

*"Le distrofinopatie nell'età evolutiva: valutazione clinica, omeostasi fosfo-calcica, turnover e stato minerale osseo"*

*"Le distrofinopatie nell'età evolutiva:  
valutazione clinica, omeostasi fosfo-calcica,  
turnover e stato minerale osseo"*

## **Riassunto**

Nell'ultimo decennio, in conseguenza della diffusione di *standard care* che prevedono l'impiego precoce di corticosteroidi ed un più adeguato monitoraggio multidisciplinare delle condizioni associate (complicanze respiratorie, cardiache, ortopediche, endocrinologiche ed alimentari), la storia naturale della Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) è cambiata sensibilmente mostrando un aumento dell'aspettativa di vita ed un miglioramento dello stato di salute.

Tra le caratteristiche cliniche associate alla DMD si include anche una progressiva riduzione della massa minerale ossea, più evidente con l'aumentare dell'età e dopo la perdita del cammino. Gli studi presenti in letteratura a riguardo sono ancora limitati e l'interpretazione della riduzione della massa minerale ossea è al momento prevalentemente attribuita al secondario effetto della terapia con corticosteroidi e/o alla ipomobilità da deficit stenico; tuttavia, tali ipotesi non risultano sufficientemente esaustive.

Il presente studio ha avuto tra gli obiettivi quello di valutare in una popolazione di pazienti affetti da distrofinopatia (distrofia muscolare di Duchenne, DMD, e di distrofia muscolare di Becker, DMB):

- lo stato minerale osseo mediante ultrasonografia ossea (QUS) e densitometria a doppio raggio-X (DXA).
- l'omeostasi fosfo-calcica (calcio, fosforo, magnesio, fosfatasi alcalina e paratormone), i metaboliti della vitamina D [25-OH-D e 1,25(OH)<sub>2</sub>D] e gli indici biochimici del *turnover* osseo (osteocalcina, procollagene I e telopeptidi del collagene I).

I dati densitometrici ottenuti sono stati correlati con il grado di forza muscolare, valutata tramite *Medical Research Council (MRC)*, con il grado di funzionalità motoria ed il grado di resistenza al cammino, valutati rispettivamente mediante l'impiego di recenti e specifiche scale funzionali validate sulla popolazione distrofinopatica; *North Star Ambulatory Assessment (NSAA)* e *6 Minute Walk Test (6MWT)*.

In questo lavoro, per la prima volta, queste scale funzionali sono state correlate con indici densitometrici e biochimici ossei.

Il campione in studio era costituito da 17 pazienti, 7 dei quali affetti da DMB e 10 affetti da DMD. I pazienti erano tutti deambulanti eccetto uno. Inoltre, 8 pazienti, 7 affetti da DMD ed uno affetto da DMB, assumevano terapia con corticosteroidi, in media da  $36,6 \pm 24,6$  mesi per una dose cumulativa di  $23014 \pm 16740$  mg.

I risultati densitometrici ottenuti hanno evidenziato, sia nei pazienti affetti da DMB che nei pazienti affetti da DMD, una riduzione dello stato minerale osseo, più evidente a carico degli arti inferiori; l'entità della riduzione della BMD variava in rapporto alla malattia e alla sede di valutazione, indicando un maggiore coinvolgimento osseo nei pazienti affetti da DMD rispetto a quelli affetti da DMB. E' inoltre emersa una correlazione tra i parametri densitometrici e le misure ottenute dalla valutazione motoria. I nostri dati suggeriscono che il mantenimento della capacità di deambulazione ha degli effetti positivi sullo stato minerale osseo. Nei nostri pazienti i valori di BMD sembrano quindi prevalentemente influenzati dalla funzionalità motoria, confermando l'ipotesi che correla la riduzione della BMD alla progressiva riduzione della stenia muscolare e della mobilità motoria. Questi risultati confermano gli effetti positivi della forza e della massa muscolare sulla acquisizione della massa ossea durante l'età evolutiva e sugli effetti negativi che le patologie osteo-muscolari hanno su tale processo, determinando la *c.d.* "osteoporosi da scarso uso". Inoltre, il rilievo di una correlazione tra parametri

densitometrici e valutazione motoria consente di individuare nelle scale *NSAA* e *6MWT* un possibile strumento di *follow-up* e di *outcome* anche sullo stato minerale osseo.

