

**Sezione I:
Fisiologia e Fisiopatologia**

1. Metabolismo calcio-fosforico: ruolo del rene, dell'intestino e delle paratiroidi

Alessandro Piovesan

Introduzione

Il calcio è un catione divalente, fondamentale per la regolazione di numerosi processi fisiologici. Nell'organismo adulto sono contenuti, a seconda del peso, da 1 a 2 Kg di calcio, distribuiti nei compartimenti intra- ed extra-cellulare (tab 1.1).

Tabella 1.1
Compartimenti e funzione del calcio nell'organismo

Forma	Localizzazione	Quantità (% del totale)	Funzione
Extra-cellulare	solubile	Comparto extra-cellulare	1 g (0.1%) Coagulazione Generazione di chinine Regolazione del potenziale di membrana cellulare Esocitosi Contrattilità
	insolubile	Ossa e denti	2 Kg (99%) Protezione e integrità strutturale Motilità Deposito
Intra-cellulare	solubile	Citosol, Nucleo	0.2 mg Potenziali di azione Contrattilità e motilità Regolazione metabolica Funzioni del citoscheletro Divisione cellulare Secrezione
	insolubile	Membrane cellulari Reticolo endoplasmatico Mitocondri Altri organelli	9 g (0.9%) Integrità strutturale Deposito

Il calcio **extra-cellulare** è contenuto principalmente in forma insolubile nelle ossa (circa il 99% del calcio corporeo):

- 69% inorganico, in forma di idrossiapatite;
- 22% organico, nel collagene (90%) e nelle proteine strutturali non collagene (proteoglicani, sialoproteine, osteocalcina, α_2 HS-glicoproteine).

Fornisce resistenza e integrità allo scheletro (il più importante deposito del minerale nell'organismo) per le sue funzioni di supporto, protezione e motilità.

Il calcio extra-cellulare solubile (< 0.1% del totale) è fondamentale per la regolazione di molti processi biologici, quali le trasmissioni nervosa e neuromuscolare, la contrattilità muscolare, la secrezione ormonale, l'attivazione dei potenziali di membrana cellulare, la coagulazione e come cofattore enzimatico. La tabella 1.2 mostra le diverse frazioni riferite ad una calcemia totale di 10 mg/dL.

Tabella 1.2
Frazioni del calcio extra-cellulare solubile

Non diffusibile: 3.5 mg/dL	Legato ad albumina: 2.8 mg/dL Legato a globuline: 0.7 mg/dL	
Diffusibile: 6.5 mg/dL	Ionizzato: 5.3 mg/dL	
	Complessato: 1.2 mg/dL	Bicarbonato: 0.6 mg/dL Cittrato: 0.3 mg/dL Fosfato: 0.2 mg/dL

I livelli sierici di **calcio ionizzato** (la quota sottoposta a regolazione metabolica), essenziali per lo svolgimento delle funzioni fisiologiche, sono mantenuti, attraverso un complesso controllo ormonale, in uno stretto intervallo, ottimale per gli scambi intra- ed extra-cellulari.

Il calcio **intra-cellulare** è circa l'1% del totale: la sua componente solubile è presente nel citosol e nel nucleo, mentre la componente insolubile contribuisce alla stabilità delle membrane cellulari, del reticolo endoplasmatico, dei mitocondri e dei granuli intra-cellulari, oltre che fungere da deposito intra-cellulare. Anche il calcio intra-cellulare, considerato un secondo messaggero, è sottoposto a regolazione molto raffinata, sebbene a concentrazioni molti ordini di grandezza inferiori rispetto a quelle del calcio extra-cellulare, attraverso la regolazione degli scambi intra- ed extra-cellulari con meccanismi di trasporto attivi e passivi.

Il **fosforo**, il cui contenuto totale varia da 600 a 1000 g, è distribuito nell'organismo in maniera più diffusa rispetto al calcio ed è di fondamentale importanza per molte funzioni biologiche. Circa il 65% del fosforo è contenuto nello scheletro come idrossiapatite, mentre il 15% è nel comparto extra-scheletrico (fosfoproteine, fosfolipidi, acidi nucleici). Nel sangue è rappresentato dai fosfati (H_2PO_4 e HPO_4), anche se la sua concentrazione plasmatica è misurata come fosforo. I livelli di fosforo circolante oscillano tra 2.5 e 4.5 mg/dL: non sono controllati in maniera così fine come il calcio, ma sono influenzati direttamente dal contenuto di fosforo nella dieta.

Regolazione del bilancio calcio-fosforico

I livelli circolanti di calcio sono mantenuti in un ristretto intervallo di concentrazioni, attraverso un complesso controllo metabolico che vede come elementi fondamentali:

- l'assorbimento intestinale;
- l'escrezione e il riassorbimento renale, regolati indirettamente dai livelli plasmatici del paratormone (PTH), prodotto dalle paratiroidi, attraverso la vitamina D;
- il riassorbimento osseo, attraverso l'attivazione degli osteoclasti mediata dagli osteoblasti.

Il ruolo fisiologico di altri ormoni, in particolare gli estrogeni e la calcitonina, appare minore e non del tutto chiarito.

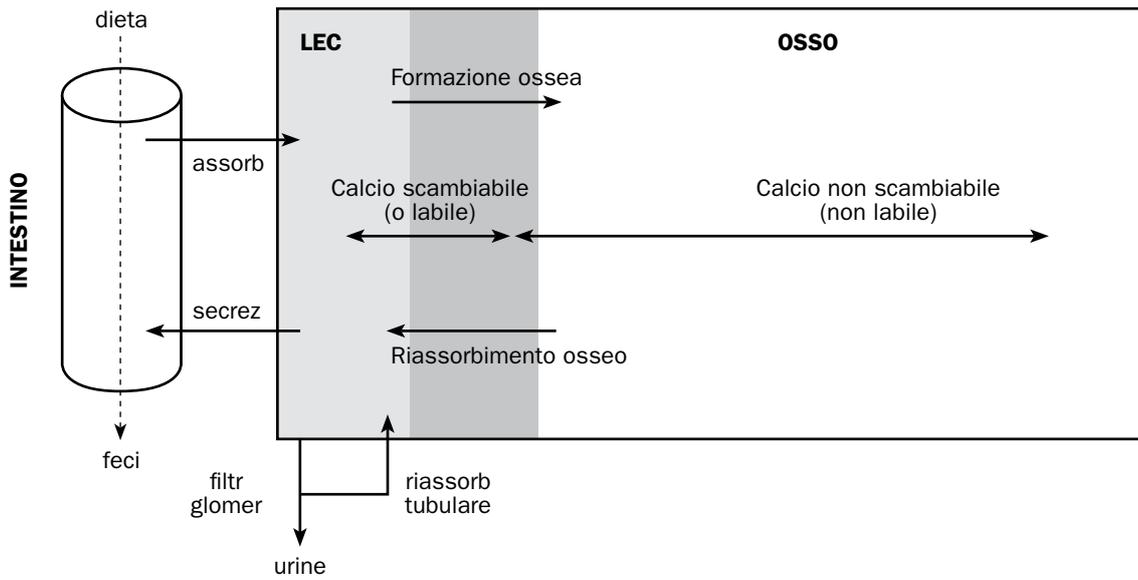


Figura 1.1
Scambi del calcio fra i compartimenti

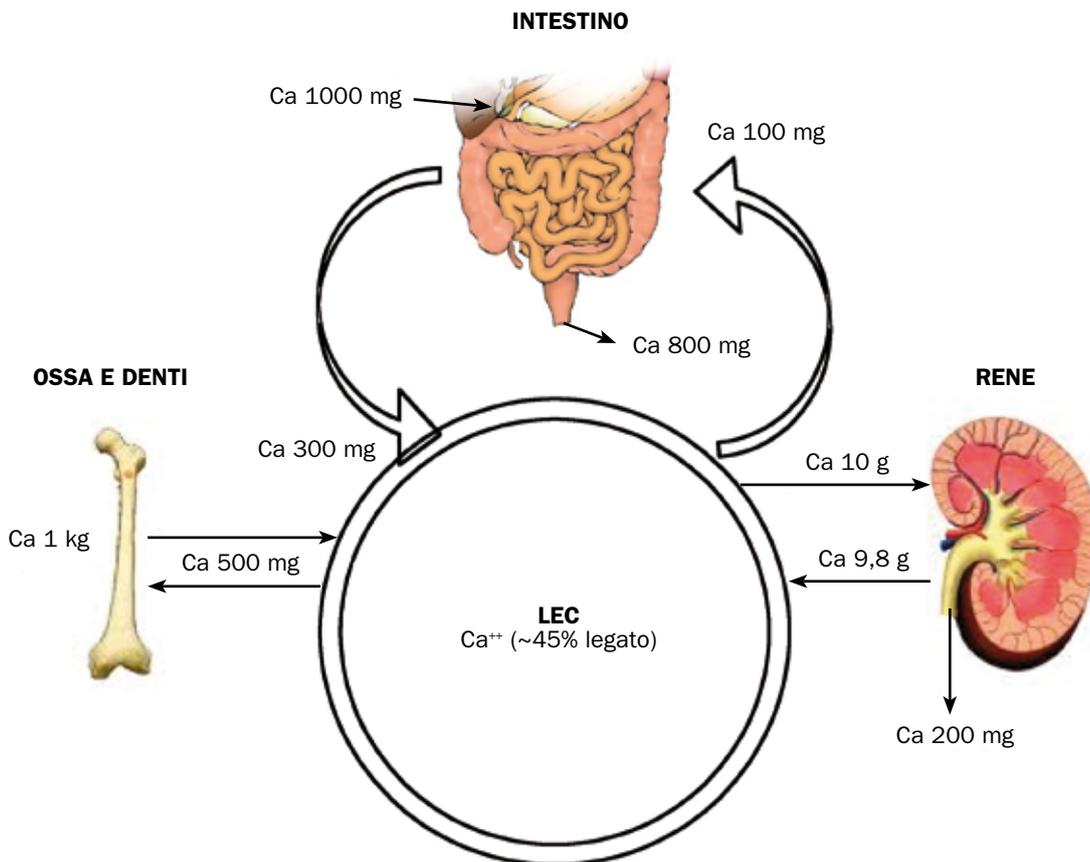


Figura 1.2
Scambi quantitativi del calcio fra i compartimenti

Ruolo dell'intestino

Si considera, in media, adeguato un **apporto di calcio** di circa 1 g/die, ma tale quota deve essere incrementata in particolari condizioni fisiologiche (accrescimento, gravidanza, allattamento, menopausa).

L'assorbimento intestinale del calcio e del fosforo introdotti con l'alimentazione è incompleto, sia perchè nel lume intestinale i due ioni possono formare sali insolubili (ossalato di calcio, fosfato di calcio e fosfato di magnesio), sia a causa della necessità di congrui livelli di 1,25(OH)₂-vitamina D (calcitriolo) (*cf. cap 3*) perchè calcio e fosforo siano assorbiti. Circa il 50% del calcio introdotto con l'alimentazione è assorbito a livello intestinale, con meccanismi a livello ileale di **trasporto passivo** (gradiente osmotico tra lume intestinale e torrente circolatorio, dipendente dalle concentrazioni intestinali di calcio) e a livello del piccolo intestino di **trasporto attivo**. Il trasporto attivo contro gradiente è vitamina D-dipendente, presumibilmente attraverso l'espressione di calbindina, proteina integrale di membrana, e fosfatasi alcalina (fig 1.1). In media, dei 1000 mg/die introdotti, 300 mg/die sono assorbiti nell'intestino, mentre altri 100 mg sono secreti nel lume intestinale: al termine del processo digestivo, pertanto, 800 mg/die vengono escreti nelle feci. In condizioni fisiologiche altri 200 mg/die vengono escreti a livello renale, mantenendo il bilancio in pareggio. Una piccola quota di calcio è persa attraverso la traspirazione.

Viene considerata ottimale l'**assunzione** di circa 1 g/die di **fosforo**. Il suo **assorbimento** avviene distalmente al duodeno, con meccanismi di trasporto attivo e passivo, in parte dipendenti dal calcio. Circa il 60-80% dell'assorbimento avviene attraverso un processo di diffusione, controllato anche dal calcitriolo che ne è il principale regolatore ormonale. Il fosfato escreti nelle feci è costituito in parte dal residuo non assorbito e in parte dalla quota secreta. La regolazione dell'omeostasi del fosforo avviene principalmente a livello renale.

Ruolo del rene

Sebbene l'assorbimento intestinale di calcio sia < 500 mg/die, ogni giorno vengono filtrati e riassorbiti oltre 10.000 mg/die, di cui solo una piccola parte (200 mg/die) sono escreti nelle urine. È perciò evidente l'importanza del rene nella regolazione dell'omeostasi calcica.

Circa il 65% del **calcio** filtrato è riassorbito nel tubulo prossimale, con un meccanismo di scambio sodio-calcio, e un'altra piccola quota è riassorbita nel tubulo distale, con meccanismi indipendenti dall'azione del PTH. L'effetto diretto del PTH riguarda dal 25 al 30% del calcio filtrato e avviene attraverso l'attivazione di specifiche adenilato-ciclastasi, prevalentemente nel tubulo distale e nel segmento di connessione, e delle fosfolipasi nel tubulo prossimale. In generale l'azione del PTH è quella di ridurre l'escrezione renale di calcio (e di conseguenza la calciuria), rispetto ai valori di calcio plasmatici. PTH attiva inoltre l'1 α -idrossilasi, promuovendo la sintesi di calcitriolo.

Ancora più importante è il ruolo del rene nell'omeostasi del **fosforo**. Il riassorbimento renale è il principale meccanismo di regolazione dei livelli plasmatici di fosforo. Solitamente la capacità di riassorbimento è espressa attraverso la soglia massima di riassorbimento del fosfato in rapporto al filtrato glomerulare (TMP/VFG), che, sebbene misurabile direttamente, nella pratica clinica viene ricavata indirettamente a partire da fosfato e creatinina sierici e fosfaturia. Oltre il 90% del fosforo circolante è filtrato a livello renale e circa l'80% è riassorbito nel tubulo convoluto prossimale. L'introito dietetico e il PTH sono i principali regolatori dei livelli di fosforo circolante. Il PTH riduce il riassorbimento prossimale e distale del fosfato inibendo il cotrasporto sodio-fosforo, ma riduce l'escrezione urinaria di fosforo aumentando la sintesi di calcitriolo. In caso di riduzione dell'introito dietetico

di fosforo, da cui deriva una riduzione della fosforemia, vengono incrementate espressione genica e sintesi dei cotrasportatori sodio-potassio e di calcitriolo, con il risultato finale di inibire l'escrezione urinaria di fosfato, provocandone la risalita dei livelli plasmatici. Insulina e GH incrementano il riassorbimento prossimale del fosfato, mentre i glucocorticoidi hanno un effetto fosfaturico. Recentemente è stato scoperto come il *fibroblast growth factor 23* (FGF-23) di derivazione ossea, la cui sintesi è modulata da PTH, calcitriolo e fosfato, sia un importante regolatore del metabolismo fosforico, promuovendo l'escrezione renale di fosforo, definendo un nuovo asse paratiroidi-osso-rene nella regolazione dell'omeostasi del fosforo.

Le paratiroidi e il tessuto osseo

Le paratiroidi hanno un ruolo centrale nel metabolismo calcio-fosforico. Il PTH è il principale regolatore ormonale diretto e indiretto, attraverso la vitamina D, dei livelli di calcio e fosforo circolante. I livelli di calcio sono rilevati da recettori specifici (*calcium-sensing receptor*, CaSR) espressi sulla membrana delle cellule paratiroidi (e anche nelle cellule C parafollicolari della tiroide, ove regolano la secrezione di calcitonina): alle variazioni della calcemia rilevata dal recettore, consegue una modifica nella secrezione del PTH. I polimorfismi del gene per il CaSR rendono ragione, almeno in parte, della variabilità individuale nelle concentrazioni sieriche di calcio, mentre le mutazioni inattivanti sono alla base di alcune condizioni di ipercalcemia (FHH o iperparatiroidismo neonatale) (*cfr cap 10a*). Il calcio regola anche la trascrizione del gene per la sintesi del PTH. Sono importanti adeguati livelli di magnesio circolante: l'ipomagnesiemia protratta riduce, infatti, la sintesi del PTH.

