare più approfonditamente il quadro richiedendo il dosaggio dell'isoforma ossea o epatica a seconda del sospetto clinico. La tabella sottostante riassume tutte le alterazioni che possono determinare la variazione della ALP focalizzando l'attenzione principalmente sulle patologie ossee¹¹³.

CAUSE DELL'AUMENTO DI ALP	CAUSE DELLA DIMINUZIONE DI ALP
Patologie ad elevato turn-over osseo: 1. Morbo di Paget 2. Osteomalacia 3. Osteomielite 4. Iperparatiroidismo 5. Osteoporosi 6. Metastasi ossee 7. Guarigione di fratture ossee Condizioni fisiologiche: 1. Durante i periodi di rapido accrescimento e conseguente allungamento delle ossa lunghe 2. Durante la gravidanza Patologie epatiche (calcolosi, cirrosi epatica, epatiti, ittero da stasi epato-biliare, neoplasie)	Patologie più frequenti nel bambino che possono determinare deficit di ALP: 1. Stati di malnutrizione 2. Ipofosfatasia 3. Ipotiroidismo 4. Celiachia 5. Ipervitaminosi D 6. Fibrosi cistica 7. Carenza di Zinco 8. Morbo di Wilson Altre condizioni: 1. Menopausa 2. Anemia 3. Post- trasfusionale

Tabella 16 Condizioni in cui si presentano alterazioni dei livelli della ALP.

4.4 Livelli ematici di Ca^{2+} e P e MOC-DXA

In questo studio è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa tra i livelli dei fosfati circolanti e lo status della mineralizzazione ossea, mentre la relazione tra calcio e BMD Z-score è non statisticamente significativa. Ciò potrebbe essere in parte anche dovuto al fatto che il bilancio del calcio (come in una percentuale anche quello del fosforo) potrebbe essere influenzato dalla terapia con analoghi della vitamina D e calcio carbonato praticata da molti pazienti.

Nella maggior parte degli studi presenti in letteratura, viene analizzata la correlazione tra la somministrazione di Calcio e vitamina D e gli effetti sulla mineralizzazione ossea; spesso l'ipocalcemia è legata ad un deficit di vitamina D o di PTH per cui è difficile tramite l'uso della MOC-DXA analizzare l'effetto della sola correzione di calcio. Uno studio molto recente¹¹⁴ mette in evidenza l'efficacia, sulla mineralizzazione ossea (studiata tramite la metodica DXA), dell'implementazione di calcio e vitamina D in bambini talassemici, patologia caratterizzata da notevoli alterazioni di diversi organi endocrini, determinata dalla possibilità di sviluppare deficit di funzione delle paratiroidi e quindi deficit di calcio (anche se il meccanismo di danno osseo potrebbe essere multifattoriale). Un altro studio¹¹⁵ eseguito su bambini con sindrome nefrosica trattata con corticosteroidi ha mostrato invece miglioramenti nei livelli di 25-(OH)D alla somministrazione di calcio e vitamina D, ma contemporaneamente non ha mostrato significativi risultati per quanto riguarda invece i livelli di BMD valutati con la mineralometria; in uno studio meno recente organizzato alla stessa maniera però, Bak et al.¹¹⁶ hanno dimostrato una associazione importante tra l'implementazione di calcio e vitamina D e i livelli di mineralizzazione ossea in pazienti costituiti dalla stessa malattia.

Molto più difficile da valutare è l'effetto della diminuzione del fosforo sul metabolismo osseo. È stato possibile isolare l'effetto dei fosfati in un interessantissimo studio di Pekkinen et al.¹¹⁷, in cui è stato approfondito il ruolo della mutazione di una singola molecola: il fattore di crescita dei fibroblasti di tipo 23 (FGF23). Essa è prodotta dagli osteoblasti e dagli osteociti e va ad agire a livello renale determinando la downregulation del trasportatore $\text{Na}^{2+}/\text{P Na}^{2+}$ -dipendente andando a inibire l'azione del citocromo CYP27B1, che ha anche una funzione essenziale nel determinare l'idrossilazione in posizione 1 della 25-(OH)D e l'inattivazione della vitamina D doppiamente idrossilata. I valori del P sono quindi regolati sia da FGF23, che da 1,25(OH)₂D e da PTH. Quando diminuiscono i fosfati riassorbiti a livello renale o intestinale, si verifica una diminuzione della disponibilità dello ione con effetti a livello cellulare (ha infatti importanti funzioni di regolazione energetica al livello intracellulare) e sulla mineralizzazione ossea. La funzione di questa molecola è stata