Non sono state individuate correlazioni tra valori densitometrici e terapia con corticosteroidi, sia in termini di dose che di durata del trattamento, né tra valori densitometrici e stato vitaminico D.

Per quanto riguarda i principali parametri di omeostasi fosfo-calcica è stato evidenziato che sia i pazienti DMB che i pazienti DMD mostravano normali valori di calcio, fosforo, magnesio e fosfatasi alcalina. I valori di PTH risultavano nei limiti della norma in tutti i pazienti, tranne in un soggetto con DMD che presentava un iperparatiroidismo secondario a deficit di vitamina D (10.1 ng/ml). I valori di 1,25(OH)<sub>2</sub>D erano nei limiti della norma in tutti i pazienti DMB/DMD.

Lo stato vitaminico D, valutato mediante la misurazione dei livelli circolanti di 25-OH-D, è risultato ridotto in tutti i pazienti esaminati, ad eccezione di un paziente del gruppo DMB. La riduzione dei valori di 25-OH-D risultava essere indipendente dalla assunzione di corticosteroidi. Questo dato appare piuttosto rilevante poiché mette in evidenza che i pazienti affetti da distrofinopatie sono a rischio di ipovitaminosi D indipendentemente dal trattamento corticosteroidico.

Lo studio degli indici biochimici del turnover osseo non ha messo in evidenza significative alterazioni del processo di formazione ossea (osteocalcina e propeptide N-terminale del procollagene tipo I) e del processo di riassorbimento osseo (telopeptide del collagene tipo I) nei pazienti esaminati; tuttavia, era evidente la tendenza nei pazienti affetti da DMD a presentare valori più bassi di osteocalcina e PINP che però non raggiungevano valori di significatività statistica in rapporto al numero dei pazienti esaminati.

Sulla base dei risultati del presente studio potrebbe essere opportuno:

- prevedere un monitoraggio precoce dello stato minerale osseo mediante metodiche densitometriche in tutti i pazienti con distrofinopatie, indipendentemente dal trattamento corticosteroido.
- effettuare un controllo periodico (almeno semestrale) dello stato vitaminico D e dei parametri del metabolismo fosfo-calcico in tutti i pazienti con distrofinopatie già dalla diagnosi.
- supplementare con vitamina D tutti i pazienti con distrofinopatie affinché venga mantenuto un adeguato stato vitaminico D.

## **SOMMARIO**

<b>CAPITOLO 1</b>	
1. Introduzione .....	8
<b>1.1 LE DISTROFINOPATIE</b> .....	9
1.2 Clinica .....	13
1.3 Il trattamento .....	18
1.4 La valutazione motoria clinica e funzionale: misure di outcome .....	21
<b>CAPITOLO 2</b>	
<b>PICCO DI MASSA OSSEA</b> .....	25
2.1 Condizioni patologiche che si associano ad una riduzione della densità minerale ossea in età evolutiva .....	29
2.2 Metodiche di valutazione densitometrica della massa minerale ossea .....	31
2.3 Indici biochimici del turnover osseo .....	33
<b>CAPITOLO 3</b>	
<b>METABOLISMO E VALUTAZIONE DELLO STATO VITAMINICO D</b> .....	35
<b>CAPITOLO 4</b>	
<b>STATO MINERALE OSSEO NELLA DMD</b> .....	40
4.1 Attuali indicazioni per il monitoraggio dell'osso nei pazienti DMD in trattamento con steroidi .....	44
<b>CAPITOLO 5</b>	
<b>SCOPI DELLO STUDIO</b> .....	46
<b>CAPITOLO 6</b>	
<b>PAZIENTI</b> .....	47
<b>CAPITOLO 7</b>	
<b>METODI</b> .....	52
7.1 Le tecniche densitometriche .....	52
7.2 QUS .....	52
7.3 DXA .....	55