Gli effetti del PTH a livello scheletrico sono complessi, sebbene si possano riassumere in una stimolazione del riassorbimento osseo, cui consegue un rialzo della calcemia. I recettori per il PTH (glicoproteina di membrana della famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G) sono presenti sugli osteoblasti. Questi ultimi sembrano indurre, attraverso il sistema osteoprotegerina-RANK (*cfr cap 2*), l'attivazione degli osteoclasti in un complesso sistema di interazioni paracrine ed endocrine. Livelli cronicamente elevati di PTH promuovono il riassorbimento osseo, prevalentemente corticale quale si osserva nell'iperparatiroidismo (*cfr cap 8*), mentre livelli appena modestamente elevati sembrano avere un effetto di stimolo dell'attività osteoblastica.

Bibliografia

- Brown EM. *Physiology of Calcium Metabolism*. In: Becker et al (Eds). *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, 2nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1995: pp 437-47.
- Brown EM. *Physiology of Calcium Homeostasis*. In: Bilezikian JP, Marcus R, Levine A (Eds). *The Parathyroids*, 2nd Ed. Raven Press, 2001: pp 167-82.
- Burton DR. *Hormonal regulation of calcium and phosphate balance*. In "Uptodate.com" © 2010.
- Defeo LM. *Calcium and phosphate homeostasis*. In "Endotext.org" 2010.
- Drezner MK. *Phosphorus homeostasis and related disorders*. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (Eds). *Principles of Bone Biology*, 2nd Ed. Academic Press, 2002: pp 321-38.
- Favus MJ. *Intestinal absorption of calcium, magnesium, and phosphorus*. In: Coe FL and Favus MJ (Eds). *Disorders of Bone and Mineral Metabolism*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1992: pp 57-82.
- Yanagawa N, Lee DBN. *Renal handling of calcium and phosphorus*. In: Coe FL and Favus MJ (Eds). *Disorders of Bone and Mineral Metabolism*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1992: pp 3-40.
- Bruder JM, Guise TA, Mundy GR. *Mineral metabolism*. In: Felig P and Frohman LA (Eds). *Endocrinology & Metabolism*, 4th Ed. McGraw-Hill, 2001: pp 1079-59.
- Bhouhtiauy I, Lajeunesse D, Brunette MG. *The mechanism of parathyroid hormone action on calcium reabsorption by the distal tubule*. *Endocrinology* 1991, 128: 251-8.

- Murer H, Wermner A, Reshkin S, et al. Cellular mechanism in proximal tubular reabsorption of inorganic phosphate. Am J Physiol Cell Physiol 1991, 260: C885-99.*
- Tomoe Y, Segawa H, Shiozawa K. Phosphaturic action of fibroblast growth factor 23 in Npt2 null mice. Am J Physiol Renal Physiol 2010, 298: F1341-50.*

2. L'unità funzionale ossea

Alessandro Piovesan

Introduzione

L'osso è uno speciale tessuto connettivo mineralizzato che, insieme alla cartilagine, costituisce lo scheletro.

Lo **scheletro** ha funzioni meccaniche (supporto, sostegno, protezione e locomozione) e metaboliche. È costituito da una componente organica e da una inorganica ed è il principale deposito nell'organismo di calcio e fosforo, che possono essere immessi nel torrente circolatorio in risposta a particolari esigenze funzionali.

- La **componente organica**, o matrice ossea, è costituita soprattutto da **collagene di tipo I**, prodotto principalmente dagli osteoblasti. Il suo processo sintetico (fig 2.1), controllato da specifici geni, prevede, in una prima fase, la sintesi all'interno del reticolo endoplasmatico di tre catene peptidiche (due α_1 e una α_2), note come pre-procollagene. Le tre catene sono caratterizzate dalla presenza di peptidi NH- e COOH-terminali, destinati ad essere rimossi (peptidi di registrazione), oltre ad un peptide di segnale. All'interno del reticolo endoplasmatico avviene, attraverso un processo vitamina C-dipendente, l'idrossilazione dei residui di lisina e prolina e quindi la loro glicosilazione, che consente di dar luogo alla struttura elicoidale. Si forma così il procollagene di tipo I, che viene secreto in sede extra-cellulare. In questa sede, specifiche peptidasi rimuovono i propeptidi NH- e COOH-terminali del procollagene, liberandoli nello spazio extra-cellulare e quindi in circolo (dove possono essere misurati come indici di sintesi del collagene), ma anche all'interno della cellula, ove regolano la sintesi stessa del collagene con un meccanismo a *feed-back*. Dopo la rimozione dei propeptidi, l'enzima lisil-ossidasi (che lega tra loro i residui di idrossilisina e lisina) forma legami covalenti crociati (*cross-link*) di tipo intra- ed inter-molecolare che uniscono le diverse molecole di collagene a formare le vere e proprie fibrille. Con la maturazione della molecola di collagene, aumentano i *cross-link* inter-molecolari di tipo non riducibile, responsabili della resistenza meccanica delle fibre.

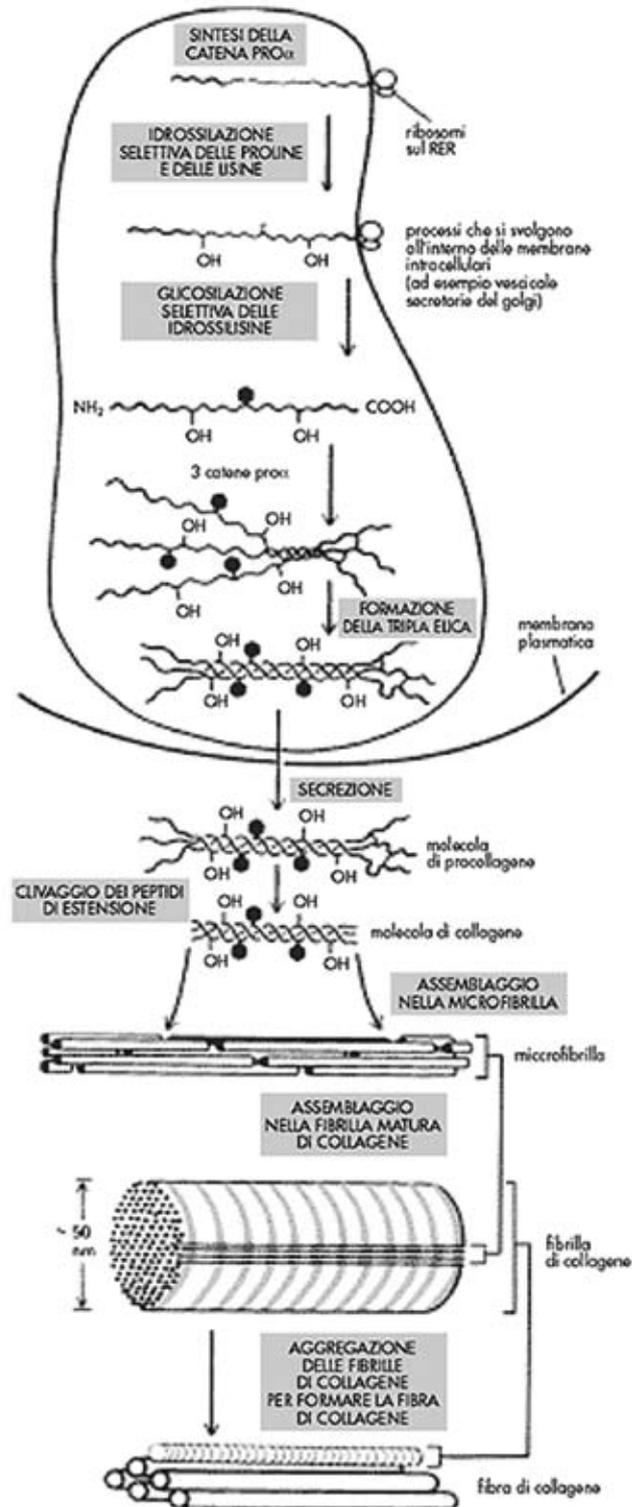


Figura 2.1

Eventi intra- ed extra-cellulari coinvolti nella formazione delle fibrille di collagene. L'assemblaggio si compie dalla porzione C- a quella N-terminale. La processazione post-trascrizionale delle molecole di procollagene è indotta da numerose modificazioni enzimatiche. È rappresentata la formazione da parte delle fibrille di collagene di regolari strutture extra-cellulari e il loro assemblaggio nelle grandi fibre collageniche. Non sono rappresentati i *cross-link* covalenti che stabilizzano le fibre extra-cellulari.

La matrice organica contiene anche **proteine non collagene** (tab 2.1), importanti per regolare la mineralizzazione e rafforzare il legame delle fibre collagene. Tra queste rivestono particolare importanza l'osteocalcina (la più rappresentata) e la *matrix Gla protein*, entrambe vitamina K-dipendenti per la sintesi. Sembrano avere la funzione di ritardare il processo di mineralizzazione, consentendo alla matrice di consolidarsi prima di unirsi ai cristalli di idrossiapatite.

Tabella 2.1
Proteine ossee non collagene

Proteina	Funzione
Osteocalcina	Stabilizza l'idrossiapatite Lega il calcio Chemiotattica per i monociti Regola l'osteosintesi Modula l'insulino-resistenza
<i>Matrix-GLA-protein</i>	Inibisce la mineralizzazione ossea
Osteonectina	Lega calcio, apatite e proteine della matrice Regola l'adesione cellulare
Osteopontina	Adesione cellulare (via sequenza RGD, sequenza aminoacidica Arg-Gly-Asp, sede elettiva di adesione cellulare) Lega il calcio
α_2 -HS-Glicoproteina	Chemiotassi per i monociti Mineralizzazione
<i>Bone Sialoprotein II</i>	Adesione cellulare (via sequenza RGD) Lega il calcio
Propeptide N-terminale dell' α_1 -procollagene tipo I	Residuo del catabolismo del collagene
Biglicano (Proteoglicano I)	Regola la crescita di fibre collagene Mineralizzazione e osteosintesi Lega fattori di crescita
Decorina (Proteoglicano II)	Fibrillogenesi del collagene Lega fattori di crescita
Trombospondina & Fibronectina	Adesione cellulare (via sequenza RGD) Lega fattori di crescita Formazione di idrossiapatite
Fattori di crescita (IGF-I, IGF-II), <i>transforming growth factor</i> (TGF)- β , <i>bone morphogenetic proteins</i> (BMPs)	Differenziazione, proliferazione e attività degli osteoblasti Inducono l'osteosintesi e la sintesi di cartilagine nell'osteogenesi e nella guarigione di fratture

La **componente inorganica** dell'osso, costituita essenzialmente da idrossiapatite, contiene anche tracce di altri minerali, quali fluoro e pirofosfato, che sembrano contribuire alla regolazione del metabolismo scheletrico.

Nelle ossa è possibile trovare due tipi di tessuto scheletrico:

- l'**osso corticale** (o compatto), calcificato all'80-90%, costituisce la parte esterna delle strutture scheletriche, di cui rappresenta oltre l'80%, con prevalenti funzioni di supporto e protezione, ma che può essere coinvolto in processi metabolici;
- l'**osso trabecolare** (o spongioso), calcificato solo per il 15-25% e, per il resto, costituito da matrice proteica (prevalentemente collagene di tipo I, ma anche proteine non collagene di derivazione osteoblastica o dal torrente circolatorio, tra cui la più importante è l'osteocalcina), contenuto nei corpi vertebrali, nel collo del femore e all'interno delle altre ossa.

Le cellule del tessuto osseo

Gli osteoblasti

Derivano da precursori mesenchimali totipotenti, che possono differenziarsi in muscoli, adipociti, cartilagine o tessuto fibroso o, specificamente, in osteoblasti, in grado di produrre la matrice organica dell'osso. Sono di solito raggruppati in aggregati cellulari lungo la superficie ossea. Mantengono rapporti con gli osteociti e con gli osteoclasti; di questi ultimi, regolano la differenziazione e l'attività di riassorbimento, in un complesso sistema di inter-relazione all'interno dell'unità funzionale ossea.

L'**attività** degli osteoblasti è **regolata** da meccanismi endocrini, autocrini e paracrini, attraverso il legame a recettori specifici di ormoni e fattori di crescita, tutti diversamente coinvolti nella regolazione del metabolismo osseo: PTH/PTH-rP, GH, ormoni tiroidei, insulina, calcitriolo, ormoni sessuali, glucocorticoidi, progesterone, PRL, IL-1, TNF- α , prostaglandine, IGFs, TGF- β , BMP, FGF e *platelet-derived growth factor* (PDGF). Sono inoltre in grado di produrre prostaglandine, IL-6, IGF e IGF-BPs, TGF- β , BMP, FGF, PDGF, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e integrine, coinvolte nell'adesione alla superficie ossea. Alcune citochine prodotte dagli osteoblasti sono regolatori fondamentali della differenziazione e proliferazione degli osteoclasti, in particolare il *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) e il sistema RANK-L/osteoprotegerina.

La **sintesi** della **matrice** organica e la sua successiva **mineralizzazione** avvengono secondo una sequenza coordinata: gli osteoblasti producono dapprima collagene e fosfatasi alcalina e quindi le proteine non collagene della matrice (osteocalcina, BMP, osteopontina) che vengono rilasciate sulla superficie ossea; la mineralizzazione avviene a distanza di qualche giorno, onde consentire la stabilizzazione dei legami di *cross-link* tra le fibre collagene, per migliorarne robustezza e resistenza.

Gli osteoblasti assumono **aspetti morfologici eterogenei** nelle diverse fasi funzionali: quando sono metabolicamente attivi hanno aspetto colonnare con ricco reticolo endoplasmatico, mentre tendono ad appiattirsi in fase di riposo funzionale.

Gli osteociti e le *bone lining cells*

Gli osteociti sono le cellule più numerose nel tessuto osseo, derivate dagli osteoblasti che, perdendo progressivamente la capacità di produrre collagene, si trovano intrappolati nella matrice ossea calcificata, all'interno di piccole lacune. Sono dotati di lunghi processi, ricchi in microfilamenti, che decorrono all'interno dei canalicoli di Havers, contraendo rapporti con gli osteoblasti e le *lining cells*.

È recente la scoperta del ruolo centrale degli osteociti nella regolazione del rimodellamento osseo. Tale sincizio di cellule interconnesse rappresenta una vera e propria rete informativa per trasmettere segnali, probabilmente attraverso la via dell'NO, che **trasformano** le **informazioni meccaniche** relative ai microdanneggiamenti dell'osso in **segnali biochimici** che possono regolare il riassorbimento osseo, presumibilmente attraverso il reclutamento degli osteoclasti, che avviene in seguito all'apoptosi degli osteociti.

Gli osteoclasti

Gli osteoclasti sono cellule giganti (fino a 100 μ m), multinucleate (da 2 a 20 nuclei), con abbondanza di citoplasma, reticolo endoplasmatico e mitocondri, reperibili in gruppo sulla superficie ossea.

Derivano da precursori staminali totipotenti (*colony-forming unit - granulocyte, macrophage, CFU-GM*), presumibilmente di origine extra-scheletrica (midollo, milza, circolo ematico). La differenziazione monocitaria/macrofagica avviene sotto lo stimolo dell'M-CSF.

Aderiscono alla matrice ossea calcificata, attraverso una parte della membrana cellulare, la zo-

na chiara o zona di adesione, che circonda un'area di membrana particolarmente convoluta, il cosiddetto orletto striato, dove avviene attivamente il riassorbimento, attraverso l'azione di specifici enzimi, quali la fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP), la catepsina K e l'anidrasi carbonica di tipo 2. Il **riassorbimento osseo** avviene attraverso l'acidificazione dell'idrossiapatite e la proteolisi del collagene della matrice ossea.

Formazione e attivazione degli osteoclasti avvengono attraverso una stretta interazione con gli osteoblasti e le cellule stromali, attraverso la **via RANK-L/osteoprotegerina (OPG)**. Il legame del ligando specifico RANK-L con il recettore RANK (*Receptor Activator for Nuclear Factor KB*, recettore presente sulla superficie degli osteoclasti e dei loro precursori, che attiva il fattore nucleare KB) è in grado di promuovere la differenziazione dei precursori degli osteoclasti all'interno del midollo osseo verso cellule osteoclastiche multinucleate mature e funzionalmente attive. OPG è una proteina osteoblastica (nota anche come fattore inibente l'osteoclastogenesi) che inibisce differenziazione e attività degli osteoclasti antagonizzando il legame di RANK-L con RANK, con effetti di protezione sull'osso. OPG, pertanto, svolge importanti funzioni regolatorie, come dimostrato da evidenze sperimentali: i topi transgenici *knock-out* per OPG hanno osteoporosi severa; la somministrazione di OPG o anticorpi anti-RANK induce una rapida riduzione dei marcatori di *turn-over* scheletrico e incremento della densità minerale ossea. Del resto, in donne con valori incrementati dei marcatori di *turn-over* scheletrico sono rilevabili elevati livelli di OPG, presumibilmente per effetto compensatorio, in risposta a un incremento di RANK-L e dell'attività osteoclastica. Sembra, inoltre, che RANK-L e OPG possano essere importanti regolatori dell'angiogenesi. Ancor oggi, tuttavia, è da chiarire il ruolo di OPG nella patogenesi dell'osteoporosi (*cf cap 5*).