soprattutto studiata nei rachitismi ipofosfatemici in cui è presente la mutazione del gene che codifica per FGF23 e nelle osteomalacie derivanti da tumori produttori di FGF23. In uno studio¹¹⁶ di Bak et al. è stata considerata una popolazione di 183 bambini in età adolescenziale e sono stati rilevati probabili mutazioni del gene FGF23 e associati a valori di ipomineralizzazione valutati con MOC-DXA ma anche con TC quantitativa, per avere un'informazione sulla volumetria dell'osso. L'analisi genetica è stata eseguita con prelievo ematico e indagine genetica sulle cellule del sangue. Gli autori hanno identificato all'interno del campione 9 bambini con mutazioni del gene FGF23 e con una associazione statisticamente significativa tra queste mutazioni, la variazione dei livelli ematici di P e la diminuzione del BMD Z-score a livello del bacino, ma non in corrispondenza degli altri distretti.

La funzione del P sull'ossificazione è stata studiata anche su modelli murini con mutazione del gene Phex (modello dell'ipofosfemia X-linked umana), in cui si possono osservare normali livelli di Ca^{2+} e diminuiti livelli di P e ciò si associa a un fenotipo con osteomalacia severa. L'inattivazione di Phex determina inoltre una overproduzione del fattore FGF23 che inibisce l'espressione del trasportatore Na^+/P a livello tubulare renale con conseguente ipofosforemia. Anche topi con mutazione di ApoE-FGF23 presentano gli stessi sintomi di ipofosfemia e osteomalacia, suggerendo l'importanza del P nel meccanismo del deficit di mineralizzazione ossea¹¹⁸. Inoltre recentemente si è identificato come l'osteopontina potrebbe essere importante in questo meccanismo, perché essendo essa un substrato di Phex, in sua assenza la proteina si potrebbe accumulare sulla matrice extracellulare determinando difetti di mineralizzazione¹¹⁹. Un'altra situazione in cui è possibile osservare l'effetto dei fosfati sulla mineralizzazione ossea indipendentemente dal calcio, è un esperimento fatto sempre utilizzando un modello murino, in cui è stata provocata una mutazione del recettore CaR presente a livello delle paratiroidi. In questo caso è stato possibile osservare come in presenza di ipercalcemia e ipofosforemia indotta da PTH, il metabolismo osseo fosse alterato e non responsivo alla somministrazione di Ca^{2+} ¹²⁰.

In generale anche se sono presenti studi pionieristici come questo, la causa dell'alterazione dei livelli dei fosfati nel sangue è ancora per gran parte sconosciuta¹²¹ come anche i suoi rapporti con l'alterazione dei parametri della DXA, sebbene i meccanismi molecolari di formazione della matrice ossea e le implicazioni dei fosfati in questo meccanismo sia conosciuto; questo potrebbe essere dovuto all'immensa quantità di variabili che prendono parte a questo processo come precisato nell'apposita sezione dell'Introduzione.

5 CONCLUSIONI

Negli ultimi anni l'impiego della mineralometria ossea computerizzata con metodica DXA ha trovato sempre più applicazione in campo pediatrico in ragione dell'incremento del numero di evidenze in letteratura riguardo alle modalità di impiego, ai parametri più attendibili da valutare e alle indicazioni circa la sua applicazione.

In particolar modo il suo utilizzo, in un ambito così specialistico della pediatria quale quello delle patologie genetiche rare, è stato approfondito ancora più di recente, in seguito alla ricerca sui meccanismi fisiopatologici che in queste patologie complesse possono determinare la disregolazione del metabolismo osseo con la perdita di densità minerale ossea, condizione che predispone allo sviluppo di osteoporosi e di conseguenza a fratture. Tali anomalie della mineralizzazione, generalmente aggravate da una condizione generalizzata di diminuzione della mobilità conseguente alle disabilità presentate dai pazienti, possono portare ad un peggioramento della qualità della vita dei bambini affetti ed all'insorgenza di comorbidità. A tal proposito è importante studiare il metabolismo osseo attraverso l'applicazione di metodiche come la MOC-DXA, oltre che il dosaggio di markers biochimici.