7.4 Misurazione della omeostasi fosfo-calcica, dello stato vitaminico D e degli indici di turnover osseo.....	57
7.5 Valutazione della funzionalità motoria .....	57
<b>CAPITOLO 8</b>	
<b>ANALISI STATISTICA .....</b>	<b>60</b>
<b>CAPITOLO 9</b>	
<b>RISULTATI .....</b>	<b>61</b>
9.1 Parametri auxologici.....	61
9.2 Score ottenuti dalle scale di valutazione funzionale motoria .....	62
9.3 Parametri densitometrici.....	64
9.4 Correlazioni tra i parametri densitometrici, i parametri di valutazione funzionale-motoria, il trattamento corticosteroideo e lo stato vitaminico D.	72
9.5 Correlazioni tra i parametri densitometrici.....	78
9.6 Parametri del metabolismo fosfo-calcico e stato vitaminico D. ....	78
9.7 Indici biochimici del turnover osseo .....	83
<b>CAPITOLO 10</b>	
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>88</b>
<b>CAPITOLO 11</b>	
<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>95</b>
<b>CAPITOLO 12</b>	
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>98</b>

## Capitolo 1

### 1. Introduzione

Le malattie neuromuscolari rappresentano un gruppo di patologie geneticamente determinate che colpiscono prevalentemente il muscolo scheletrico e presentano un andamento cronico progressivo <sup>(1)</sup>.

Sono differenziate in 16 gruppi:

1) distrofie muscolari, 2) distrofie muscolari congenite, 3) miopatie congenite, 4) miopatie distali, 5) altre miopatie, 6) miotonia, 7) malattie muscolari legate ad un difetto dei canali ionici, 8) ipertermia maligna, 9) miopatie metaboliche, 10) cardiomiopatie ereditarie, 11) sindromi miasteniche congenite, 12) malattie del motoneurone, 13) atassia ereditaria, 14) neuropatie ereditarie motorie e sensitive, 15) paraplegia ereditaria, 16) altre malattie neuromuscolari <sup>(2)</sup>.

Secondo la recente classificazione monogenetica delle malattie neuromuscolari <sup>(2)</sup> le principali forme di distrofia muscolare sono:

- ✓ distrofia muscolare di Duchenne (DMD/BMD),
- ✓ distrofia muscolare tipo Emery-Dreifuss,
- ✓ distrofia muscolare Nesprin related,
- ✓ distrofia facio-scapolo-omerale,
- ✓ distrofia muscolare dei cingoli o Limb-Gardle (LGMD).

Queste forme sono accomunate da una progressiva degradazione della fibra muscolare che può accompagnarsi, per secondaria sostituzione fibroadiposa dei miociti, a variazioni

del volume della consistenza, dell'estensibilità e della contrattilità del muscolo. La degenerazione muscolare determina un incremento della concentrazione sierica dell'enzima CreatinKinasi (CK), che pertanto è considerato un marker del processo di degradazione muscolare. Questo processo sul piano clinico si traduce in una progressiva ipostenia che interessa, nelle diverse forme, distretti muscolari differenti.

Nel nostro lavoro prenderemo in considerazione soltanto quelle forme di distrofia muscolare, dovute ad un difetto geneticamente determinato, del gene *DMD* (OMIM 300377) codificante per la proteina distrofina (*dys*); tali forme sono anche note con il termine di distrofinopatie.

## ***1.1 Le distrofinopatie***

Le distrofinopatie comprendono la Distrofia di Duchenne (DMD, Distrofia muscolare Duchenne; OMIM 310200) e la sua forma allelica più lieve, la Distrofia di Becker (DMB, Distrofia muscolare di Becker ; OMIM 300376); entrambe sono causate da una mutazione a carico del gene *DMD* localizzato sul cromosoma X (Xq21.2). La trasmissione genetica avviene nei due terzi dei casi con modalità X-linked, ossia da madre in figlio; pertanto le femmine portatrici ad ogni gravidanza hanno una probabilità del 50% di trasmettere la mutazione *DMD* alla prole; in un terzo dei casi la mutazione è invece *de novo* <sup>(3)</sup>. La DMD colpisce quasi esclusivamente maschi. Le femmine che ereditano la mutazione risultano portatrici e come tali potranno presentare fenotipi clinici da asintomatici a paucisintomatici, ma mostrano, rispetto alla popolazione generale, un rischio più elevato di sviluppare cardiomiopatie <sup>(4)</sup>

La DMD ha un'incidenza stimata in 1/3.300 nati maschi; la DMB tra 1/18.000 e 1/31.000 maschi. (www.orpha.net consultato in data 26 luglio 2012).