Presumibilmente, anche il M-CSF necessario per la proliferazione degli osteoclasti è di derivazione osteoblastica e consente l'espressione recettoriale di RANK-L. Altri fattori stimolanti l'osteoclastogenesi sono calcitriolo, PTH, TNF- α , prostaglandina E₂, IL-1, IL-6, IL-11 e IL-17. Attività analoga a OPG, d'altra parte, possono avere IL-18 (oltre a IL-4, IL-12, IL-13) e interferone- γ , mentre la proteina Sca, di derivazione osteoclastica, inibisce l'azione degli stessi osteoclasti con un meccanismo autocrino.

Non è chiaro se l'osteoclasta esprima direttamente recettori per la vitamina D, mentre, oltre a quelli per RANK, esprime recettori per calcitonina e vitronectina.

La vita cellulare di un osteoclasta è limitata (solitamente da 3 a 4 settimane) da un processo di **apoptosi**, che può essere stimolato da estrogeni e TGF- β .

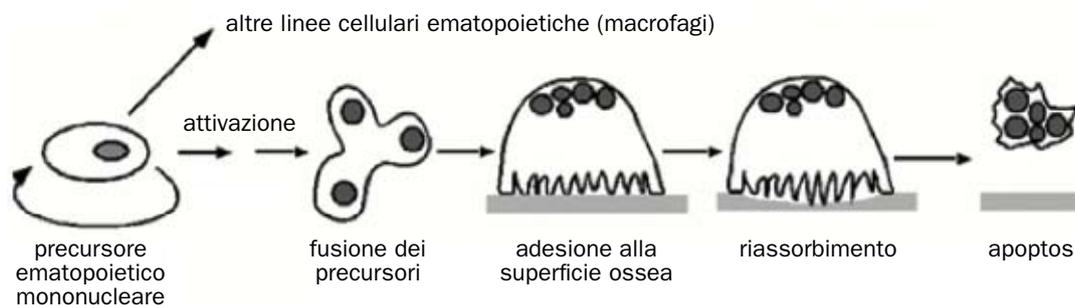


Figura 2.2
Ciclo vitale dell'osteoclasta

Sviluppo scheletrico

Lo sviluppo dell'osso avviene attraverso due distinti processi:

- l'**ossificazione intra-membranosa**, in cui le cellule mesenchimali si differenziano direttamente in osteoblasti;

- l'**ossificazione encondrale**, in cui le cellule mesenchimali si differenziano dapprima in cellule cartilaginee e quindi in osteoblasti. Attraverso meccanismi di riassorbimento il tessuto cartilagineo viene quindi sostituito da matrice ossea e si susseguono i processi di riassorbimento e neodeposizione.

Nell'ossificazione encondrale appare essenziale il ruolo delle BMP e del FGF, che favoriscono l'aggregazione delle cellule mesenchimali e la conseguente produzione di osso intrecciato, successivamente sostituito da osso vero e proprio nel cosiddetto nucleo di ossificazione primaria. In seguito, avviene la sostituzione con tessuto trabecolare nel processo di ossificazione secondaria che completa lo sviluppo scheletrico dopo la pubertà (fig 2.3 e 2.4). Il processo di consolidamento scheletrico prosegue fino all'età di circa trent'anni. Raggiungere un adeguato **picco di massa ossea** consente di ridurre il rischio di osteoporosi in età senile o postmenopausale nel sesso femminile. Per l'ottenimento di una massa ossea ottimale rispetto alla potenziale, geneticamente determinata, sono fattori essenziali l'attività fisica, l'adeguato introito di calcio e di vitamina D, l'esposizione al sole.

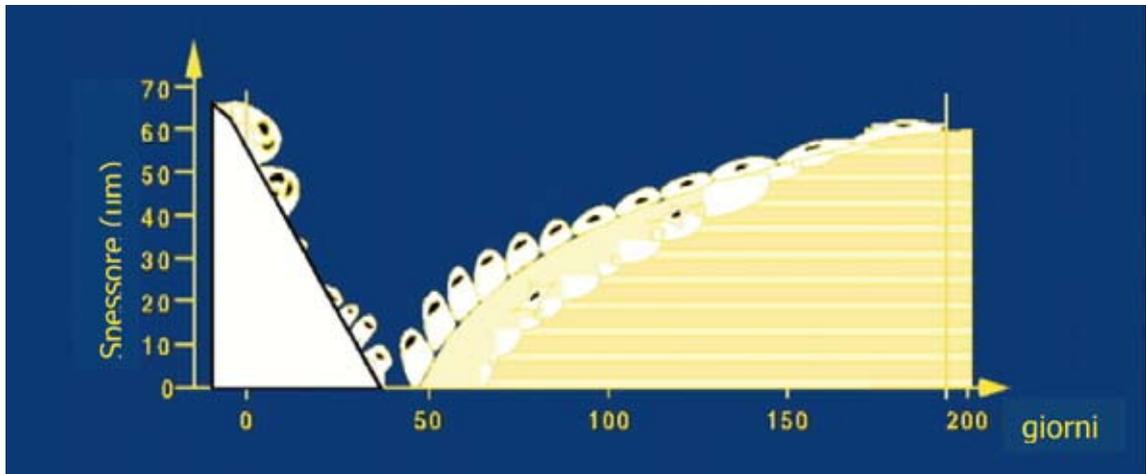


Figura 2.3
Sviluppo osseo: diagramma schematico che illustra le fasi iniziali dell'ossificazione encondrale

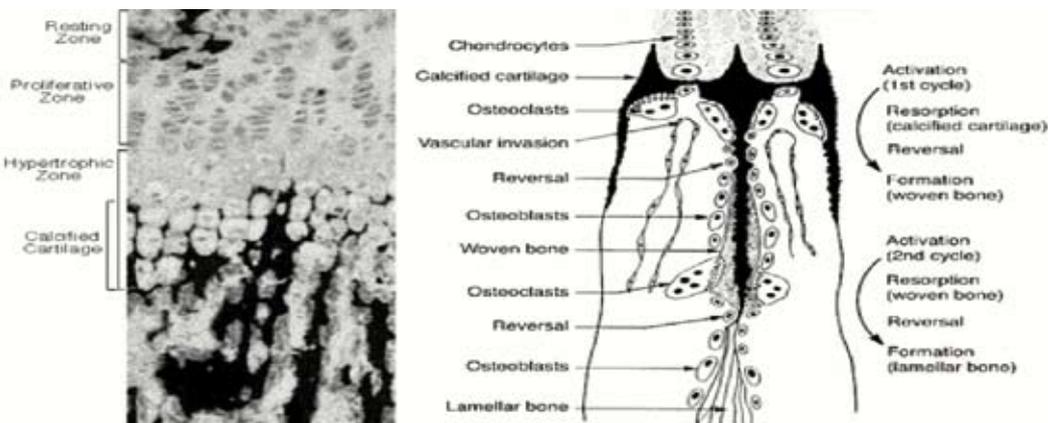


Figura 2.4
Durata e profondità delle fasi della sequenza di rimodellamento dell'osso trabecolare normale, calcolata dall'analisi istomorfometrica di campioni biotipici di giovani sani (*adattato da Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F. Bone Histomorphometry. Raven Press, New York, 1994: pp 13-20*)

Il rimodellamento osseo e l'unità funzionale ossea

Il processo di rimodellamento consente all'osso di **crescere** durante lo sviluppo scheletrico e **rispondere alle diverse esigenze metaboliche** dell'organismo, **senza perdere** le proprie **caratteristiche strutturali**. Il rimodellamento avviene all'interno dell'unità funzionale ossea ed è caratterizzato dal succedersi coordinato dell'attività da parte delle diverse cellule scheletriche: sulla superficie dell'osso trabecolare le unità funzionali ossee (BU) costituiscono le lacune di Howship (aree di attivo riassorbimento che degradano i cristalli di idrossiapatite e la matrice ossea), mentre nell'osso corticale costituiscono gli osteoni, piccoli cilindri di tessuto osseo, al cui interno sono presenti i canali di Havers.

La neodeposizione ossea e il riassorbimento non avvengono in maniera casuale, ma secondo una **precisa sequenza coordinata** (fig 2.5), in cui l'osso vecchio è sostituito da osso di nuova formazione, adeguandosi a esigenze meccaniche, biochimiche o metaboliche dell'organismo, attraverso la successione di attivazione, riassorbimento, inversione e neoformazione. Le fasi del rimodellamento osseo non differiscono tra osso corticale e trabecolare, pur differendo enormemente le dimensioni delle due strutture: lo spessore medio di una trabecola è di 150-200 µm, mentre lo spessore dell'osso corticale varia da 1 a 10 mm.

Il **rimodellamento** osseo prende **origine** solitamente **nella parte endostale** della superficie ossea, attraverso la segnalazione di un microdanno o di uno *stress* meccanico da parte degli osteociti e delle *lining cells* sulla superficie ossea. La regolazione del riassorbimento osseo è mediata dall'azione ormonale sulle cellule stromali, sugli osteoblasti e sugli osteociti. Sotto lo stimolo del PTH, l'osteoblasta incrementa la produzione di M-CSF, RANK-L, OPG e IL-6, che agiscono sull'osteoclasta.

Riassorbimento (durata 2-4 settimane). Comincia con la migrazione di precursori osteoclastici, parzialmente differenziati, sulla superficie ossea, ove si raggruppano a formare gli osteoclasti maturi multinucleati. Gli osteoclasti rimuovono minerale e matrice ossea per una profondità limitata sulla superficie trabecolare o all'interno dell'osso corticale. Questo processo viene controllato con meccanismi non del tutto chiariti, in cui l'apoptosi degli osteoclasti si associa ad un ruolo inibente da parte di elevate concentrazioni di calcio e prodotti di degradazione della matrice. Una volta esaurita la loro funzione di riassorbimento, gli osteoclasti inattivi sembrerebbero promuovere l'inizio della fase di neodeposizione.

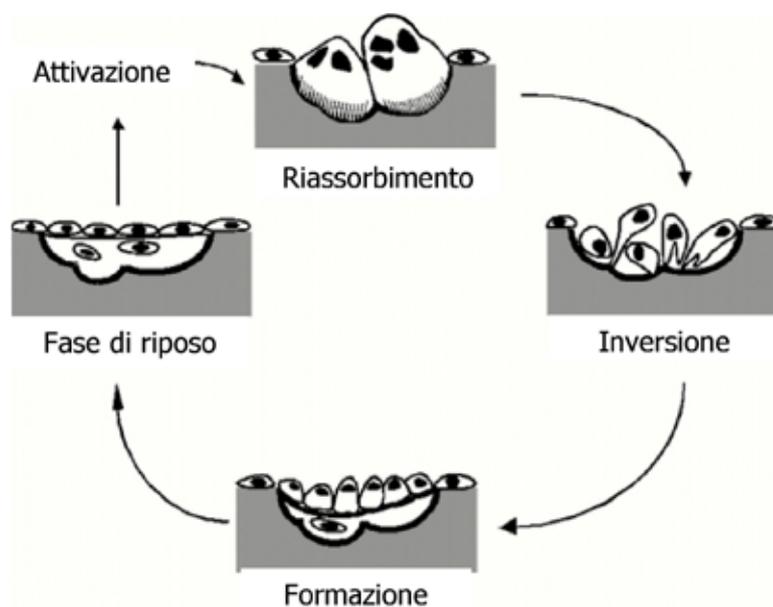


Figura 2.5
Ciclo di rimodellamento osseo

Inversione (4-5 settimane). Alla fase di riassorbimento, succede la fase di inversione, in cui cellule mononucleate della serie monocitaria-macrofagica preparano la superficie ossea per l'adesione degli osteoblasti che riempiono le lacune, depositando uno strato di materiale ricco in glicoproteine, la cosiddetta linea di cemento, in cui l'osteopontina svolge un ruolo essenziale. Le cellule mononucleate forniscono segnali per la differenziazione osteoblastica e la migrazione cellulare.

Formazione (circa 3 mesi). Segue, quindi, la fase di formazione, in cui successive ondate di osteoblasti riempiono le lacune ossee, fintanto che l'osso riassorbito non è completamente sostituito. Con il completamento di questa fase, la superficie è ricoperta da *lining cells* appiattite, cui segue un lungo periodo di riposo che si interrompe con la ripresa di un nuovo ciclo di rimodellamento.

Accoppiamento bilanciato e sbilanciato

In condizioni fisiologiche nell'osso adulto il riassorbimento e la neodeposizione sono strettamente accoppiati, in modo che la quantità di osso riassorbito e formato siano equivalenti. Il **ciclo di rimodellamento osseo** avviene normalmente nell'arco di **3-4 mesi**. Sebbene la sequenza riassorbimento-neodeposizione possa essere schematicamente considerata sequenziale, in realtà essa può venire regolata in maniera multidirezionale, consentendone una regolazione molto fine.

Normalmente, **nell'età adulta circa il 30% dello scheletro è rinnovato ogni anno**. La velocità di formazione ossea è di circa 0.5 mm/die e si può calcolare che per ogni BU siano depositi 0.01 mm di osso. L'attivazione di più unità di rimodellamento si riflette nelle variazioni del *turn-over* osseo. Le dimensioni e l'aspetto delle BU corticali (osteoni) sono all'incirca costanti, mentre quelli delle BU nell'osso trabecolare sono molto variabili, a seconda delle diverse caratteristiche della superficie ossea, in modo che, durante il riassorbimento, i danni strutturali siano limitati. L'accoppiamento tra riassorbimento e neodeposizione avviene con meccanismi non del tutto chiariti. In alcune condizioni patologiche (osteoporosi *cf* cap 5, metastasi ossee) si verifica un disaccoppiamento tra riassorbimento e neoformazione, cui consegue una perdita di massa ossea che può essere anche molto rapida. L'integrità delle trabecole ossee può essere persa, fino alla perforazione, cui consegue un'importante compromissione della resistenza meccanica. L'assottigliamento può avvenire anche senza perforazione, quando aumenta l'entità del riassorbimento o il numero dei siti in cui avviene (frequenza di attivazione).

Normalmente gli osteoblasti riempiono completamente la cavità di riassorbimento, ma lo spessore trabecolare si riduce quando questa attività non avviene in maniera completa. Ciò avviene in maniera progressiva con l'invecchiamento, mentre è maggiore in corso di terapia con glucocorticoidi (*cf* cap 6b), che influenzano negativamente la sopravvivenza e l'attività degli osteoblasti. In altre condizioni patologiche, quali ad esempio l'osteopetrosi (*cf* cap 14c), è il processo di riassorbimento a essere difettivo, con alterazioni della differenziazione, dell'attività metabolica e dell'espressione di RANK-L da parte degli osteoclasti.

Regolazione delle cellule ossee

La regolazione dei meccanismi di riassorbimento e neodeposizione avviene per via sistemica e locale.

Paratormone (*cf* cap 4a). È il principale regolatore dell'omeostasi calcica (*cf* cap 1): la sua azione a livello osseo avviene legandosi agli osteoblasti, stimolando la produzione di numerosi fattori locali, tra cui IL-6, IGF-I, IGF-binding protein 5 e prostaglandine.

Calcitriolo (*cf* cap 3). È in grado di stimolare il riassorbimento scheletrico, contribuendo a mobilizzare calcio e fosforo dall'osso immettendoli nel plasma, stimolando l'osteoclastogenesi.

Calcitonina. Il suo ruolo fisiologico nell'uomo è sostanzialmente irrilevante, anche se a dosi farmacologiche si è dimostrata in grado di inibire gli osteoclasti e di conseguenza il riassorbimento osseo.

GH e IGF. L'asse GH/IGF-I e IGF-II è fondamentale nella crescita, a livello dei piatti cartilaginei e per la formazione dell'osso encondrale durante lo sviluppo scheletrico. L'azione delle IGF è regolata anche dalle proprie proteine leganti (IGF-BP), che ne possono modulare la biodisponibilità: in particolare, l'IGF-BP₃ è la maggior determinante dei livelli sierici di IGF-I, mentre l'azione locale di IGF-I è favorita da BP₅ e inibita da BP₄.

Glucocorticoidi. Sono essenziali per la differenziazione degli osteoblasti, ma a dosi farmacologiche ne determinano l'apoptosi, analogamente a quanto fanno sugli osteociti. Sembra essere questo il meccanismo di inibizione dell'osteosintesi alla base dell'osteoporosi indotta da glucocorticoidi (*cf* cap 6b). Hanno inoltre un'azione facilitante l'effetto delle IGF sulle cellule ossee.