In particolare in questo studio si sono approfondite le seguenti patologie genetiche rare: la sindrome di Ehlers-Danlos, la malattia di Gaucher, la malattia da deficit di Acetil-CoA a catena corta, l'acondroplasia, la sindrome di Di George, lo Pseudoipoparatiroidismo, la Mucopolisaccaridosi e la NF1; ma molte altre sono le sindromi che potrebbero essere esaminate per quanto concerne il dismetabolismo calcio-fosforo, alcune di queste sono già comprese nelle tabelle del Ministero Della Salute¹⁰ per quanto riguarda le indicazioni all'esecuzione della MOC-DXA, mentre altre sono ancora da approfondire.

Oltre alla valutazione dell'impiego della MOC-DXA, questo lavoro si è anche posto lo scopo di approfondire il significato di alcune molecole tipicamente impiegate per il mantenimento dell'omeostasi fosfo-calcica, nello specifico: 25-(OH)D, paratormone, fosfatasi alcalina e i microelementi Ca^{2+} e P. I valori riscontrati nei singoli pazienti sono stati tabulati e il loro andamento correlato attraverso un'analisi statistica allo Z-score misurato tramite metodica DXA. L'unica relazione significativa ($\alpha < 0,05$) riscontrata è quella tra valori ematici di fosfati e il BMD Z-score (relazione direttamente proporzionale).

Come detto sopra nell'interpretazione dei risultati bisognerebbe considerare il fatto che il campione di studio è piccolo ed eterogeneo. D'altra parte, la varietà delle patologie approcciate può essere ritenuta non solo un limite, ma anche un vantaggio perché ci ha

consentito di approfondire i diversi meccanismi fisiopatologici che sono alla base di ciascuna malattia.

Negli ultimi anni è aumentato l'interesse riguardo l'importanza della vitamina D e il suo beneficio a livello del metabolismo osseo e di conseguenza sulla necessità di una sua supplementazione. Correlando i dati biochimici con lo studio mediante MOC-DXA si arriva a fornire una più idonea indicazione terapeutica. Ciò va maggiormente approfondito nei pazienti pediatrici con malattie rare complesse; a tale scopo sarebbe utile poter effettuare ulteriori studi multicentrici raggruppando i pazienti in un campione più omogeneo per patologia ed età.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Clark EM, Ness AR, Bishop NJ et al. Association between bone mass and fractures in children: a prospective cohort study. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(9):1489–1495.
2. Kasper, Fauci, Hauser et al. Harrison, Principi di Medicina Interna Vol 2, 19a edizione. Casa Editrice Ambrosiana, 2017; pp 3195-3197.
3. Khavandgar Z, Poirier C, Clarke CJ et al. A cell-autonomous requirement for neutral sphingomyelinase 2 in bone mineralization. *J Cell Biol.* 2011; 194: 277–289.
4. Murshed M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2018. doi:10.1101/cshperspect.a031229
5. Gordon CM, Leonard MB, Zemel BS et al. International Society for Clinical Densitometry. 2013 Pediatric Position Development Conference: executive summary and reflections. *J Clin Densitom.* 2014;17(2):219–224.
6. Leonard, M. B., Shults, J., Elliott et al. Interpretation of whole body dual energy X-ray absorptiometry measures in children: comparison with peripheral quantitative computed tomography. *Bone*, 2004; 34(6), 1044–1052.
7. Taylor A, Konrad PT, Norman ME, Harcke HT. Total body bone mineral density in young children: influence of head bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 1997;12(4):652–655
8. Passariello, Simonetti, Bartolozzi et al. Compendio di radiologia (terza edizione). Napoli, 2010, Ildeson-Gnocchi, pp 772.
9. Crabtree NJ, Arabi A, Bachrach LK, et al. International Society for Clinical Densitometry. Dual-energy X-ray absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: the revised 2013 ISCD Pediatric Official Positions. *J Clin Densitom.* 2014;17(2):225–242.
10. Ministero della salute dipartimento della qualità direzione generale della programmazione sanitaria, dei livelli di assistenza e dei principi etici di sistema Individuazione dei criteri di Accesso alla Densitometria Ossea. SOURCE DOCUMENT II, Febbraio 2005.
11. Eastell R, Adams JE, Alsop C et al. A practical guide to Bone Densitometry in children. National Osteoporosis Society, 2004: 13-14.