Il gene *DMD* è costituito da 2,5 milioni di paia di basi, contiene circa 80 introni e 79 esoni e codifica per la distrofina (*dys*), una proteina di circa 3000 aminoacidi dal peso molecolare di 417 kDa. Nel 60-70% dei casi le mutazioni del gene *DMD* sono rappresentate da delezioni di uno o più esoni <sup>(5)</sup>, nel 5-10% da una duplicazione <sup>(6)</sup>, e tra il 25%-35% le mutazione sono puntiformi, ossia determinate da piccole delezioni o inserzioni a base singola <sup>(7)</sup>; le mutazioni puntiformi sono più frequenti nella forma DMD rispetto alla BMD e vanno pertanto indagate nei quadri clinici fortemente suggestivi che mostrano una negatività alla ricerca di delezioni/duplicazioni <sup>(8)</sup>. Le mutazioni possono essere definite *in-frame* (delezioni/duplicazioni), ossia che non alterano la cornice di lettura del codice genetico e sono generalmente correlate con un fenotipo più lieve, od *out-of-frame*, ossia che alterano la cornice di lettura del codice genetico e si associano a formazione di una proteina troncata e non funzionante o assente; queste ultime sono di norma correlate ad un fenotipo DMD più severo <sup>(9)</sup>.

La differenza fondamentale tra il fenotipo DMD e quello DMB è rappresentato dalla possibilità, nel secondo caso, di disporre di una quota di *dys*; il fenotipo BMD è in genere determinato da delezioni o duplicazioni *in-frame*, che non bloccano la formazione del prodotto proteico pertanto la mutazione sarà responsabile della formazione di una proteina anomala, ma che conserva una funzione parziale; la gravità della malattia è dipendente dalla quantità e dalla funzionalità della distrofina residua <sup>(10)</sup>. Nonostante l'avanzamento delle conoscenze sulla correlazione genotipo-fenotipo, ancora oggi l'indagine biotica muscolare, con valutazione morfoistologica, immunostochimica e con immunoblotting per la *dys*, mantiene un importante ruolo nel percorso diagnostico. Tramite tecniche di Western blot e immunoistochimica è infatti possibile effettuare una

valutazione quantitativa (*Western Blot*) e qualitativa (immunoistochimica) della proteina dys all'interno della fibra muscolare.

Si conoscono 7 isoforme della dys<sup>(11)</sup> le quali sono espresse nel muscolo, nel cervello, nel cuore, nel rene, nel polmone, nell'occhio e nel testicolo; la maggior parte dei tessuti contiene trascrizioni multiple delle isoforme. La dys svolge un ruolo meccanico e di *signaling* a livello della membrana citoplasmatica. La proteina è situata nel citoplasma dove ha rapporti: per mezzo dell'estremità aminoterminale con i filamenti di actina del citoscheletro della fibra muscolare, per mezzo dell'estremità carbossiterminale e attraverso una regione ricca di cisteina (cys) con il  $\beta$ -dystroglicano, proteina transmembrana del sarcolemma che a sua volta mantiene rapporti con l' $\alpha$ -dystroglicano e con il complesso dei sarcoglicani. Così facendo costituisce un ponte tra le strutture del citoscheletro e quelle della membrana conferendo maggiore stabilità ed elevata resistenza meccanica alla membrana stessa, di contro l'assenza della dys renderebbe la membrana plasmatica più sensibile allo stress meccanico e quindi alla rottura. Tuttavia come l'assenza della dys determini la profonda e progressiva atrofia muscolare, l'infiammazione e la successiva fibrosi non è ancora del tutto chiarito. Secondo una ipotesi patogenetica, la mancanza/riduzione della dys avrebbe delle ripercussioni sulla organizzazione e sulla stabilità della membrana anche in termini di riduzione quantitativa di proteine di membrana come il dystroglicano e il complesso del sarcoglicano<sup>(12)</sup> e di aumento dell'espressività di altre proteine come ad esempio la caveolina 3 con anomalo funzionamento dei canali legati alla caveolina<sup>(13)</sup>. Il danno muscolare potrebbe pertanto essere mediato anche da alcune proteine di membrana con funzione di canale, che favorendo l'ingresso di calcio nell'ambiente intracellulare causerebbero l'attivazione di enzimi ad azione degradativa<sup>(14)</sup> (Figura 1).