Ormoni tiroidei. Stimolano il riassorbimento e la neoformazione ossea, soprattutto a livello corticale: l'ipertiroidismo accelera la perdita scheletrica.

Ormoni sessuali. Sono importanti determinanti del metabolismo osseo e influenzano lo sviluppo scheletrico in entrambi i sessi. Gli estrogeni sembrano agire attraverso specifici recettori direttamente a livello degli osteoclasti e degli osteoblasti. Nella tarda pubertà gli estrogeni riducono il *turn-over* scheletrico, inibendo il riassorbimento osseo, e sono indispensabili nella chiusura delle epifisi in entrambi i sessi (come dimostrato da osservazioni in maschi con carenza genetica di aromatasi o di recettori per gli estrogeni). Gli estrogeni agiscono anche promuovendo localmente la sintesi di citochine e prostaglandine. La caduta dei loro livelli circolanti in menopausa è uno dei principali determinanti dell'osteoporosi post-menopausale (*cf* cap 5). Gli androgeni, invece, promuovono la neoformazione ossea in maniera diretta o attraverso gli effetti sui muscoli adiacenti.

Citochine.

- FGF: sono essenziali per lo sviluppo scheletrico; mutazioni nel recettore per questi fattori sono alla base dell'acondroplasia.
- VEGF: è implicato nello sviluppo e differenziazione dell'osso, oltre che nel processo di rimodellamento.
- Prostaglandine: hanno effetto bifasico, ma prevalentemente di stimolo della neosintesi ossea e di mediatori della risposta infiammatoria e dei segnali di carico. NO può inibire l'attività degli osteoclasti, mentre i leucotrieni stimolano il riassorbimento osseo.
- TGF- β : è uno dei mediatori degli effetti degli estrogeni, inibisce il riassorbimento osseo.
- Famiglia delle BMP: è in grado di promuovere la differenziazione degli osteoblasti, stimolando la neoformazione ossea.

Bibliografia

- Baron R, Tomy A. *Ultrastructure of bone - histogenesis, growth and remodeling*. Endotext. Org 2010.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. *Osteoclast differentiation and activation*. Nature 2003, 423, 337-42.
- Robey PG. *Bone matrix proteoglycans and glycoproteins*. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (Eds). *Principles of Bone Biology*. Academic Press Publishers, 2002: pp 225-38.
- Martin TJ, Seeman E. *Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2008, 22: 701-22.
- Asagiri M, Takayanagi H. *The molecular understanding of osteoclast differentiation*. Bone 2007, 40: 251-64.
- Parfitt AM. *Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodeling*. In: Osteoporosis. Academic Press; 1996: pp 315-29.
- Manolagas SC. *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis*. Endocr Rev 2000, 21: 115-37.

Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. Endocrinology 2001, 142: 5050–5.

Seeman E, Delmas PD. Bone quality – the material and structural basis of bone strength and fragility. N Engl J Med 2006, 354: 2250–61.

Parfitt AM. The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells. J Bone Min Res 2001, 16: 1583–5.

Parfitt AM, Travers R, Rauch F, et al. Structural and cellular changes during bone growth in healthy children. Bone 2000, 27: 487–94.

3. La vitamina D

Letizia Ceccoli & Cristiano Maria Francucci

Sintesi, trasporto e metabolismo

La vitamina D è un secosteroide le cui forme naturali biologicamente più importanti sono l'ergocalciferolo (vitamina D₂) e il colecalciferolo (vitamina D₃) (fig. 3.1). I due secosteroidi differiscono per la presenza di un gruppo metilico al carbonio 28 e di un doppio legame tra il carbonio 22 e 23 sulla catena laterale della vitamina D₂.

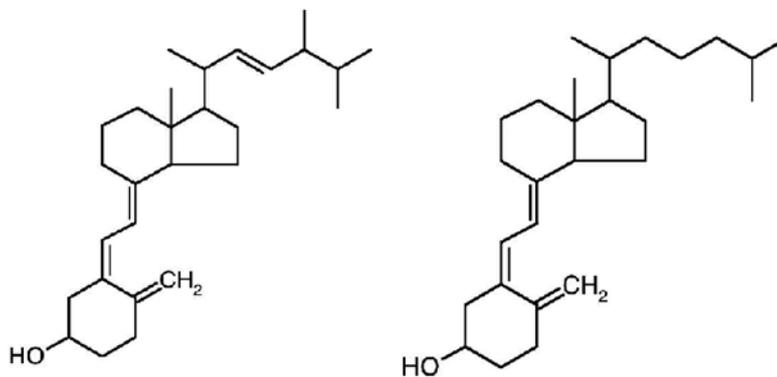


Figura 3.1

Struttura biochimica dell'ergocalciferolo (a sinistra) e del colecalciferolo (a destra)

L'ergocalciferolo deriva per irradiazione ultravioletta (UV) da uno sterolo vegetale, l'ergosterolo, contenuto nelle piante e nell'olio di fegato di tonno. Il colecalciferolo, invece, è presente nel latte bovino ed umano e nell'olio di fegato di merluzzo, ma è sintetizzato in poche ore soprattutto dalla cute, a livello dello strato malpighiano, per irradiazione UV del 7-deidro-colesterolo (provitamina D₃).

Poiché per vitamina si intende un residuo organico richiesto come sostanza nutriente dall'organismo (perché non può essere sintetizzato in maniera autonoma), questo termine si applica esclusivamente all'ergocalciferolo, mentre il colecalciferolo viene considerato un ormone, in quanto l'organismo è in grado di sintetizzarlo. L'apporto di vitamina D è dovuto per l'80-90% alla sintesi endogena del colecalciferolo, invece il 10-20% è da attribuire alla quota di ergocalciferolo e colecalciferolo assunto con gli **alimenti** (quantità insufficiente a coprire il fabbisogno giornaliero).

Il *range* di UV-B che stimola la formazione di vitamina D nella **cute** è abbastanza ristretto: 290-315 nanometri. Sia il grado della pigmentazione cutanea che l'intensità dell'esposizione correlano con il tempo necessario per raggiungere la massima concentrazione di pre-D₃. Brevi esposizioni ai raggi UV-B favoriscono una prolungata produzione di D₃ per effetto di una lenta conversione termica sia di pre-D₃ a D₃, sia di lumisterolo a pre-D₃. Ciò nonostante, l'esposizione prolungata ai raggi UV-B non determina un aumento della quantità di vitamina D₃: per fotoconversione di pre-D₃ a metaboliti biologicamente inattivi (lumisterolo e tachisterolo); per inibizione dei livelli del recettore per la vitamina D (VDR) e della fotoconversione ad opera, rispettivamente, dei raggi UV-B e della 1,25(OH)₂D₃; per aumentata produzione nell'epidermide di melanina, che ha la capacità di assorbire le radiazioni UV-B. Nei mesi

estivi la sovrapproduzione di vitamina D è accumulata nel tessuto adiposo, rendendola così disponibile nei periodi di carenza, come quello invernale. Diversi fattori possono interferire con la produzione di vitamina D₃:

- età: a parità d'irradiazione solare, la sintesi cutanea è meno efficiente negli anziani che nei giovani, per riduzione del 7-deidro-colesterolo nell'epidermide e/o resistenza o riduzione dei VDR;
- l'angolo di incidenza dei raggi solari: negli USA, nel Canada e nel Nord-ovest dell'Europa la produzione di vitamina D è virtualmente assente da ottobre a marzo.

Le vitamine D₂ e D₃ di origine esogena sono **assorbite** a livello duodenale e delle prime anse digiunali, per la presenza di sali biliari e di lipidi nel lume intestinale, e in seguito sono trasportate dai chilomicroni nei canali linfatici. Nel sangue le vitamine D₂ e D₃ assorbite e la D₃ di sintesi endogena sono veicolate da una specifica α_1 -globulina (**vitamin D-binding protein**, DBP), prodotta principalmente dal fegato. La DBP, la cui emivita è di 2.5-3 giorni, lega con alta affinità la vitamina D ed i suoi metaboliti, è filtrata attraverso il glomerulo renale e parzialmente riassorbita a livello renale.

La vitamina D di origine esogena viene quindi metabolizzata oppure immagazzinata a livello del tessuto adiposo (in scarsa quantità anche nel tessuto muscolare, nella pelle e nell'osso) o in misura minore rimane legata ai chilomicroni e può essere così captata dal fegato.

Nel **fegato** le vitamine D₂ e D₃ sono convertite ad opera di alcuni enzimi presenti nel citocromo p450 nel pro-ormone **25-idrossi-colecalciferolo** (25-OH-D o calcidiolo o calcifediolo), successivamente rilasciato nella circolazione sanguigna, sempre legato alla DBP. Il calcidiolo (emivita di circa 10-20 giorni e metabolicamente inattivo) è l'indicatore più attendibile della quantità di vitamina D introdotta nell'organismo.

A livello del **tubulo renale** prossimale, la 25-OH-D può subire due ulteriori reazioni d'idrossilazione, catalizzate da due differenti idrossilasi:

- la 1α -idrossilasi, espressa dal gene *CYP27B1*, dà origine all'1,25-diidrossi-colecalciferolo (1,25(OH)₂D₃ o **calcitriolo**, emivita plasmatica di 10-15 ore, concentrazione plasmatica 20-60 pg/mL), la componente attiva, che è il ligando naturale specifico del VDR;
- la 24-idrossilasi, espressa dal gene *CYP24*, produce la forma inattiva 24,25-diidrossicolecalciferolo (24,25(OH)₂D₃).

L'**attività della 1α -idrossilasi è regolata** sia dalla disponibilità del substrato 25-OH-D e di co-fattori, sia dalla modulazione dei geni *CYP27B1* e *CYP24*.

Nel rene il substrato dell' 1α -idrossilasi è ottenuto dall'internalizzazione endocitica della DBP dal lato luminale delle cellule tubulari prossimali. La trascrizione enzimatica dell' 1α -idrossilasi è controllata principalmente dal PTH circolante e dal FGF-23, che rappresentano, rispettivamente, il maggior stimolatore ed il maggior inibitore dell'espressione del gene *CYP27B1*. Oltre a PTH e FGF-23, l' 1α -idrossilasi è regolata dalle concentrazioni ematiche di calcio e fosforo: ipocalcemia ed ipofosforemia la stimolano, mentre ipercalcemia e iperfosforemia la inibiscono. Sebbene le cellule epiteliali del tubulo prossimale del rene siano la maggior sorgente di 1α -idrossilasi e siano responsabili della sintesi della maggior parte di calcitriolo circolante necessario a mantenere l'omeostasi calcica, altri tessuti possiedono enzimi in grado di sintetizzare 1,25(OH)₂D₃ ad azione esclusivamente paracrina. L'attività di alcune 1α -idrossilasi extra-renali, per esempio quelle presenti nei macrofagi attivati, sembra sia principalmente regolata dalla disponibilità del substrato enzimatico e non dal PTH e dal FGF-23, perchè i recettori per queste molecole non sono espressi nelle cellule infiammatorie. La 1α -idrossilasi dei cheratinociti, invece, è controllata sia da PTH e FGF-23 che dalla disponibilità del substrato energetico.

La 24-idrossilasi non serve soltanto per limitare la sintesi di 1,25(OH)₂D₃, ma anche per ridurre la disponibilità del substrato 25-OH-D.

L'espressione dei geni *CYP24* e *CYP27B1* è sotto stretto controllo trascrizionale del calcitriolo-

lo, che così automodula la quota di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ prodotta e rilasciata dal rene. Ad eccezione della cute, dove può essere prodotta ed agire localmente, per raggiungere i tessuti bersaglio la vitamina D deve essere trasportata dal sito di sintesi o di assorbimento ai tessuti che esprimono i geni per la 25-idrossilasi e, da qui, a quelli che esprimono il gene per la 1α -idrossilasi. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sintetizzata deve, infine, raggiungere gli organi che contengono cellule esprimenti il VDR, in modo che l'ormone steroideo possa attuare le sue azioni.

Azioni "classiche"

Il funzionamento della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è alquanto simile a quello degli ormoni steroidei, perché si lega specificamente con alta affinità ad una proteina nucleare (VDR), che ha grande omologia con altri membri della super-famiglia dei recettori nucleari come quelli steroidei e tiroidei.

Le classiche azioni della vitamina D a livello dei tre tessuti bersaglio - rene, intestino e osso - sono effettuate in concerto con altri due ormoni peptidici: il paratormone e l'FGF-23. Il PTH è il maggiore stimolatore della produzione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a livello renale. Il calcitriolo inibisce direttamente la sintesi e la secrezione di PTH e la proliferazione delle cellule paratiroidi ed, indirettamente, incrementando i livelli sierici di calcio. Questo ione sopprime il rilascio di PTH attraverso il recettore sensibile al calcio (CaSR) presente sulle ghiandole paratiroidi. Inoltre, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ agisce incrementando i livelli di VDR e favorisce la trascrizione di CaSR, sensibilizzando così le ghiandole paratiroidi all'inibizione della secrezione di PTH da parte del calcio plasmatico. L'FGF-23, invece, inibisce la produzione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a livello renale ed aumenta l'espressione del gene *CYP24*, mentre la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ **stimola la produzione di FGF-23**. Inoltre, la concentrazione di questa fosfatina è regolata dal fosfato alimentare. L'FGF-23 è espresso principalmente dagli osteociti, ma anche dalle *lining cells* e dagli osteoblasti.

Per quanto riguarda l'azione della vitamina D sull'osso, non è ancora chiaro se la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ svolga un'azione diretta sullo scheletro o indiretta attraverso la stimolazione dell'assorbimento intestinale di calcio e fosforo. Infatti, studi sperimentali hanno evidenziato che topi *knock-out* per VDR sviluppano ipocalcemia, iperparatiroidismo secondario e rachitismo, che si correggono con una dieta ad alto apporto di calcio, fosforo e lattato. Ciò suggerisce che la funzione principale svolta dalla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sia quella di provvedere all'assorbimento di calcio e fosfato dall'intestino, piuttosto che un'azione diretta sull'osso. Tuttavia, altri studi su topi transgenici che sovra-esprimono VDR nelle cellule osteoblastiche, hanno evidenziato la presenza di un aumento del processo di osteoformazione, ipotizzando un effetto diretto della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sull'osso. Studi *in vitro* confermano tale ipotesi, evidenziando una stimolazione dell'osteoclastogenesi e del riassorbimento osseo, attraverso una regolazione positiva del RANKL (*Receptor Activator for Nuclear Factor KB Ligand*) da parte delle cellule osteoblastiche e una contemporanea regolazione negativa dell'osteoprotegerina (OPG), una proteina osteoblastica che inibisce l'osteoclastogenesi, antagonizzando il legame del RANK con il ligando RANKL (*cf. cap 2*). È stato, inoltre, riportato che la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimola la produzione negli osteoblasti di proteine, quali osteocalcina e osteopontina, e modula la sintesi di Runx2 (*runt-related transcription factor 2*), regolatore trascrizionale della differenziazione osteoblastica. Pertanto, sembra che gli **effetti della vitamina D sull'osso** siano svariati e possano riguardare **sia il processo di riassorbimento osseo che quello di osteoformazione**.

La principale attività fisiologica della vitamina D si esplica a livello **intestinale**, dove **stimola l'assorbimento di calcio**. Quando l'introito di questo ione con la dieta è ridotto o quando

sussistono condizioni che ne richiedono concentrazioni più rilevanti (es. durante la crescita, l'allattamento o la gravidanza), la sintesi di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta, stimolandone un maggiore assorbimento. L'assorbimento intestinale di calcio avviene attraverso due diversi meccanismi:

- un trasporto passivo, non saturabile, paracellulare, che sfrutta il gradiente osmotico tra il lume intestinale ed il torrente circolatorio, che avviene in tutto l'intestino tenue (duodeno, digiuno, ileo) e dipende dalle concentrazioni intestinali del calcio ionizzato ($> 2-6 \text{ mM}$);
- un processo attivo, saturabile, principalmente trans-cellulare, che avviene soprattutto nel duodeno e si esplica in tre tappe: l'ingresso del calcio attraverso la membrana apicale degli enterociti, la sua diffusione intra-cellulare e il passaggio attraverso la membrana baso-laterale nel lume vasale.