12. Gafni RI, Baron J Overdiagnosis of osteoporosis in children due to misinterpretation of dual energy x-ray absorptiometry (DEXA). *J Pediatr.* 2004; 144: 253–257.
13. Bachrach LK. Osteoporosis in children: still a diagnostic challenge. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(6):2030–2032
14. Kelly TL, Specker B, Binkely N. Pediatric BMD reference database for US white children. *Bone* 2005;36:S30.
15. Zemel BS, Petit M. Evaluation. Bone densitometry in growing patients. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2006; 115– 125.
16. Kalkwarf HJ, Zemel BS, Gilsanz V et al. The Bone Mineral Density in Childhood Study: bone mineral content and density according to age, sex, and race. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:2087–2099
17. Gordon CM. Measurement of bone density in children. *Curr Opin Endocrinol Metab.* 2005; 12:444-451.
18. Wren TA, Liu T, Pitukcheewanont P, Gilsanz V. Bone acquisition in healthy children and adolescents: comparisons of DXA and CT measurements. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:1925-1928.
19. Fewtrell MS. British Pediatric & Adolescent Bone Group. Bone densitometry in children assessed by dual x-ray absorptiometry: uses and pitfalls. *Arch Dis Child.* 2003; 88:795-798.
20. Arabi A, Tamim H, Nabulsi M, et al. Sex differences in the effect of body-composition variables on bone mass in healthy children and adolescents. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:1428-1435.
21. Kalkwarf HJ, Zemel BS, Gilsanz V, et al. The Bone Mineral Density in Childhood Study (BMDCS): bone mineral content and density according to age, sex and race. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(6):2087-2099
22. Rauch F, Neu CM, Manz F et al. The development of metaphyseal cortex implications for distal radius fractures during growth. *J Bone Miner Res* 16:1547-1555.
23. Marcdante K, Kliegman R. Nelson, *Manuale di Pediatria* (ottava edizione), Milano. 2019, Edra, pp 708-709.
24. Bizzaro G, Antico A, Fortunato A. Vitamin D and Autoimmune Diseases: Is Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphism the Culprit? *Isr Med Assoc J.* 2017 Jul;19(7):438-443.

25. Dogru M, Kirmizibekmez H, Yesiltepe Mutlu RG et al. Clinical effects of vitamin D in children with asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014; 164:319–25.
26. Abrahamsen B, Masud T, Avenell A, et al. Patient level pooled analysis of 68 500 patients from seven major vitamin D fracture trials in US and Europe. *BMJ* 2010; 340: B5463
27. Lewis RD, Laing EM, Hill Gallant KM et al. A randomized trial of vitamin D(3) supplementation in children: dose-response effects on vitamin D metabolites and calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:4816–4825.
28. Abrams SA, Hawthorne KM, Chen Z. Supplementation with 1,000 IU vitamin D/day leads to parathyroid hormone suppression, but not increased fractional calcium absorption, in 4- to 8-year-old children: a double-blind randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2013; 97:217–223.
29. Viljakainen HT, Natri AM, Karkkainen M : A positive dose-response effect of vitamin D supplementation on site-specific bone mineral augmentation in adolescent girls: a double-blinded randomized placebocontrolled 1-year intervention. *J Bone Miner Res* 2006; 21:836–844.
30. Cheng S, Lyytikainen A, Kroger H. Effects of calcium, dairy product, and vitamin D supplementation on bone mass accrual and body composition in 10- to 12-year-old girls: a 2-year randomized trial. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82:1115–1126.
31. Khadilkar AV, Sayyad MG, Sanwalka NJ. Vitamin D supplementation and bone mass accrual in underprivileged adolescent Indian girls. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2010; 19:465–472.
32. Baroncelli, G. I., Bertelloni, S., Sodini, F., & Saggese, G. (2005). Osteoporosis in Children and Adolescents. *Pediatric Drugs*, 7(5), 295–323.
33. Molgaard C, Larnkjaer A, Cashman KD. Does vitamin D supplementation of healthy Danish Caucasian girls affect bone turnover and bone mineralization? *Bone* 2010; 46:432–439.
34. Ward KA, Das G, Roberts SA. A randomized, controlled trial of vitamin D supplementation upon musculoskeletal health in post menarchal females. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95:4643–4651.
35. El-Hajj Fuleihan G, Nabulsi M. Effect of vitamin D replacement on musculoskeletal parameters in school children: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:405–412.