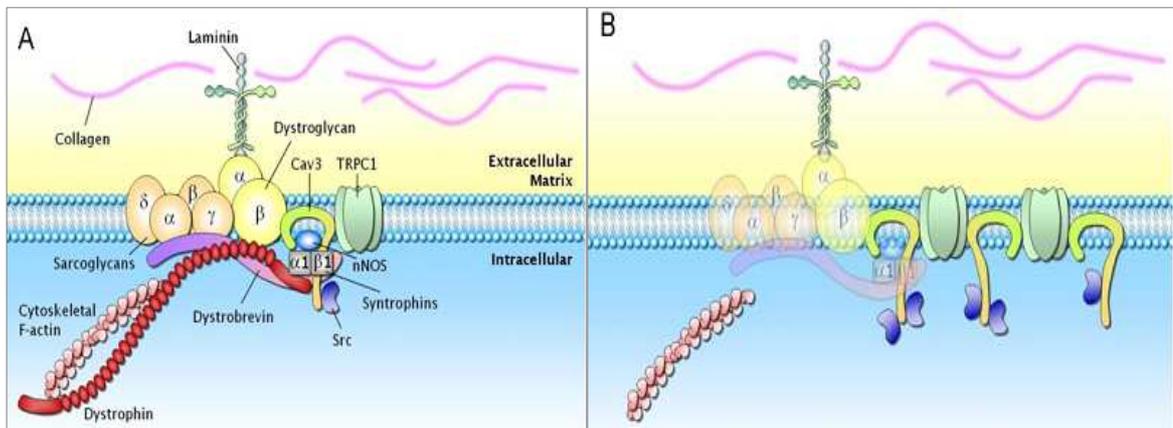


Figura. 1: A mostra la relazione tra distrofina, la distrofina-proteina associata complesso, la membrana e la superficie della matrice extracellulare in condizioni normali. B mostra alcuni dei cambiamenti osservati nel muscolo distrofico <sup>(14)</sup>.

La degradazione delle fibre muscolari, presente sin dalle prime fasi della malattia, si accompagna a rialzo dell'enzima Creatinasi (CK) nel siero, che pertanto rappresenta un marker di danno muscolare. Nei maschi DMD i livelli sierici di CK raggiungono valori pari a circa 10 volte il normale, nel BMD il livello sierico di CK è circa 5 volte il normale. Nelle femmine portatrici della mutazione nel gene DMD il valore di CK è aumentato tra le 2 e le 10 volte rispetto la norma. Nella storia naturale della DMD, a causa della progressiva sostituzione delle fibre muscolari distrofiche con tessuto fibroadiposo, la concentrazione di CK sierico, diminuisce gradualmente con l'avanzare dell'età.

## **1.2 Clinica**

Le prime descrizioni cliniche della DMD risalgono al 1852 ad opera dell'inglese E. Meryon e, successivamente, nel 1868 al francese, G.B. Duchenne di Boulogne, che formulò alcuni criteri di diagnosi clinica tuttora validi. I sintomi evidenziati da G.B. Duchenne di Boulogne erano debolezza muscolare; accentuazione della lordosi lombare con andatura anserina; ipertrofia di alcuni distretti muscolari; decadimento progressivo della forza e della contrattilità muscolare; assenza di febbre, di disturbi del sensorio, della vescica e dell'intestino. Successivamente W.R. Gowers descrisse dettagliatamente le particolari modalità impiegate dal bambino affetto da DMD per alzarsi da terra, note appunto come 'manovra di Gowers' che consiste nel realizzare il sollevamento del tronco mediante l'estensione delle braccia che appoggiano sugli arti inferiori a livello del ginocchio; questa manovra rappresenta un segno indiretto dell'ipostenia a livello del cingolo pelvico.