Per quanto riguarda la prima tappa del processo trans-cellulare attivo, il calcitriolo è in grado di incrementare la quota di calcio che entra nell'enterocita attraverso un canale di membrana selettivo per il calcio (TRPV6). Per quanto riguarda il transito dello ione dalla membrana apicale a quella basale della cellula intestinale, si pensa che tale passaggio sia favorito dalla calbindina, proteina vitamina D-dipendente che contiene 4 siti di legame per il calcio. Tuttavia, recenti studi effettuati su topi *knock-out* per calbindina indicherebbero che tale proteina non sarebbe la sola responsabile di questa tappa. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ svolge un'azione diretta sulla pompa trans-membrana del calcio, responsabile dell'escrezione dello ione dall'enterocita al plasma attraverso la membrana basale.

Infine, il calcitriolo stimola anche **l'assorbimento intestinale di fosforo**.

Il terzo principale organo bersaglio della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è il **rene**. Qui il calcitriolo sembra potenziare, almeno in parte, l'azione del PTH, **stimolando il riassorbimento di calcio** a livello del tubulo distale attraverso un aumento della trascrizione dell'mRNA per il recettore del PTH. Inoltre, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ esercita i suoi effetti renali inducendo, nel tubulo distale, la sintesi di calbindina, l'espressione del canale del calcio TRPV5 e l'attività della 24-idrossilasi, ed inibendo, a livello del tubulo prossimale, l'attività della 1α -idrossilasi. Per quanto riguarda, invece, il suo effetto sul riassorbimento del fosfato a livello del tubulo prossimale, è stato suggerito che la vitamina D lo aumenti o lo riduca in base alla concentrazione plasmatica del paratormone.

Tra gli organi bersaglio della vitamina D sono da segnalare le **cellule muscolari**. Il legame della vitamina D al suo recettore nucleare nel tessuto muscolare può portare ad una sintesi *ex novo* di proteine, cui consegue un incremento del diametro e del numero delle fibre muscolari di tipo II. A dimostrazione di quest'effetto, nonostante la riduzione dei VDR a livello muscolare osservata con l'avanzare dell'età, negli anziani è stata evidenziata una correlazione positiva tra livelli di vitamina D (valori $> 24 \text{ ng/mL}$) e *performance* muscolare (velocità dell'andatura, facilità ad alzarsi dalla sedia).

Azioni "non classiche"

I VDR non sono espressi solamente a livello dei tre classici organi bersaglio della vitamina D, ma hanno una distribuzione straordinariamente ampia nell'uomo: probabilmente il numero dei tessuti che non contengono VDR è minore rispetto al numero di quelli che lo esprimono. Inoltre alcuni tessuti esprimono il gene *CYP27B1* e, quindi, possono produrre autonomamente la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Il significato biologico di tali osservazioni trova riscontro nell'evidenza di numerosi effetti extra-scheletrici della vitamina D, come la regolazione della proliferazione e della differenziazione cellulare, così come della secrezione ormonale e la modulazione immunitaria.

Il **pancreas** rappresenta uno degli organi bersaglio non classici in cui sono stati identificati i

VDR. Sebbene sia stato ampiamente dimostrato un ruolo di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nel potenziamento di secrezione e azione insulinica, il meccanismo con cui questo avviene rimane sconosciuto. Oltre a modulare il rilascio insulinico, sembra che la vitamina D, legata alla calbindina, sia in grado di proteggere il pancreas dalla distruzione β -cellulare mediata dalle citochine. Tali scoperte potrebbero avere importanti implicazioni terapeutiche, sia nel prevenire la distruzione β -cellulare pancreatica nel diabete di tipo 1, che nell'incrementare la secrezione insulinica nel diabete di tipo 2.

La scoperta della presenza dei VDR nelle cellule del sistema immunitario e l'accertata produzione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ da parte delle cellule dendritiche attivate, hanno reso concreta l'ipotesi che la vitamina D possa avere fisiologicamente **proprietà immuno-regolatorie**. Recenti studi hanno dimostrato un suo ruolo sia nella regolazione dell'immunità innata o aspecifica (l'abilità del sistema immune di riconoscere e rispondere all'invasione di un patogeno) che di quella acquisita, generalmente promuovendo la prima e reprimendo l'ultima. Per quanto riguarda l'**immunità aspecifica**, si è visto che in presenza di micobatteri cellule del sistema immune reagiscono producendo VDR e 1α -idrossilasi, trasformando la 25-OH-D in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e stimolando la sintesi di catelicidina (proteina con proprietà anti-batteriche codificata da un gene che ha rapporti di contiguità con la regione del DNA responsiva alla vitamina D). Successivi studi hanno evidenziato la capacità della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e del suo precursore 25-OH-D di indurre l'espressione di catelicidina in cellule monocitiche, macrofagiche ed epidermoidali che esprimono l'enzima 1α -idrossilasi, potenziandone così l'attività anti-microbica. È verosimile che l'incremento dei valori plasmatici di 25-OH-D dell'ospite al di sopra di quelli normali ($> 30 \text{ ng/mL}$) potrebbe aumentare l'efficacia della risposta immune innata verso agenti microbici quali *M. Tuberculosis* e HIV.

L'**immunità specifica** o acquisita, invece, è sostenuta prevalentemente da linfociti T e B, che producono, rispettivamente, citochine e immunoglobuline per combattere l'antigene presentato dalle APC (cellule dendritiche, macrofagi, ...) del sistema umorale innato. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibisce la proliferazione linfocitaria e la stimolazione della sintesi di immunoglobuline, interferisce sulla liberazione di numerose citochine e sulla produzione di metallo-proteinasi e prostaglandine. L'abilità di repressione della risposta immune acquisita da parte della vitamina D ha suggerito l'uso dell'ormone e dei suoi analoghi nel trattamento adiuvante delle malattie autoimmuni infiammatorie e delle neoplasie.

In sintesi, l'azione combinata della **vitamina D** sul sistema immunitario specifico e aspecifico **sembra promuovere la risposta immunitaria dell'ospite nei confronti di patogeni invalidanti e contemporaneamente limitare un'eventuale risposta specifica eccessiva verso tali patogeni**.

A livello **cutaneo** la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ prodotta nei cheratinociti sembra svolgere un'azione, sia autocrina sia paracrina, mirata alla differenziazione dell'epidermide. In condizioni fisiologiche la quota di vitamina D attiva prodotta dai cheratinociti non sembra contribuire ai livelli circolanti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e alla concentrazione di VDR.

Le azioni svolte dalla vitamina D si estendono quindi ben oltre il sistema muscolo-scheletrico e l'omeostasi del calcio. È ormai riconosciuto che il deficit di vitamina D (*cf. cap 13a*) si accompagna ad aumento d'infezioni (quali la tubercolosi) e di disordini autoimmuni (quali il diabete di tipo 1, la sclerosi multipla e il morbo di Crohn). I livelli di 25-OH-D, inoltre, sono inversamente correlati con l'incidenza di diabete di tipo 2 e la sindrome metabolica; alcuni studi hanno dimostrato come un adeguato apporto di vitamina D e calcio possa rallentare la progressione verso il diabete conclamato in pazienti con ridotta tolleranza ai glucidi. Infine, un largo numero di dati epidemiologici documenta una correlazione inversa tra livelli di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, latitudine e introito di vitamina D, e l'incidenza di **Cancro**, in particolare della mammella, del colon e della prostata.

Bibliografia

- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007, 357: 266-81.
- Li YC, Pirro AE, Amling M, et al. Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 9831-5.
- Akhter S, Kutuzova GD, Christakos S, DeLuca HF. Calbindin D9k is not required for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated Ca²⁺ absorption in small intestine. *Arch Biochem Biophys* 2007, 460: 227-32.
- Sneddon WB, Barry EL, Coutermarsh BA, et al. Regulation of renal parathyroid hormone receptor expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid. *Cell Physiol Biochem* 1998, 8: 261-77.
- Canaff L, Hendy GN. Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem* 2002, 277: 30337-50.
- Wang TT, Nestel FB, Bourdeau V, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004, 173: 2909-12.
- Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000, 164: 2405-11.
- Bikle DD, Nemanic MK, Whitney JO, Elias PW. Neonatal human foreskin keratinocytes produce 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochemistry* 1986, 25: 1545-8.
- Boscoe FB, Schymura MJ. Solar ultraviolet-B exposure and cancer incidence and mortality in the United States, 1993-2002. *BMC Cancer* 2006, 6: 264, pp.1-9.

4. Ormoni e altri analiti: fisiologia, fisiopatologia e interferenze farmacologiche

4a. PTH

Romolo Dorizzi

(Per informazioni sull'utilizzo clinico cfr cap 15a, sul dosaggio cfr cap 23a)

Biochimica

L'ormone paratiroideo (PTH) è un peptide di 84 aminoacidi, sintetizzato dalle cellule principali delle paratiroidi.

Il cosiddetto “**PTH intatto**” (vale a dire la molecola costituita da 84 aminoacidi) è il principale prodotto di secrezione delle paratiroidi e viene rapidamente rimosso dal circolo (con un'emivita di circa **2 minuti**) da fegato (soprattutto), rene ed osso. Tuttavia, il PTH immunoreattivo circolante deriva da una quota relativamente minore di PTH intatto e di frammento N-terminale (aminoacidi compresi tra 1 e 34 in cui risiede l'attività biologica della molecola) e da una quota molto più rilevante di **peptidi carbossi-terminali, biologicamente inattivi** e con emivita molto più lunga (2-3 ore). Questi frammenti sono eliminati soprattutto per filtrazione glomerulare e si possono accumulare nell'insufficienza renale cronica. È stato ipotizzato che alcuni frammenti non siano semplici prodotti di degradazione, ma abbiano un ruolo attivo di antagonismo del PTH in caso di ipercalcemia (cfr cap 10a), contribuendo alla resistenza dello scheletro al PTH nell'uremia. Infine, è stata recentemente descritta una variante molecolare fosforilata, che verrebbe secreta anche nei soggetti normali (in concentrazione di circa 1/10 rispetto alla molecola “normale”), ma che aumenterebbe di molte volte nei pazienti con carcinoma paratiroideo o iperparatiroidismo primario severo (cfr cap 8).

Il PTH esplica le sue azioni attraverso il legame ad un **recettore** specifico di membrana, della famiglia dei recettori accoppiati a proteine G.

Azioni del PTH

Il PTH è il **principale regolatore dell'omeostasi del calcio** (cfr cap 1). Ha il compito di mantenere la concentrazione ematica del calcio all'interno di un limitato e ben definito intervallo di valori. Variazioni anche minime dei livelli di calcemia ionizzata (cfr cap 4b) determinano ampie modificazioni dei livelli di PTH, che è pertanto un indicatore della disponibilità di calcio dell'organismo.

- **Aumenta la calcemia** attraverso il rilascio del calcio dall'osso ed il suo riassorbimento a livello del tubulo distale del rene.
- **Stimola** l'attività dell'enzima **1 α -idrossilasi** nel tubulo prossimale del rene, aumentando la sintesi dell'1,25(OH)₂-coleciferolo, il metabolita attivo della vitamina D, che a sua volta (cfr cap 3 e 4d) aumenta l'assorbimento intestinale del calcio ed esercita un *feed-back* endocrino sulla secrezione del PTH a livello delle paratiroidi.
- **Diminuisce** il riassorbimento renale del fosforo nel tubulo prossimale, diminuendo la **fosforemia** (cfr cap 4c).
- **Stimola la formazione** dell'osso.

I livelli di PTH sono **inversamente correlati** a quelli di **25-OH-vitamina D**: quanto più è significativo il deficit di vitamina D (cfr cap 13a), tanto più è elevato il PTH circolante, mentre i livelli di PTH tendono a restare stabili in presenza di livelli di 25-OH-D \geq 20 ng/dL (= 50 nmol/L), indice di uno stato adeguato di vitamina D.

Tabella 4a.1
Alterazioni delle concentrazioni di PTH da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Fumo di sigaretta Ipoparatiroidismo (<i>cf</i> cap 11a) Ipertiroidismo Alcalosi metabolica <i>Milk-alkali syndrome</i> Metastasi ossee diffuse Sarcoidosi
Aumentate da	Età Sesso femminile Etnia afro-americana Obesità Iperparatiroidismo primitivo (<i>cf</i> cap 8) MEN tipo I, IIa e IIb Iperparatiroidismo secondario (<i>cf</i> cap 9) Malattie croniche da malassorbimento (fibrosi cistica, malattia celiaca) Ipercalcemia ipocalciurica familiare (FHH) (<i>cf</i> cap 10a) Pseudoipoparatiroidismo (<i>cf</i> cap 11b) Ipotiroidismo Sindrome di Zollinger-Ellison Iperfosforemia Iperlipemia

Alcuni studi evidenziano una riduzione dei livelli sierici di PTH del ~15% in soggetti che fumano 1-5 sigarette/die, con ritorno alla normalità dopo un anno circa di sospensione del fumo.

L'incremento del PTH con l'età riconosce una genesi multifattoriale (riduzione della funzionalità renale, ridotti livelli estrogenici, ridotto assorbimento di calcio, aumento del peso corporeo); tuttavia, si ritiene che il suo determinante principale sia la carenza di vitamina D.

Tabella 4a.2
Modificazioni farmaco-indotte dei livelli di PTH

Diminuiti da	Intossicazione da vitamina D Cimetidina Pindololo e Propranololo
Aumentati da	Rifampicina Anti-convulsivanti Diuretici (furosemide) Litio Bisfosfonati Corticosteroidi Isoniazide Preparati contenenti fosfati

Bibliografia

- Monier-Faugere MC, Geng Z, Mawad H, et al. Improved assessment of bone turnover by the PTH-(1-84)/large CPTH fragments ratio in ESRD patients. *Kidney Int* 2001, 60: 1460- 8.
- John MR, Goodman WG, Gao P, et al. A novel immunoradiometric assay detects full length human PTH but not amino-terminally truncated fragments: implications for PTH measurements in renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84:4287-90.

- Reichel H, Esser A, Roth HJ, et al. Influence of PTH assay methodology on differential diagnosis of renal bone disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18: 759–68.
- Divieti P, John MR, Juppner H, et al. Human PTH-(7–84) inhibits bone resorption in vitro via actions independent of the type 1 PTH/PTHrP receptor. *Endocrinology* 2002, 143: 171–6.
- Coen G, Bonucci E, Ballanti P, et al. PTH 1–84 and PTH “7–84” in the non-invasive diagnosis of renal bone disease. *Am J Kidney Dis* 2002, 40: 345–8.

PEPTIDE CORRELATO AL PTH (PTH-RELATED PROTEIN, PTH-rP)

(Per informazioni sull'utilizzo clinico cfr cap 15a4, sul dosaggio cfr cap 23j)

È una proteina il cui terminale aminico si caratterizza per un'elevata omologia col PTH, di cui è più grande (tra 139 e 173 amino acidi); per questo è in grado di legare il recettore del PTH e di mimarne alcune azioni biologiche: aumentato rilascio di calcio a livello osseo e ridotta escrezione di calcio e ridotto riassorbimento di fosfato a livello renale. Invece non è in grado di provocare l'acidosi metabolica a *gap* anionico normale, di comune riscontro in molte forme di iperparatiroidismo (cfr cap 8).

Il PTH-rP è regolato da un gene diverso da quello del PTH ed è prodotto in diverse isoforme. Il ruolo fisiologico del PTH-rP non è a tutt'oggi completamente chiarito: è certo un suo coinvolgimento nei meccanismi di trasporto del calcio in diversi tessuti (in particolare nell'epitelio renale e della ghiandola mammaria), nella regolazione della contrattilità del tessuto muscolare liscio a livello di arterie, utero, vescica e tratto gastrointestinale, nell'omeostasi del calcio durante la gravidanza e l'allattamento, nella crescita e nello sviluppo fisiologico, specialmente nel campo dell'osteof ormazione e in generale nella regolazione autocrina e paracrina dell'osso.

PTH-rP è secreto dal tessuto neoplastico di diversi tipi di tumori: carcinoma mammario, carcinomi squamocellulari di polmone, testa e collo, carcinomi renali, vescicali, uterini ed ovarici, tumori epidermoidi; meno frequentemente, può essere prodotto in quantità significativa anche da alcuni tumori neuroendocrini, sarcomi ed emolinfopatie maligne. È in grado di produrre una condizione nota come ipercalcemia paraneoplastica (*Humoral Hypercalcemia of Malignancy*, HHM) (cfr cap 10a).

Il PTH-rP può essere prodotto in misura significativa anche in quadri non oncologici. I livelli possono infatti risultare elevati:

- durante la gravidanza e l'allattamento e/o in presenza di iperplasia della ghiandola mammaria;
- in pazienti affetti da LES;
- in pazienti con linfadenopatia associata a HIV;
- in pazienti con linfedema della cavità toracica/pleurica;
- in pazienti con neoplasie benigne neuroendocrine, ovariche e renali.