36. Jorde R, Grimnes G. Vitamin D and health: the need for more randomized controlled trials. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015; 148:269–274.
37. Misra M, Pacaud D, Petryk A et al. Drug and therapeutics committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society: Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics* 2008;122, 398–417.
38. Wagner CL, Greer FR. Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents. *Pediatrics* 2008; 122:1142–1152.
39. Institute of Medicine: Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, The National Academies Press, 2011.
40. Abrams SA: What does it mean to target specific serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in children and adolescents? *Am J Clin Nutr* 2016;104: 1193–1194.
41. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. How the RDA for Vitamin D Was Determined Health and Medicine Division. Washington, DC, 2015. <http://www.nationalacademies.org/>.
42. Cancer Council Australia: Position Statement – Sun Exposure and Vitamin D – Risks and Benefits. National Cancer Control Policy, 2016.
43. Vatanparast H, Calvo MS, Green TJ et al. Despite mandatory fortification of staple foods, vitamin D intakes of Canadian children and adults are inadequate. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121:301– 303.
44. Black LJ, Seamans KM, Cashman KD et al. An updated systematic review and meta-analysis of the efficacy of vitamin D food fortification. *J Nutr* 2012; 142:1102–1108.
45. Holick MF, Biancuzzo RM, Chen et al. Vitamin D₂ is as effective as vitamin D₃ in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:677–681.
46. Munns C, Zacharin MR, Rodda CP et al. Prevention and treatment of infant and childhood vitamin D deficiency in Australia and New Zealand: a consensus statement. *Med J Aust*. 2006; 185(5):268 –272.
47. Ward, L. M., Konji, V. N., Ma J. et al. The management of osteoporosis in children. *Osteoporosis International*, 2016; 27(7), 2147–2179.
48. Gutmann H. D., Ferner E. R., Listernick R. Neurofibromatosis type 1. *Nat Rev Dis Primers*. 2017, 3:17004.

49. Kamiya N, Yamaguchi R, Aruwajoye O. Targeted Disruption of NF1 in Osteocytes Increases FGF23 and Osteoid with Osteomalacia-like Bone Phenotype. *J Bone Miner Res*. 2017; 32(8):1716-1726.
50. Malfait F, Francomano C, Byers P, et al. The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2017;175(1):8-26. doi:10.1002/ajmg.c.31552.
51. Fukada T, Civic N, Furuichi T et al. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS One*. 2008; 3:e3642.
52. Yen JL, Lin SP, Chen MR, Niu DM. Clinical features of Ehlers Danlos syndrome. *J Formos Med Assoc*. 2006; 105:475–80.
53. Stern CM, Pepin MJ, Stoler JM et al. Musculoskeletal conditions in a pediatric population with Ehlers Danlos syndrome. *J Pediatr*. 2017; 181:261–6.
54. Brady AF, Demirdas S, Fournel-Gigleux S, et al. The Ehlers-Danlos syndromes, rare types. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2017;175(1):70-115. doi:10.1002/ajmg.c.31550.
55. Heather N Yeowell, Beat Steinmann MD. PLOD1-Related Kyphoscoliotic Ehlers-Danlos Syndrome, 2018. GeneReviews.
56. Basalom S, Rauch F. Bone Disease in Patients with Ehlers-Danlos Syndromes. *Curr Osteoporos Rep*. 2020;18(2):95-102.
57. B4GALT7-related spondylodysplastic Ehlers-Danlos syndrome Disease, Orphanet, 2015. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=11083
58. Salter C. G., Davies, J. H. Further defining the phenotypic spectrum of B4GALT7 mutations. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2016. 170(6), 1556–1563.
59. Van Damme, T., Pang, X., Guillemin B. et al. Biallelic B3GALT6 mutations cause spondylodysplastic Ehlers–Danlos syndrome. *Human Molecular Genetics*. 2018; 27(20):3475-3487.
60. Jones KL, Schwarze U, Adam MP et al. A homozygous B3GALT3 mutation causes a severe syndrome with multiple fractures, expanding the phenotype of linkeropathy syndromes. *Am J Med Genet Part A*, 2015; 167A:2691–2696.