*"Manovra di Gowers". Illustrazione tratta da netterimages.com*

Solo più tardi, nel 1953, P.E. Becker, descrisse l'omonima forma di distrofia, caratterizzata da una età di esordio più tardivo e da una progressione più lenta rispetto alla DMD.

Come aveva già postulato G.B. Duchenne di Boulogne, ancora oggi la principale manifestazione clinica della patologia è rappresentata da ipostenia simmetrica e progressiva con distribuzione inizialmente prossimale e successivo coinvolgimento anche dei distretti distali, che porta alla perdita del cammino ed alla comparsa di manifestazioni secondarie quali scoliosi e difficoltà respiratorie, si associano pseudoipertrofia muscolare, maggiormente evidente a livello del tricipite delle sure, e coinvolgimento cardiaco <sup>(15)</sup>.

Negli ultimi dieci anni la possibilità di effettuare una diagnosi genetica più precoce, la maggiore conoscenza dell'evoluzione delle complicanze secondarie, la migliore pianificazione degli approcci di trattamento e di prevenzione multidisciplinare con la diffusione di standard care, tra cui l'impiego dei corticosteroidi e introduzione di apparecchi respiratori insufflator-exufflator, hanno avuto un significativo impatto positivo sul decorso della DMD con un rallentamento nella progressione della patologia, un allungamento del mantenimento delle abilità motorie, un miglioramento della funzionalità respiratoria. La storia naturale della DMD si è pertanto modificata mostrando oggi un miglioramento dello stato di salute generale ed un aumento dell'aspettativa di vita <sup>(16)</sup>. (Figura 2)

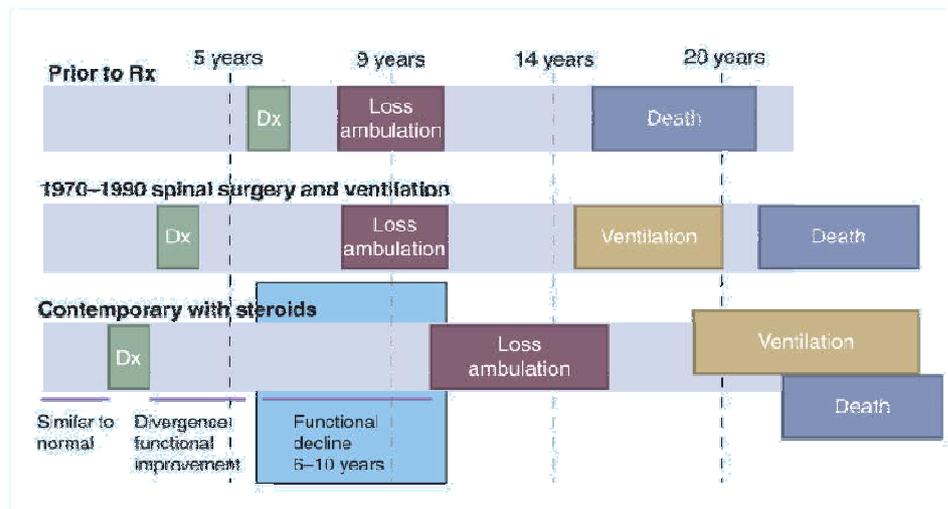


Figura 2 Rappresentazione schematica dei cambiamenti che la storia naturale della DMD ha presentato nel corso del tempo. Tratta da: "Clinical outcome measures for trials in Duchenne muscular dystrophy: report from International Working Group meetings". Bushby K, Connor E.