4b. Calcio

Piero Cappelletti

(Per altre informazioni sul metabolismo calcio-fosforico cfr cap 1, sull'utilizzo clinico cfr cap 15b e 15 c, sul dosaggio cfr cap 23b e 23c)

Fisiologia

Il calcio, il più abbondante tra gli elettroliti corporei, è essenziale alla funzione cellulare, alla stabilità di membrana, alla trasmissione neuronale, all'omeostasi ematica, alla fisiologia dell'osso, alla contrazione muscolare, alla secrezione di ormoni.

La concentrazione del calcio plasmatico, che rappresenta l'1% del calcio totale nel nostro organismo (il 99% è sotto forma di idrossiapatite nell'osso), è mantenuta in uno stretto intervallo fisiologico (9-10 mg/dL).

Circa il 50-60% del calcio plasmatico è legato alle proteine plasmatiche, principalmente all'albumina (45%), o complessato ad anioni, quali citrati, solfati, fosfati (2-10%), mentre il restante 40-50% è in **forma ionizzata**, che rappresenta la componente **fisiologicamente attiva**. I valori della calcemia totale sono, quindi, strettamente legati alla quantità delle **proteine circolanti**. Per valutare una iper- o ipocalcemia come vera, si suggerisce di correggere il valore dosato alla luce della concentrazione dell'albumina con formule appropriate (grossolanamente il calcio totale è diminuito di 0.8 mg/dL per 1 mg/dL in più di albumina rispetto ad un valore standard di 4 mg/dL), o meglio di determinare direttamente il calcio ionizzato. Inoltre, il legame del calcio con l'albumina dipende dal **pH** (aumenta in condizioni di alcalosi e diminuisce in acidosi): grossolanamente, per ogni diminuzione di 0.1 di pH il calcio ionizzato aumenta di 0.05 mmol/L (0.2 mg/dL).

In condizioni fisiologiche i **livelli del calcio ionizzato** (Ca^{++}) sono **controllati dall'azione di PTH e calcitriolo su rene, ossa e tratto gastroenterico**. Questa regolazione fine e continua dipende principalmente dai livelli di PTH, mediante *feed-back* negativo di Ca^{++} sui recettori di membrana sensibili al calcio (CaSR) delle cellule paratiroidi. La relazione tra secrezione di PTH e concentrazione di Ca^{++} è sigmoidale, così che piccoli cambiamenti nella concentrazione di Ca^{++} determinano immediate risposte di PTH: una diminuzione di 0.03 mmol/L (0.12 mg/dL) di calcio ionizzato risulta in un raddoppio della secrezione di paratormone.

La calcitonina non sembra contribuire all'omeostasi normale del calcio, così come i peptidi relati a PTH (PTHrP), rinvenuti in molti pazienti neoplastici con ipercalcemia.

Il 98-99% del calcio filtrato dal glomerulo renale (10 grammi/die) viene riassorbito a livello del tubulo contorto prossimale (60%) o nei tratti più distali del nefrone, tra cui il tubulo distale, dove circa il 10% del calcio filtrato viene riassorbito per effetto dell'azione di PTH e vitamina D.

Le variazioni in eccesso o in difetto dell'escrezione urinaria di calcio dipendono da:

- alterazioni dei fattori che governano l'omeostasi del calcio, responsabili di variazioni sovra- o sub-fisiologiche dei livelli di calcemia;
- alterazioni patologiche o iatrogene della funzionalità del tubulo renale.

Tabella 4b.1
Alterazioni della calcemia da cause fisiopatologiche

<p>Diminuita da</p>	<p>Ipoparatiroidismi acquisiti (post-chirurgico, autoimmune, post-attinico, da patologie infiltrative) (<i>cfr cap 11a</i>) Alterazioni su base genetica/congenita di paratiroidi, PTH, CaSR:</p> <ul style="list-style-type: none"> • pseudoipoparatiroidismi (<i>cfr cap 11b</i>); • ipoparatiroidismo X-linked; • difetti del gene del PTH; • mutazioni del CaSR; • s di Di George, s di Kenny-Caffey; • neuropatie mitocondriali <p>Ipovitaminosi D (<i>cfr cap 13a</i>) e/o insufficiente apporto di calcio con la dieta:</p> <ul style="list-style-type: none"> • malnutrizione; • malassorbimenti; • rachitismo e osteomalacia (<i>cfr cap 13b</i>); • insufficienza renale cronica; <p>Iperfosfatemia:</p> <ul style="list-style-type: none"> • insufficienza renale cronica; • lisi cellulare massiva (neoplasie); • rabdomiolisi acuta <p>Ipomagnesiemia</p> <p>Altre cause:</p> <ul style="list-style-type: none"> • pancreatite acuta, alcolismo, cirrosi epatica, trasfusioni ripetute; • <i>hungry bone syndrome, toxic shock syndrome</i>
<p>Aumentata da</p>	<p>Iperparatiroidismo: primitivo (<i>cfr cap 8</i>) e terziario</p> <p>Neoplasie:</p> <ul style="list-style-type: none"> • tumori primitivi dell'osso e tumori con metastasi ossee (osteolisi); • mieloma multiplo; • neoplasie maligne con rilascio di PTH-rP; <p>Aumentato turn-over osseo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • malattia di Paget (<i>cfr cap 14a</i>); • immobilizzazione/allettamento prolungato <p>Malattie infiammatorie/infettive:</p> <ul style="list-style-type: none"> • sarcoidosi e altre malattie granulomatose; • TBC e altre infezioni da micobatteri, coccidioomicosi <p>Malattie endocrine:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ipertiroidismo; • iposurrenalismo; • feocromocitoma; • GEP-NET <p>Altro:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ipercalcemia ipocalciurica familiare benigna (<i>cfr cap 10a</i>); • alimentazione parenterale; • <i>milk-alkali syndrome</i>

Tabella 4b.2
Modificazioni farmaco-indotte dei livelli di calcemia

Diminuita da	Aminoglicosidi Anti-convulsivanti (nel paziente anziano) Bisfosfonati Chelanti del calcio Cisplatino Chetoconazolo Gallio
Aumentata da	Androgeni Diuretici tiazidici e indapamide Litio Tamoxifene Teofillina Vitamina A Vitamina D

Tabella 4b.3
Alterazioni della calciuria da cause fisiopatologiche

Diminuita da	Aumentato fabbisogno di calcio: crescita, gravidanza e allattamento, <i>hungry bone syndrome</i> Ipocalcemia da varie cause (<i>cf. cap 12</i>): <ul style="list-style-type: none"> • ipoparatiroidismo (<i>cf. cap 11a</i>); • ipovitaminosi D (<i>cf. cap 13a</i>), malassorbimenti, ecc. Malattie renali (nefrosi, nefrite acuta, ecc) Ipercalcemia ipocalciurica familiare (FHH) (<i>cf. cap 10a</i>) Sindrome di Gitelman
Aumentata da	Ipercalcemia da varie cause (<i>cf. cap 10a</i>): <ul style="list-style-type: none"> • iperparatiroidismo (<i>cf. cap 8</i>); • neoplasie con metastasi ossee; • sarcoidosi; • infezioni; • tireotossicosi Aumentato <i>turn-over</i> osseo (m. di Paget, <i>cf. cap 14a</i> , immobilizzazione) Insufficienza renale Acidosi tubulare renale Eccessiva assunzione di vitamina D/preparati a base di calcio o dieta ricca di calcio (latte e latticini) Ipercalciuria idiopatica o ipercalciuria geneticamente determinata (es. m. di Dent) (<i>cf. cap 10b</i>)

Tabella 4b.4
Modificazioni farmaco-indotte della calciuria

Diminuita da	Diuretici tiazidici Litio
Aumentata da	Diuretici dell'ansa (es. furosemide) Anti-acidi a base di calcio

Bibliografia

- Toffaletti JG. *Blood Gases and Electrolytes*. 2nd Ed. AACCPress, Washington, DC: 2009.
- Wu AHB. *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests*. 4th Ed. WB Saunders Company, St. Louis: 2006.
- Mundy GR, Guise TA. Hormonal control of calcium homeostasis. *Clin Chem* 1999, 45: 1347-52.
- Slomp J, van der Voort PHJ, Gerritsen RT, et al. Albumin-adjusted calcium is not suitable for diagnosis of hyper- and hypocalcemia in the critically ill. *Crit Care Med* 2003, 31: 1389-93.
- Calvi LM, Bushinsky DA. When is it appropriate to order ionized calcium? *J Am Soc Nephrol* 2008, 19: 1257-60.
- Felsenfeld AJ, Machado L, Rodriguez M. The relationship between serum calcitonin and calcium in the hemodialysis patient. *Am J Kidney Dis* 1993, 21: 292-9.
- Mundy GR, Edwards JR. PTH-related peptide (PTHrP) in hypercalcemia. *J Am Soc Nephrol* 2008, 19: 672-5.
- Cappelletti P, Tozzoli R. Laboratory & hypercalcemia. In: Lumachi F, Basso SMM (Eds). *Hypercalcemia Pathophysiology & Treatment*. Bentham@eBooks: ISBN 9781-60805-107-6, 2009.
- Shepard MM, Smith JW. Hypercalcemia. *Am J Med Sci* 2007, 334: 381-5.
- Jacobs TP, Bilezikian JP. Clinical review: rare causes of hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90: 6316-22.
- Smellie WSA, Vanderpump MPJ, Fraser WD, et al. Best practice in primary care pathology: review 11. *J Clin Pathol* 2008, 61: 410-8.

4c. Fosforo

Piero Cappelletti

(Per altre informazioni sul metabolismo calcio-fosforico cfr cap 1, sull'utilizzo clinico cfr cap 15d, sul dosaggio cfr cap 23d)

Fisiologia

I composti del fosforo partecipano ai principali processi cellulari, dalla costituzione degli acidi nucleici alla sintesi di ATP e alla respirazione mitocondriale. Il fosforo è richiesto per l'entrata del glucosio nelle cellule: la glicolisi è stimolata da elevate concentrazioni intra-cellulari di fosforo e l'insulino-resistenza può essere conseguenza di un'ipofosforemia.

La concentrazione plasmatica dei fosfati, principalmente come fosfati organici, si aggira intorno a 12 mg/dL e rappresenta circa il 20% del fosforo totale corporeo (80% è nell'osso sotto forma di idrossiapatite). La concentrazione plasmatica dei **fosfati inorganici**, che sono misurati nelle analisi di laboratorio dal laboratorio clinico, è circa un terzo del totale, di cui 10-15% legato ad anioni e 85-90% in forma libera. A pH 7.4, il fosforo inorganico è per il 75% HPO_4^{2-} e per il 25% HPO_4^- .

La concentrazione plasmatica dei fosfati dipende dall'assorbimento intestinale e dall'escrezione renale: poiché l'assorbimento varia grandemente, il **punto di regolazione** puntuale della concentrazione plasmatica del fosforo è il **riassorbimento tubulare**, normalmente > 90%. Conseguentemente, i **principali regolatori** della concentrazione del fosforo plasmatico ed urinario sono **PTH**, per l'azione inibente sul riassorbimento tubulare, e **vitamina D**, che incrementa l'assorbimento intestinale e il riassorbimento tubulare. Altri regolatori sono il GH, che ne aumenta la concentrazione plasmatica per inibizione dell'escrezione renale, e un gruppo di peptidi, recentemente identificato, denominato "fosfatone", che ha un ruolo nei disordini iper- ed ipofosfatemici.

Il fosforo inorganico nel sangue presenta un ritmo circadiano (nadir la sera) e variazioni stagionali (livelli massimi in maggio-giugno), mentre la fosfaturia presenta una significativa fluttuazione diurna, con il massimo dell'escrezione nelle ore pomeridiane.

Dato l'elevato riassorbimento renale, il fosforo inorganico urinario è fisiologicamente molto basso (< 100 mg/die). Conseguentemente il livello di fosfaturia può essere utilizzato per distinguere un'ipofosfemia di origine renale (iperfosfaturia) o da altra causa (ipofosfaturia).

Tabella 4c.1
Alterazioni della fosfatemia da cause fisiopatologiche

Diminuita da	<p>Aumentata eliminazione urinaria:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ipercalcemia PTH-dipendente (pHPT e altre)(<i>cf. cap 8 e 10a</i>); • tubulopatie fosfato-disperdenti (es. trapianto renale, ipercalciuria ipofosfatemica); • insufficienza renale acuta (fase poliurica); • iperaldosteronismo; • eccessiva assunzione di prodotti a base di liquirizia; • inappropriata secrezione di ADH; • espansione di volume; • ipomagnesiemia <p>Carenza alimentare e/o ridotto assorbimento intestinale:</p> <ul style="list-style-type: none"> • rachitismo e osteomalacia da carenza di vitamina D (<i>cf. cap 13b</i>); • malnutrizione; • alcolismo; • malassorbimenti; • diarrea/vomito <p>Shift da ambiente extra-cellulare a intra-cellulare:</p> <ul style="list-style-type: none"> • alcalosi respiratoria (sepsi, colpo di calore, attacco di panico, ustioni estese, ecc.); • chetoacidosi diabetica in fase di rapido compenso terapeutico; • alimentazione parenterale (iperalimentazione)
Aumentata da	<p>Diminuita eliminazione urinaria:</p> <ul style="list-style-type: none"> • insufficienza renale; • ipoparatiroidismo (<i>cf. cap 11a</i>); • pseudoipoparatiroidismo (<i>cf. cap 11b</i>); • endocrinopatie (ipertiroidismo, acromegalia, ipogonadismo giovanile) <p>Sovraccarico:</p> <ul style="list-style-type: none"> • orale (intossicazione da vitamina D, lassativi contenenti fosfato, elevato apporto dietetico in presenza di danno renale); • parenterale (terapie infusionali, emolisi post-trasfusionale) <p>Shift cellulare:</p> <ul style="list-style-type: none"> • emolinfopatie maligne; • lisi cellulare massiva (rabbdomiolisi; in corso di chemioterapia); • chetoacidosi diabetica all'esordio, acidosi respiratoria, ischemia tissutale <p>Miscellanea:</p> <ul style="list-style-type: none"> • emoconcentrazione; • iperfosfatemia familiare intermittente; • calcinosi tumorale

Tabella 4c.2
Modificazioni farmaco-indotte della fosfatemia

Diminuita da	<p>Anti-acidi chelanti il fosforo Chemioterapici (cisplatino, bevacizumab, irinotecano, everolimus, imatinib) Corticosteroidi Diuretici dell'ansa, acetazolamide Espansione del volume Bicarbonati</p>
Aumentata da	<p>Anabolizzanti steroidei Supplementazione di composti fosforilati con la dieta (rara in presenza di normale funzione renale)</p>

Tabella 4c.3
Alterazioni della fosfatemia da cause fisiopatologiche

Diminuita da	Carenza di vitamina D (<i>cf</i> cap 13a) Ipoparatiroidismo (<i>cf</i> cap 11a) Pseudoipoparatiroidismo (<i>cf</i> cap 11b) Acromegalia
Aumentata da	Immobilizzazione prolungata Fratture Iperparatiroidismo (<i>cf</i> cap 8) Rachitismo vitamina D-resistente (<i>cf</i> cap 13b) Tubulopatie renali

Tabella 4c.4
Modificazioni farmaco-indotte della fosfatemia

Diminuita da	Insulina
Aumentata da	Corticosteroidi

Bibliografia

- Toffaletti JG. *Blood Gases and Electrolytes*. 2nd Ed. AACCPress, Washington, DC: 2009.
- Wu AHB. *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests*. 4th Ed. WB Saunders Company, St. Louis: 2006.
- Levine BS, Kleeman CR. Hypophosphatemia and hyperphosphatemia: clinical and pathophysiologic aspects. In: Narins RG (Ed). *Maxwell and Kleeman's clinical disorders of fluid and electrolyte metabolism*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1994.
- Prie D, Beck L, Urena P, Friedlander G. Recent findings in phosphate homeostasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005, 14: 318-24.
- DiMeglio LA, White KE, Econs HJ. Disorders of phosphate metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2009, 29: 591-609.
- Schiavi SC, Kumar R. The phosphatonins pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int* 2004, 65: 1-14.
- Lederer E, Ouseph R. Hyperphosphatemia. <https://medicine.medscape.com/article242280-overview> (accesso 10.07.2010)
- Lederer E, Ouseph R. Hypophosphatemia. <https://medicine.medscape.com/article241185-overview> (accesso 10.07.2010)
- Berkelhammer CA, Bear RA. A clinical approach to common electrolyte problems: 3. Hypophosphatemia. *Can Med Assoc J* 1984, 130: 17-23.