61. McDonald-McGinn D. M., Sullivan K. E. Chromosome 22q11.2 Deletion Syndrome (DiGeorge Syndrome/Velocardiofacial Syndrome). *Medicine*, 2011; 90(1), 1–18.
62. Homans JF, Tromp IN, Colo D. Orthopaedic manifestations within the 22q11.2 Deletion syndrome: A systematic review. *Am J Med Genet A*. 2018;176(10):2104-2120.
63. Ficcadenti A., Zallocco F., Neri R. et al. Bone density assessment in a cohort of pediatric patients affected by 22q11DS. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2015; 38: 1093–1098.
64. Stagi, S., Lapi, E., Gambineri et al. Bone density and metabolism in subjects with microdeletion of chromosome 22q11 (del22q11). *European Journal of Endocrinology*, 2010; 163: 329–337.
65. Filocamo M., Tomanin R., Bertola F. et al. Biochemical and molecular analysis in mucopolysaccharidoses: what a paediatrician must know. *Italian Journal of Pediatrics*, 2018; 44(suppl 2):129.
66. Sun, A. Lysosomal storage disease overview. *Annals of Translational Medicine*, 2018; 6(24): 476–476.
67. Wagner VF, Northrup H. Mucopolysaccharidosis Type III. 2019 Sep 19. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020.
68. Muenzer J. Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(5):4–12.
69. Spina V., Barbuti D., Gaeta A. et al. The role of imaging in the skeletal involvement of mucopolysaccharidoses *Italian Journal of Pediatrics*, 2018, 44 (suppl 2):118.
70. Nur B. G., Nur H., Mihci E. (2016). Bone mineral density in patients with mucopolysaccharidosis type III. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 35(3), 338–343.
71. Lin HY, Shih SC, Chuang CK et al. Assessment of bone mineral density by dual energy x-ray absorptiometry in patients with mucopolysaccharidoses. *Orphanet J Rare Dis*. 2013; 8:71.
72. Kim T, Harmatz P. Bone density assessment in patients with mucopolysaccharidosis: a preliminary report from patients with MPS II and VI. *J Pediatr Rehabil Med*. 2010; 3:13–23. 20.

73. Daugherty A. Achondroplasia: Etiology, Clinical Presentation, and Management. *Neonatal Network*, 2017; 36(6), 337–342.
74. Tachibana K, Suwa S, Nishiyama S et al. Study on height in patients with achondroplasia by national survey. *Shounika Sinryou* 1997;60: 1363–9.
75. Placone J, Hristova K. Direct assessment of the effect of the Gly380Arg achondroplasia mutation on FGFR3 dimerization using quantitative imaging FRET. *PLoS One*. 2012;7(10): e46678.
76. Su N, Sun Q, Li C, et al. Gain-of-function mutation in FGFR3 in mice leads to decreased bone mass by affecting both osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19: 1199–210.
77. Arita ES, Pippa MG, Marcucci M. Assessment of osteoporotic alterations in achondroplastic patients: a case series. *Clin Rheumatol.* 2013; 32(3):399-402.
78. Matsushita M., Kitoh H., Mishima et al. Low bone mineral density in achondroplasia and hypochondroplasia. *Pediatrics International* 2016; 58(8), 705–708.
79. Bilezikian, J. P., Brandi M. L., Cusano N. E. et al. Management of Hypoparathyroidism: Present and Future. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2016; 101(6), 2313–2324.
80. Mantovani, G. Pseudohypoparathyroidism: Diagnosis and Treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2011; 96(10), 3020–3030.
81. Balkissoon AR, Hayes CW. Case 14: intramedullary osteosclerosis. *Radiology*, 1999; 212:708–710
82. Sbrocchi AM, Rauch F, Lawson ML et al. Osteosclerosis in two brothers with autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b: bone histomorphometric analysis. *Eur J Endocrinol.* 2011, 164: 295–301.
83. Long DN, Levine MA, Germain-Lee EL. Bone mineral density in pseudohypoparathyroidism type 1a. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95:4465–4475.
84. Tonin R, Caciotti A, Funghini S, et al. Clinical relevance of short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency: Exploring the role of new variants including the first SCAD-disease-causing allele carrying a synonymous mutation. *BBA Clin.* 2016; 5:114-119.

85. Van Maldegem BT, Wanders RJ, Wijburg FA. Clinical aspects of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(5):507-11.
86. Van Maldegem BT, Duran M, Wanders RJ, Waterham HR, Wijburg FA. Flavin adenine dinucleotide status and the effects of high-dose riboflavin treatment in short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res.* 2010;67(3):304-308.
87. Hruska K.S., La Marca M.E., Scott C.R et al. Gaucher disease: Mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum. Mutat.* 2008, 29, 567–583.
88. Vaccaro A.M., Motta M., Tatti M. et al. Saposin C mutations in Gaucher disease patients resulting in lysosomal lipid accumulation saposin C deficiency, but normal prosaposin processing and sorting. *Hum. Mol. Genet.* 2010, 19, 2987–2997
89. Allen M.J., Myer B.J., Khokher A.M. et al. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: Increased release of interleukin-6 and interleukin-10. *Mon. J. Assoc. Phys.* 1997, 90, 19–25.
90. Kaplan, P., Andersson H.C., Kacena K.A. The clinical and demographic characteristics of non neuronopathic Gaucher disease in 887 children at diagnosis. *Arch. Pediatrics Adolesc. Med.* 2006, 160, 603–608
91. Regenboog M., Bohte A. E.; Somers I. et al. Imaging characteristics of focal splenic and hepatic lesions in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol. Dis.* 2016, 60, 49–57.
92. Gillis S., Hyam E., Abrahamov A et al. Platelet function abnormalities in Gaucher disease patients. *Am. J. Hematol.* 1999, 61, 103–106.
93. Mistry P.K., Sirrs S., Chan A. et al. Pulmonary hypertension in type 1 Gaucher's disease: Genetic and epigenetic determinants of phenotype and response to therapy. *Mol. Genet. Metab.* 2002, 77, 91–98.
94. Santoro D., Rosenbloom B.E., Cohen A.H. Gaucher disease with nephrotic syndrome: Response to enzyme replacement therapy. *Am. J. Kidney Dis.* 2002, 40, E4.
95. Mignot C., Doummar D., Maire I. et al. French Type 2 Gaucher Disease Study Group. Type 2 Gaucher disease: 15 new cases and review of the literature. *Brain Dev.* 2006, 28, 39–48
96. Tyłki-Szymanska A., Vellodi A., El-Beshlawy A. et al. Neuronopathic Gaucher disease: Demographic and clinical features of 131 patients enrolled in the International

Collaborative Gaucher Group Neurological Outcomes Subregistry. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2010, 33, 339–346.

97. Mignot C., Gelot A., Bessieres B et al. Perinatal-lethal Gaucher disease. *Am. J. Med. Genet. Part A* 2003, 120A, 338–344.

98. Marcucci G., Zimran A., Bembi B. et al. Gaucher Disease and Bone Manifestations. *Calcified Tissue International*,2014; 95(6), 477–494.

99. Wenstrup R.J.; Roca-Espiau M.; Weinreb N.J. et al. Skeletal aspects of Gaucher disease: A review. *Br. J. Radiol.* 2002, 75 (Suppl. S1), A2–A12.

100. Clarke L.A., Hollak C.E. The clinical spectrum and pathophysiology of skeletal complications in lysosomal storage disorders. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015, 29, 219–235.

101. Mikosch P., Hughes D. An overview on bone manifestations in Gaucher disease. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 2010; 160(23-24), 609–624.

102. Ciana G, Addobbati R, Tamaro G. Gaucher disease and bone: laboratory and skeletal mineral density variations during a long period of enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis.* 2005; 28(5):723-32.

103. Bayer M. Reference values of osteocalcin and procollagen type I N-propeptide plasma levels in a healthy Central European population aged 0-18 years. *Osteoporos Int.* 2014;25(2):729-736.

104. Brent M. B., Brüel, A., Thomsen J. S. PTH (1–34) and growth hormone in prevention of disuse osteopenia and sarcopenia in rats. *Bone*,2018; 110, 244–253.

105. Kasper, Fauci, Hauser et al. *Harrison, Principi di Medicina Interna* Vol 2,19a edizione. Casa Editrice Ambrosiana,2017; pp 3208-3209.

106. Mishra PE, Schwartz BL, Sarafoglou K. Short-Term PTH (1-34) Therapy in Children to Correct Severe Hypocalcemia and Hyperphosphatemia due to Hypoparathyroidism: Two Case Studies. *Case Rep Endocrinol.* 2016; 2016:6838626.

107. Soeiro E. M. D., Castro L., Menezes R. et al. Association of parathormone and alkaline phosphatase with bone turnover and mineralization in children with CKD on dialysis: effect of age, gender, and race. *Pediatric Nephrology* 2020.