4d. Vitamina D

Marco Caputo

(Per informazioni sulla fisiologia cfr cap 3, sull'utilizzo clinico cfr cap 15e, sul dosaggio cfr cap 23e)

Tabella 4d.1

Alterazioni delle concentrazioni di 25-OH vitamina D da cause fisiopatologiche

Diminuite da	<p>Età</p> <p>Insufficiente esposizione alla luce solare</p> <p>Gravidanza/allattamento</p> <p>Malnutrizione</p> <p>Obesità</p> <p>Malassorbimenti</p> <p>Patologie del tratto digerente</p> <p>Iperparatiroidismo primitivo (cfr cap 8)</p>
---------------------	--

Tabella 4d.2

Modificazioni farmaco-indotte dei livelli di 25-OH vitamina D

Diminuiti da	<p>Interferenti con l'assorbimento:</p> <ul style="list-style-type: none"> • lassativi di composizione oleosa o lipidica • farmaci per l'obesità (es. orlistat) • resine biliari (es. colestiramina) <p>Interferenti con il metabolismo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • fenilidantoina • carbamazepina • rifampicina • cimetidina • diuretici tiazidici • litio
Aumentati da	<p>Eccessiva supplementazione: livelli > 100 ng/mL configurano un rischio di tossicità; tuttavia, i quadri clinici di intossicazione D decorrono con livelli decisamente più elevati (≥ 250 ng/mL).</p>

Tabella 4d.3

Alterazioni delle concentrazioni di calcitriolo da cause fisiopatologiche

Diminuite da	<p>Nefropatie/IRC: nelle nefropatie in stadio iniziale ai limiti inferiori del range di normalità o modicamente ridotte; negli stadi avanzati nettamente ridotti</p> <p>Ipovitaminosi D severa (cfr cap 13a)</p> <p>Rachitismo vitamina D-dipendente di tipo I, sostenuto da deficit di 1α-idrossilasi (cfr cap 13b)</p>
Aumentate da	<p>Iperparatiroidismo primitivo (cfr cap 8) e secondario (cfr cap 9)</p> <p>Patologie granulomatose o neoplastiche (es. sarcoidosi, linfomi) associate ad ipercalcemia, con sintesi extra-renale di 1,25(OH)₂-vitamina D</p> <p>Ipercalcemia (cfr cap 10a) paraneoplastica da sintesi di PTH-rP</p> <p>Ipercalciuria idiopatica (cfr cap 10b)</p> <p>Rachitismo vitamina D-dipendente di tipo II (<i>hereditary vitamin D-resistant rickets</i>, HVDRR) (cfr cap 13b)</p>

Tabella 4d.4
Modificazioni farmaco-indotte dei livelli di calcitriolo

Aumentati da	Eccessiva supplementazione
---------------------	----------------------------

Bibliografia

- Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride (1997), page 235.*
- Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. Amer J Clin Nutr 2008, 88: S582–6.*
- Lucas JA, Bolland MJ, Grey AB, et al. Determinants of vitamin D status in older women living in a subtropical climate. Osteopor Int 2005, 16: 1641–8.*
- Bolland MJ, Grey AB, Ames RW, et al. Determinants of vitamin D status in older men living in a subtropical climate. Osteopor Int 2006, 17: 1742–8.*
- Field AE, Coakley EH, Must A, et al. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. Arch Int Med 2001, 161: 1581–6.*
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. Amer J Clin Nutr 2000, 72: 690–3.*
- Scientific Advisory Committee on Nutrition. Update on Vitamin D Position Statement by the Scientific Advisory Committee on Nutrition 2007.*
- Office of Dietary Supplements, National Institutes of Health. Dietary Supplement Fact Sheet: Vitamin D.*
- Pittas AG, Chung M, Trikalinos T, et al. Systematic review: Vitamin D and cardiometabolic outcomes. Ann Int Med 2010, 152: 307–14.*
- Wang L, Manson JE, Song Y, Sesso HD. Systematic review: Vitamin D and calcium supplementation in prevention of cardiovascular events. Ann Int Med 2010, 152: 315–23.*
- Binkley N, Novotny R, Krueger D, et al. Low vitamin D status despite abundant sun exposure. J Clin Endocrinol Metab 2007, 92: 2130–5.*

4e. Magnesio

Piero Cappelletti

(Per informazioni sull'utilizzo clinico cfr cap 15f, sul dosaggio cfr cap 23f)

Fisiologia

Il corpo umano contiene circa 24 g di magnesio, ~53% nello scheletro e ~46% nei muscoli, fegato e cuore. Il **ruolo** del magnesio corporeo è essenzialmente quello di attivatore e cofattore di più di 300 enzimi implicati in replicazione genetica, glicolisi, trasporto trans-cellulare di ioni, contrazione muscolare, fosforilazione ossidativa ed altro.

Il magnesio extra-cellulare corrisponde a circa l'1% di quello presente nell'organismo. Nel sangue è presente in tre frazioni: legato a proteine (20%), legato ad anioni (10%) e **ionizzato** (70%). Quest'ultima costituisce la **quota biologicamente attiva**, analogamente a quanto avviene per il calcio.

L'**assorbimento** del magnesio della dieta avviene principalmente a livello del piccolo intestino (60-70%).

La **regolazione** del magnesio plasmatico non è così ben caratterizzata come quella del calcio e dipende da un complesso gioco interdependente di escrezione renale, assorbimento intestinale e scambio con l'osso (peraltro non facile come per calcio e fosfato), in cui il magnesio ionizzato sarebbe il segnale regolatore. Anche PTH, vitamina D, aldosterone ed insulina giocano un ruolo nel determinare i livelli plasmatici dell'elettrolita. Il ruolo principale è del rene che riassorbe attivamente il magnesio (> 95%), soprattutto a livello del tubulo prossimale e del tratto ascendente dell'ansa di Henle, in caso di ipomagnesiemia. La soglia renale per il magnesio (~1.46-2.07 mg/dL), d'altra parte, è molto vicina alle concentrazioni plasmatiche fisiologiche, per cui anche piccoli aumenti di magnesiemia ne determinano una rapida escrezione renale.

Tabella 4e.1
Alterazioni delle concentrazioni di magnesio da cause fisiopatologiche

Diminuite da	<p>Cause gastrointestinali e fattori alimentari:</p> <ul style="list-style-type: none"> • diarrea e/o vomito protratto; • carenze nutrizionali (digiuno prolungato, malnutrizione, diete sbilanciate, alimentazione parenterale, alcolismo, gravidanza); • deficit assorbitivo del magnesio su base familiare; • malassorbimenti (celiachia, IBD, enteropatie, esiti di resezioni chirurgiche, pancreatite cronica, ecc.); • sondino naso-gastrico; • interventi chirurgici sul tratto digerente <p>Aumentata eliminazione renale:</p> <ul style="list-style-type: none"> • necrosi tubulare acuta; • nefrite interstiziale; • glomerulonefriti; • diuresi post-obstruttiva; • trapianto renale; • tubulopatie acquisite o congenite (s. di Welt, s. di Gitelman, acidosi tubulare renale) <p>Endocrinopatie:</p> <ul style="list-style-type: none"> • iperaldosteronismo; • ipoparatiroidismo (<i>cf</i> cap 11a); • ipertiroidismo; • SIADH; • chetoacidosi; • ipercortisolismo <p>Passaggio dal fluido extra- a quello intra-cellulare:</p> <ul style="list-style-type: none"> • acidosi (correzione); • trasfusioni massiva; • <i>hungry bone syndrome</i>; • <i>insulin/glucose/refeeding syndrome</i>; • pancreatite acuta <p>Altre cause:</p> <ul style="list-style-type: none"> • età avanzata; • gestosi del III trimestre; • ustioni estese
Aumentate da	<p>Disidratazione Insufficienza renale Ipotiroidismo Iperparatiroidismo (<i>cf</i> cap 8) M. di Addison Acidosi diabetica all'esordio Anemie emolitiche</p>

Tabella 4e.2
Modificazioni farmaco-indotte dei livelli di magnesio

Diminuiti da	<p>Abuso di lassativi ACE-inibitori Adrenalina Antimicrobici: Aminoglicosidi, Amfotericina B, Pentamidina, Viomicina, Foscarnet Ciclosporina e Tacrolimus Cisplatino e Cetuximab Diuretici (tiazidici, dell'ansa e osmotici) Inibitori di pompa protonica Insulina (a dosi elevate nel coma diabetico) Teofillina</p>
Aumentati da	<p>Acido acetil-salicilico (terapia prolungata) Abuso/assunzione cronica di anti-acidi o lassativi a base di magnesio Eccesso di vitamina D Litio Progesterone</p>

Bibliografia

- Toffaletti JG. *Blood Gases and Electrolytes*. 2nd Ed. AACCPress, Washington, DC:2009.
- Wu AHB. *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests*. 4th Ed. WB Saunders Company, St. Louis: 2006.
- Druke TB, Lacour B. Magnesium homeostasis and disorders of magnesium metabolism. In: Feehally J, Floege J, Johnson RJ (Eds). *Comprehensive Clinical Nephrology*, 3rd Ed. Mosby, Philadelphia, 2007.
- Agus ZS, Morad M. Modulation of cardiac ion channels by magnesium. *Annu Rev Physiol* 1991, 53: 299-307.
- Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004, 286: F599-605.
- Topf JM, Murray PT. Hypomagnesemia and hypermagnesemia. *Rev Endocrin Metab Dis* 2003, 26: 1147-52.
- Musso CG. Magnesium metabolism in health and disease. *Int Urol Nephrol* 2009, 41: 357-61.
- Fulop T, Agraharkar M, Workenenh BT, Fablen MT. Hypermagnesemia. <https://emedicine.medscape.com/article/246489-overview> (accesso 11.07.2010)
- Fulop T, Agraharkar M, Rondon-Berrios H, Fablen MT. Hypomagnesemia. <https://emedicine.medscape.com/article/246490-overview> (accesso 11.07.2010)
- Shah GM, Kirschenbaum MA. Renal magnesium wasting associated with therapeutic agents. *Miner Electrol Metab* 1991, 17: 58-64.
- Hassam R, Arulanantham N. Ipomagnesiemia indotta da farmaci. *Adv Drug React Bull* 2010, 195: 781-4.

4f. Marcatori del metabolismo osseo

Romolo Dorizzi

(Per altre informazioni sul metabolismo osseo cfr cap 2, sull'utilizzo clinico cfr cap 15g, sul dosaggio cfr cap 23g, 23h e 23i)

CLASSIFICAZIONE

Comprendono una serie di molecole coinvolte nei processi di formazione e riassorbimento del tessuto osseo, raggruppabili sul piano **biochimico** in due grandi categorie:

- enzimi: fosfatasi alcalina, fosfatasi acida tartrato-resistente;
- costituenti della matrice ossea, di natura non collagena (osteocalcina) o legati al collagene ed ai suoi precursori (idrossiprolina, peptidi del procollagene, telopeptidi del collagene, *cross-link*, ecc).

Sul piano **clinico-operativo**, vengono comunemente distinti in:

- marcatori di formazione: fosfatasi alcalina, osteocalcina, peptidi terminali del procollagene;
- marcatori di riassorbimento: idrossiprolina, fosfatasi acida, *cross-links*, telopeptidi del collagene, idrossilisina, ecc.

MARCATORI DI FORMAZIONE OSSEA

Fosfatasi alcalina e isoenzimi

Fisiologia

L'ALP è un enzima associato alla membrana cellulare, che, anche se non se ne conosce l'esatta funzione, sembra partecipare al trasporto di sostanza attraverso la membrana cellulare. L'intervento dell'ALP nella mineralizzazione dell'osso neoformato è confermato dall'osteomalacia (cfr cap 13b) che insorge nella condizione di carenza di tale enzima, l'ipofosfatemia. Nell'osso l'ALP appare coinvolto nella rottura del pirofosfato, un potente inibitore della deposizione del calcio e del fosforo a livello extra-cellulare.

In circolo sono presenti 4 **isoenzimi** dell'ALP, relativamente specifici per fegato, osso, placenta ed intestino. Poiché gli isoenzimi epatico, renale ed osseo sono codificati dallo stesso gene, le loro differenze sono dovute a modificazioni post-sintetiche specifiche di glicosilazione e sialilazione. L'isoenzima osseo prevale nel corso dell'infanzia e dell'adolescenza, mentre è all'incirca equivalente a quello epatico nell'età adulta (con circa il 10% ascrivibile all'isoenzima intestinale).

L'ALP ossea (bALP) è prodotta dagli osteoblasti ed è stata dimostrata in vescicole derivate dalla membrana cellulare, che hanno un ruolo essenziale nei processi di formazione dell'osso. Poiché è formata in quantità molto elevata nel corso della formazione dell'osso, rappresenta un eccellente indicatore dell'attività complessiva di formazione dell'osso.

L'utilità maggiore dell'ALP si rileva quando l'isoenzima osseo è eccezionalmente elevato (come nella malattia di Paget, cfr cap 14a) e la produzione da altri organi non è aumentata e rimane stabile. Le numerose fonti dell'enzima ed il mancato aumento dell'ALP nell'osteoporosi ed in altre malattie metaboliche ne hanno limitato l'impiego come indicatore di rimodellamento osseo.

Tabella 4f.1
Alterazioni delle concentrazioni di fosfatasi alcalina da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Ipofosfatasemia Ipotiroidismo Acondroplasia
Aumentate da	Malattia di Paget (<i>cfr cap 14a</i>) Iperparatiroidismo primario (<i>cfr cap 8</i>) e secondario (<i>cfr cap 9</i>) Guarigione da fratture Rachitismo e osteomalacia (<i>cfr cap 13b</i>) Tumori ossei primitivi e secondari Osteodistrofia renale (<i>cfr cap 9</i>)

Tabella 4f.2
Modificazioni farmaco-indotte dei livelli di fosfatasi alcalina

Diminuiti da	Azatioprina Clofibrato Danazolo Estrogeni e contraccettivi orali
Aumentati da	Farmaci epatotossici Penicilline e cefalosporine FANS Bisfosfonati Teriparatide

Bibliografia

- Harris H. *The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. Clin Chim Acta 1990, 186: 133-50.*
- Crofton PM. *Biochemistry of alkaline phosphatase isoenzymes. Crit Rev Clin Lab Sci 1982, 16: 161-94.*
- Langlois MR, Delanghe JR, Kaufman JM, et al. *Posttranslational heterogeneity of bone alkaline phosphatase in metabolic bone disease. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1994, 32: 675-80.*

Osteocalcina

Fisiologia

È una proteina di 49 aminoacidi, con un peso molecolare di circa 5.8 kDa, contenente tre molecole di acido γ -carbossi-glutammico, sintetizzata dagli osteoblasti nel corso della mineralizzazione della matrice, ma anche da odontoblasti e condrociti, che costituisce la principale componente non collagena della matrice ossea. Anche se non è specifica in assoluto del tessuto osseo, la quasi totalità dell'osteocalcina circolante è di derivazione ossea.

La sintesi di osteocalcina (OC) è regolata dalla vitamina D₃ e dalla vitamina K, che governa la carbossilazione dei residui di acido γ -carbossiglutammico.

Subito dopo la sintesi dagli osteoblasti per essere incorporata nella matrice ossea, una piccola quota viene secreta nella circolazione sanguigna e metabolizzata, prima di essere rapidamente eliminata attraverso i reni: un terzo della molecola circola intatto (assai instabile), un terzo come peptide N-terminale ed un terzo come peptide medio-molecolare (più stabile). Nel corso del riassorbimento osseo OC è degradata, anche se ne entra in circolo una percentuale che arriva fino al 70%.

Anche se la sua funzione è sconosciuta, si ritiene che gran parte della proteina venga incorporata nella **matrice extra-cellulare** (rappresenta la proteina non collagena più abbondante, circa il 15% di queste), dove lega il calcio e forse serve come sito di deposizione per i cristalli di idrossiapatite.

Poiché la quota immessa in circolo aumenta in condizioni di riassorbimento osseo, l'osteocalcina è **sia marcatore** dell'attività osteoblastica, cioè **di formazione** ossea, **sia** potenziale indicatore **di riassorbimento** osseo, quindi si tratta di un indicatore di *turn-over* osseo. La concentrazione dell'osteocalcina ha un **ritmo circadiano** (è più alta al mattino) e, poiché è filtrata a livello glomerulare, aumenta quando la filtrazione glomerulare diminuisce.