108. Karalus J, Chlebna-Sokół D. The clinical efficacy of vitamin D in children with primary low bone mass. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2011;17(1):35-40.

109. Rao YK, Midha T, Singh S. vitamin D level and bone mineral accrual in children with vitamin D deficiency. *Korean J Pediatr.* 2016; 59(7):292-7.
110. Viljakainen H. T., Natr A.-M., Kärkkäinen M. A Positive Dose-Response Effect of Vitamin D Supplementation on Site-Specific Bone Mineral Augmentation in Adolescent Girls: A Double-Blinded Randomized Placebo-Controlled 1-Year Intervention. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2006; 21(6), 836–844.
111. Zierk J, Arzideh F, Haeckel R, et al. Pediatric reference intervals for alkaline phosphatase. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(1):102-110.
111. Millán JL, Whyte MP. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int.* 2016;98(4):398-416.
113. Kasper, Fauci, Hauser et al. Harrison, Principi di Medicina Interna Vol 2, 19a edizione. Casa Editrice Ambrosiana, 2017; pp 3255-3256.
114. Thiagarajan NR, Kumar CGD, Sahoo J. Effect of Vitamin D and Calcium Supplementation on Bone Mineral Content in Children with Thalassemia. *Indian Pediatr.* 2019 Apr 15;56(4):307-310.
115. Banerjee S., Basu S., Sen A. et al. The effect of vitamin D and calcium supplementation in pediatric steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology*, 2017; 32(11), 2063–2070.
116. Bak M, Serdaroglu E, Guclu R. Prophylactic calcium and vitamin D treatments in steroid-treated children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21:350–354
117. Pekkinen M, Laine CM, Mäkitie R. FGF23 gene variation and its association with phosphate homeostasis and bone mineral density in Finnish children and adolescents. *Bone.* 2015; 71:124-30.
118. Bai X, Miao D, Li J. Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders. *Endocrinology* 2004; 145: 5269–5279.
119. Barros NM, Hoac B, Neves RL et al. Proteolytic processing of osteopontin by PHEX and accumulation of osteopontin fragments in Hyp mouse bone, the murine model of X-linked hypophosphatemia. *J Bone Miner Res.* 2013; 28: 688–699.
120. TuQ, PiM, Karsenty G, Simpson L et al. Rescue of the skeletal phenotype in CasR-deficient mice by transfer onto the Gcm2 null background. *J Clin Invest.* 2003; 111: 1029–1037.

121. De Boer I. H., Rue T. C., Kestenbaum B. Serum Phosphorus Concentrations in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *American Journal of Kidney Diseases*. 2009; 53(3), 399–407.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei in primo luogo, ringraziare il Professor Carlo Catassi, per avermi accettata come tesista e consentito di frequentare il suo reparto, questa è stata un'esperienza per me fondamentale che mi ha permesso di incrementare l'interesse nell'ambito della Pediatria.

Un ringraziamento speciale va alle Dottoresse Lucia Santoro e Rosanna Cordiali che mi hanno seguito costantemente nella stesura e nella correzione della tesi, indirizzandomi nello studio del complesso e meraviglioso ambito trattato. Le ringrazio anche perché entrambe sono per me un esempio, non solo di applicazione rigorosa delle conoscenze e competenze scientifiche nel loro lavoro quotidiano ma anche e soprattutto esempio di umanità e dedizione, valori che desidero portare avanti nella futura professione.

Ringrazio anche la Dottoressa Gilberta Giacchetti, per la disponibilità che mi ha dimostrato nell'inviarmi alcuni risultati che ho inserito nel lavoro.

Un ultimo ringraziamento va a mio fratello Matteo Bellagamba, ingegnere e appassionato di matematica per avermi aiutato nella realizzazione della parte statistica e dell'impaginazione.

Elaborare e scrivere la tesi è stato un lavoro complesso, specialmente nei limiti stabiliti dal particolare momento storico, ma mi ha anche dato una grande soddisfazione, a conclusione di un lungo percorso durato sei anni. Vorrei per questo ringraziare tutte le persone che mi hanno supportato nei miei studi a partire dai miei genitori, costanti sostenitori, fino a tutti i miei amici, senza di loro probabilmente non sarei mai arrivata a questo traguardo.