Tabella 4f.3

Alterazioni delle concentrazioni di osteocalcina da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Gravidanza Cirrosi biliare primitiva Deficit di GH
Aumentate da	Malattia di Paget (<i>cf. cap 14a</i>) Insufficienza renale cronica Osteodistrofia renale (<i>cf. cap 9</i>) Metastasi scheletriche

Tabella 4f.4

Modificazioni farmaco-indotte dei livelli di osteocalcina

Diminuiti da	Cortisonici
Aumentati da	Anti-convulsivanti Calcitriolo Estrogeni

Bibliografia

- Brown JP, Delmas PD, Malaval L, et al. Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1984, 1: 1091-3.
- Delmas PD, Malaval L, Arlot M, Meunier PJ. Serum bone-Gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone* 1985, 6: 339-41.
- Delmas PD, Christiansen C, Mann KG, Price PA. Bone Gla protein (osteocalcin) assay standardisation report. *J Bone Miner Res* 1990, 5: 5-11.

Peptidi C-terminale e N-terminale del procollagene di tipo I**Fisiologia**

Rappresentano i prodotti dell'azione delle endopeptidasi agenti sulla molecola del procollagene di tipo I (*cf. cap 2*) dopo l'assemblaggio extra-cellulare dei tre filamenti che la compongono, con formazione di un frammento amino-terminale (PNIP) e un frammento carbossi-terminale (PCIP). Questi due peptidi vengono pertanto rilasciati in circolo in concentrazioni analoghe durante il processo di sintesi del collagene sotto controllo ormonale, con concentrazione indipendente dalla funzione renale.

Poiché il rimodellamento osseo è più rapido di quello del tessuto connettivo, escludendo le collagenopatie, il metabolismo osseo risulta dominante.

Bibliografia

- Merry AH, Harwood R, Wooley DE, et al. Identification and partial characterisation of the non-collagenous amino- and carboxy-terminal extension peptides of cartilage procollagen. *Biochem Biophys Res Commun* 1976, 71: 83-90.
- Fessler LI, Morris NP, Fessler JH. Procollagen: biological scission of amino and carboxy extension peptides. *Proc Nat Acad Sci USA* 1975, 72: 4905-9.

Olsen BR, Guzman NA, Engel J, et al. Purification and characterization of a peptide from the carboxy-terminal region of chick tendon procollagen type I. *Biochemistry* 1977, 16: 3030-6.

Smedsrod B, Melkko J, Risteli L, Risteli J. Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochem J* 1990, 271: 345-50.

MARCATORI DI RIASSORBIMENTO OSSEO

Idrossiprolina

Fisiologia

È un aminoacido modificato, derivante dall'idrossilazione post-traduzionale dei residui di prolina del collagene di tipo I, che costituisce l'aminoacido prevalente del collagene maturo (12-14% del contenuto totale di aminoacidi).

Dopo la degradazione del collagene, l'idrossiprolina non è riutilizzata: il 90% filtra liberamente a livello glomerulare in forma di aminoacido libero, che viene quasi completamente riassorbito e catabolizzato nel fegato ad urea ed anidride carbonica; il rimanente 10% è liberato in forma di piccoli polipeptidi che passano attraverso i glomeruli e sono escreti nelle urine.

Tabella 4f.7

Alterazioni delle concentrazioni di idrossiprolina da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Ipopituitarismo Ipotiroidismo Iparatiroidismo (cfr cap 11a) Malnutrizione Distrofia muscolare
Aumentate da	Riposo Gravidanza Acromegalia Iperparatiroidismo Iperparatiroidismo (cfr cap 8) Malattia di Paget (cfr cap 14a)

Tabella 4f.8

Modificazioni farmaco-indotte dei livelli di idrossiprolina

Diminuiti da	Anti-neoplastici Acido ascorbico Aspirina Bisfosfonati
Aumentati da	GH Fenobarbital Ormoni tiroidei

Bibliografia

Kivirikko KI. Urinary excretion of hydroxyproline in health and disease. *Int Rev Connect Tissue Res* 1970, 5: 93-163.

Smith R. Collagen and disorders of bone. *Clin Sci* 1980, 59: 215-23.

Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders. *New Engl J Med* 1979, 301: 13-23.

Simsek B, Karacaer O, Karaca I. Urine products of bone breakdown as markers of bone resorption and clinical usefulness of urinary hydroxyproline: an overview. *Chin Med J* 2004, 117: 291-5.

Fosfatasi acida tartrato-resistente

Fisiologia

La fosfatasi acida è una famiglia di enzimi ubiquitari, di cui sono conosciuti almeno cinque isoenzimi, espressi da tessuti diversi (prostata, osso, milza, piastrine e macrofagi). Tutte le fosfatasi acide sono inibite dal tartrato, con l'eccezione della banda 5, denominata Fosfatasi Acida Tartrato-Resistente (TRAP), che si presenta in due isoforme: 5a, probabilmente espressa dai macrofagi, e 5b, caratteristica degli osteoclasti.

La TRAP5b, glicoproteina di 35-37 kDa, viene generalmente espressa in proporzione all'attività osteoclastica e secreta nella circolazione.

Tabella 4f.9
Alterazioni delle concentrazioni di TRAP da cause fisiopatologiche

Aumentate da	Crescita nell'infanzia Malattia di Paget (<i>cfr cap 14a</i>) Iperparatiroidismo (<i>cfr cap 8</i>) Mieloma multiplo Ovariectomia bilaterale
---------------------	--

Tabella 4f.10
Modificazioni farmaco-indotte dei livelli di TRAP

Diminuiti da	Terapia sostitutiva estrogenica
---------------------	---------------------------------

Bibliografia

Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tiss Int* 1982, 34: 285-90.

Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, et al. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000, 15: 1337-45.

Cross-link Piridinolina (PYD) e Deossipiridinolina (DPD)

Fisiologia

Il collagene presenta legami crociati (*cross-link*) di tipo intra- ed inter-molecolare (*cfr cap 2*). Con la maturazione della molecola di collagene, aumentano i *cross-link* inter-molecolari di tipo non riducibile, per azione di una lisil-ossidasi sui residui di lisina ed idrossilisina nelle estremità delle molecole di collagene, responsabili della stabilizzazione della molecola matura e della resistenza meccanica delle fibre. I principali *cross-link* sono:

- piridinolina (PYD), derivante dall'unione di tre residui di idrossilisina, presente soprattutto nelle cartilagini, ma anche nel tessuto osseo e nel connettivo dei vasi;
- desossipiridinolina (DPD), derivante dall'unione di due residui di idrossilisina + uno di lisina, presente nell'osso e nella dentina.

Durante il riassorbimento osseo i *cross-link* del collagene sono spezzati proteoliticamente per opera degli osteoclasti e rilasciati in circolo e nelle urine (in forma libera o coniugata ad altri peptidi).

La concentrazione di PYD nell'osso è tre volte maggiore di quella di DPD ed entrambe, a differenza dell'idrossiprolina, non sono metabolizzate dopo il loro rilascio dall'osso. Circa la metà di PYD e DPD è legata alle proteine ed il resto è in forma libera.

La determinazione dei *cross-link* non è influenzata dalla degradazione del collagene di nuova

sintesi e la loro concentrazione riflette strettamente la degradazione di collagene maturo (solo questo è ricco di *cross-link*). Il DPD è considerato più specifico, dato che PYD è stata rinvenuta nella cartilagine articolare ed in numerosi altri tessuti non mineralizzati, come legamenti e vasi; nessuno dei due è invece presente nel collagene della pelle, nel C_{1q} e nell'elastina. Dato che il metabolismo dell'osso è molto più rapido di quello di cartilagine, legamenti, vasi e tendini, la concentrazione di PYD e DPD nel siero e nelle urine deriva principalmente dallo scheletro.

L'escrezione urinaria di *cross-link* è indipendente dalla dieta, dato che non sono contenuti negli alimenti.

Bibliografia

Fujimoto D, Moriguchi T, Ishida T, Hayashi H. *The structure of pyridinoline, a collagen crosslink. Biochem Biophys Res Commun* 1978, 84: 52-7.

Gunja-Smith Z, Boucek RJ. *Collagen crosslink components in human urine. Biochem J* 1981, 197: 759-62.

Delmas PD, Schlemmer A, Gineyts E, et al. *Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis. J Bone Miner Res* 1991, 6: 639-44.

Eastell R, Colwell A, Hampton L, Reeve J. *Biochemical markers of bone resorption compared with estimates of bone resorption from radiotracer kinetic studies in osteoporosis. J Bone Miner Res* 1997, 12: 59-65.

Colwell A, Russell R, Eastell R. *Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. Eur J Clin Invest* 1993, 23: 341-49.

Eyre DR, Dickson IR, Van Ness KP. *Collagen crosslinking in human bone and articular cartilage. Biochem J* 1988, 252: 495-500.

Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP. *Urinary pyridinium crosslinks of collagen: specific markers of bone resorption in metabolic bone disease. Trends Endocrinol Metab* 1992, 3: 263-70.

N-Telopeptide (NTX)

Fisiologia

I filamenti del collagene di tipo I sono collegati mediante *cross-link* (costituiti da piridinoline e deossipiridinoline) che uniscono i residui di lisina o idrossilisina a livello delle estremità N- e C-terminali (si parla rispettivamente di NTX e CTX) non a forma di elica di una molecola di collagene alla porzione ad elica di un'altra parte della molecola. Quando il collagene di tipo I è degradato dagli osteoclasti durante i processi di riassorbimento, sono liberati in circolo i frammenti di NTX, di CTX e l'ICTP, telopeptide carbossi-terminale trimerico del collagene di tipo I. La maggior parte di questi frammenti è di piccola dimensione e quindi passa facilmente nelle urine attraverso il glomerulo.

Il frammento NTX corrisponde al telopeptide amino-terminale rilasciato per azione della catepsina K osteoclastica e costituisce la porzione della molecola da cui origina il 50-60% della DPD. È ritenuto specifico per il riassorbimento osseo, perché gli altri tessuti che contengono collagene di tipo I (come la pelle) non sono metabolizzati attivamente dagli osteoclasti e quindi non possono dare luogo a questo tipo di frammenti.

Tabella 4f.11
Alterazioni delle concentrazioni di NTX da cause fisiopatologiche

Aumentate da	Crescita nell'adolescenza Seconda metà del ciclo mestruale Menopausa Osteoporosi (<i>cfr cap 5</i>) Malattia di Paget (<i>cfr cap 14a</i>)
---------------------	--

Bibliografia

- Herrmann M, Seibel MJ. *The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. Clin Chim Acta 2008, 393: 57-75.*
- Garnero P. *Biomarkers for osteoporosis management: utility in diagnosis, fracture risk prediction and therapy monitoring. Mol Diagn Ther 2008, 12: 157-70.*

C-Telopeptide (CTX)

Fisiologia

Durante il processo di riassorbimento osseo sono liberati in circolo anche i frammenti CTX per azione degli osteoclasti sul collagene di tipo I.

CTX è un octapeptide prodotto di degradazione del telopeptide carbossi-terminale, anch'esso formato dall'azione enzimatica della catepsina K, contenente il 40% dei legami desossipiridinolici.

Il CTX ha quattro isomeri secondo l'isomerizzazione dell'aspartato e la sua racemizzazione. Sia la racemizzazione che l'isomerizzazione aumentano con l'età del tessuto: la misura delle diverse forme potrebbe dare quindi informazioni sull'età media del tessuto.

La sigla ICTP-1 o CTX.MMP designa un frammento più ampio della porzione carbossi-terminale del collagene di tipo 1, che si forma per azione di metallo-proteasi.

Tabella 4f.12

Alterazioni delle concentrazioni di CTX da cause fisiopatologiche

Aumentate da	Estate (20-30% più alto) Crescita nell'adolescenza Seconda metà del ciclo mestruale Menopausa Osteoporosi (<i>cf</i> cap 5)
---------------------	--

Bibliografia

- Fledelius C, Johnsen AH, Cloos PAC, et al. *Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the C-terminal telopeptide (alpha1) region. J Biol Chem 1997, 272: 9755-63.*
- Garnero P, Fledelius C, Gineyts E, et al. *Decreased beta-isomerization of the C-terminal telopeptide of type collagen alpha 1 chain in Paget's disease of bone. J Bone Miner Res 1997, 12: 1407-15.*

Galattosil-idrossilisina

Fisiologia

I gruppi idrossilici assicurano la stabilità dei *cross-link* intra- e inter-molecolari del collagene; tuttavia, l'idrossilisina è presente anche in proteine non collageniche, come C_{1q}, acetilcolinesterasi, recettori *scavenger* dei macrofagi, ecc. La glicosilazione dei residui di idrossilisina porta alla formazione di derivati glicosidici differenti nel collagene presente nei diversi tessuti. Nel collagene osseo prevalgono i residui monoglicosilati, in particolare galattosil-idrossilisina (GHL), rilasciato in circolo durante la fase di riassorbimento osseo ed eliminato con le urine (dove viene misurato) senza subire tappe metaboliche intermedie. Il vantaggio principale, quindi, dell'idrossilisina rispetto all'idrossiprolina è che non è "riusata" o catabolizzata quando il collagene è degradato: la GHL urinaria rappresenta, quindi, il *pool* totale del collagene degradato.

Bibliografia

- Cunningham LW, Ford JD, Segrest JP. *The isolation of identical hydroxylysyl glycosides from hydroxylates of soluble collagen and from human urine. J Biol Chem* 1967, 242: 2570-1.
- Moro L, Noris-Suarez K, Michalsky M, et al. *The glycosides of hydroxylysine are final products of collagen degradation in humans. Biochim Biophys Acta* 1993, 1156: 288-90.
- Segrest JP, Cunningham LW. *Variations in human urinary O-hydroxylysyl glycoside levels and their relationship to collagen metabolism. J Clin Invest* 1970, 49: 1497-509.

4g. Adenosin-monofosfato ciclico (cAMP)

Romolo Dorizzi

(Per informazioni sul dosaggio cfr cap 23l)

L'AMP ciclico gioca un ruolo importante quale "secondo messaggero" nella regolazione di molte funzioni cellulari ed anche dell'aggregazione piastrinica. In particolare, un aumento di cAMP si accompagna ad inibizione della mobilizzazione del calcio, mentre una sua diminuzione favorisce il processo di aggregazione piastrinica.

I livelli intra-cellulari di cAMP sono regolati da due sistemi enzimatici: l'AMP ciclico si forma dall'AMP per azione dell'enzima adenil-ciclastasi ed è degradato a 5'-AMP attraverso l'enzima fosfo-diesterasi. La concentrazione di cAMP intra-cellulare è dunque il risultato di un apporto e di una degradazione continui. Aumenti di cAMP possono essere dovuti quindi sia a stimolazione di adenil-ciclastasi sia ad inibizione di fosfo-diesterasi.

Biochimica

Circa la metà del cAMP urinario deriva dal plasma ed è processato dalla filtrazione glomerulare, mentre il resto è di origine renale (cAMP nefrogenico) e dipende dal numero dei tubuli attivi e dalla concentrazione di PTH.

Il PTH stimola nella corteccia renale l'adenilato-ciclastasi che converte l'ATP in cAMP: più è alta la concentrazione del PTH, più cAMP è rilasciato dalle cellule tubulari nel filtrato glomerulare. Nell'iperparatiroidismo primario (cfr cap 8) aumenta la sintesi del cAMP nefrogenico, mentre quella plasmatica è nei limiti.

Anche se l'ADH stimola l'adenilato-ciclastasi, la sete e l'assunzione di acqua non inducono variazioni significative nell'escrezione di cAMP.

Tabella 4g.1

Alterazioni delle concentrazioni di cAMP da cause fisiopatologiche

Diminuite da	Ipoparatiroidismo (cfr cap 11a) Pseudoipoparatiroidismo di tipo 1 (cfr cap 11b) Depressione
Aumentate da	Iperparatiroidismo primitivo (cfr cap 8) Ipercalcemia neoplastica (cfr cap 10a) Osteomalacia (cfr cap 13b) Malassorbimento Urolitiasi con ipercalciuria (cfr cap 10b) Pseudoipoparatiroidismo tipo 2 (cfr cap 11b)

Tabella 4g.2

Modificazioni farmaco-indotte dei livelli di cAMP

Aumentati a livello tissutale da (non è certa l'azione a livello plasmatico)	PTH (cfr cap 4a) ADH ACTH Glucagone Fenotiazine Prostaglandine
---	---

Bibliografia

Broadus AE, Mahaffey JE, Bartter FC, et al. Nephrogenous cyclic adenosine monophosphate as a parathyroid function test. J Clin Invest 1977, 60: 771-83.

Gennari C, Galli M, Montagnani M, et al. The diagnostic value of the determination of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate (cAMP) in urine. Quad Sclavo Diagn 1976, 12: 15-38.