La progressione della DMD mostra oggi una traiettoria prevedibile che si articola in tre fasi: nella prima non si hanno manifestazioni cliniche significative della malattia, i bambini, seppur con un ritmo di sviluppo più lento e con minore prestazione fisica rispetto ai coetanei, acquisiscono le principali abilità motorie per l'età; la diagnosi in questa fase avviene più spesso in modo accidentale. Segue una seconda fase definita di plateau, ossia di mantenimento delle abilità motorie acquisite, ed infine una terza fase caratterizzata da una lenta e progressiva perdita della forza e delle competenze motorie durante la quale si apprezzano: ricorso alla "manovra di Gowers", difficoltà a salire le scale, andatura anserina, iperlordosi lombare e nella seconda decade perdita del cammino, complicanze ortopediche e cardiorespiratorie. Circa il 90% degli individui affetti da DMD/BMD mostra un coinvolgimento cardiaco in forma clinica o subclinica che è in genere asintomatico nelle fasi iniziali della malattia, ma che determina poi anomalie del ritmo o della morfologia cardiaca. L'interessamento cardiaco rappresenta la causa di morte solo nel 20% degli individui con DMD e nel 50% dei BMD <sup>(17)</sup>. La principale causa di

morte, che avviene in media intorno alla terza decade, è ancora oggi legata alla ingravescente insufficienza respiratoria secondaria al coinvolgimento della muscoli respiratori aggravata dalle deformità del rachide. Nel corso della DMD inoltre si possono riscontrare altre componenti sintomatologiche legate ad esempio ad interessamento del sistema nervoso centrale verosimilmente legato alla alterata espressività della distrofina a livello centrale. I soggetti DMD mostrano peculiari profili neuropsicologici caratterizzati da deficit nella memoria di lavoro e delle funzione esecutive, difficoltà psicolinguistiche <sup>(18)</sup>, lieve disabilità intellettiva <sup>(11)</sup> ed incidenza di disturbi dello spettro autistico più elevata rispetto alla popolazione generale <sup>(19)</sup>. Infine nel corso della storia naturale della DMD è possibile assistere ad una progressiva riduzione dello stato minerale osseo che si accompagna ad aumento delle incidenze delle fratture. A questo argomento è dedicata la successiva sezione di questa trattazione (capitolo 4). In tabella 1 sono riportate le principali fasi della distrofia di Duchenne e le relative considerazioni cliniche multidisciplinari.

A differenza della DMD, la distrofia muscolare di Becker mostra uno spettro sintomatologico più lieve, l'esordio della malattia è solitamente più tardivo, in media intorno ai 10 anni, ed i quadri clinici mostrano ampia variabilità variando da forme caratterizzate da progressiva debolezza del cingolo pelvico e più tardiva compromissione del cingolo scapolare, con atrofia muscolare simmetrica (prevalentemente prossimale) e ipertrofia delle sure; a quadri più lievi caratterizzati da isolata ipostenia del quadricipite femorale, mialgie e/o crampi muscolari, ridotta tolleranza all'esercizio fisico, mioglobinuria dopo sforzo fino a quadri con isolato aumento asintomatico della CK. La perdita della deambulazione può avvenire ad età molto variabili, anche fino a 78 anni, con una età media di 48 anni <sup>(21)</sup>. Nonostante il coinvolgimento del muscolo scheletrico sia più

mite rispetto alla DMD, l'insufficienza cardiaca a tipo cardiomiopatia dilatativa è una causa frequente di morbidità e la più comune causa di morte nei soggetti con BMD <sup>(22)</sup>.

	Stage 1: Presymptomatic	Stage 2: Early ambulatory	Stage 3: Late ambulatory	Stage 4: Early non-ambulatory	Stage 5: Late non-ambulatory
<b>Diagnosics</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Can be diagnosed at this stage if creatine kinase found to be raised or if positive family history</li> <li>Might show developmental delay but no gait disturbance</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gowers' sign</li> <li>Waddling gait</li> <li>Might be toe walking</li> <li>Can climb stairs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increasingly laboured gait</li> <li>Losing ability to climb stairs and rise from floor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Might be able to self propel for some time</li> <li>Able to maintain posture</li> <li>Might develop scoliosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Upper limb function and postural maintenance is increasingly limited</li> </ul>
<b>Neuromuscular management</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anticipatory planning for future developments</li> <li>Ensure immunisation schedule is complete</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Continue assessment to ensure course of disease is as expected in conjunction with interpretation of diagnostic testing</li> <li>At least 6-monthly assessment of function, strength, and range of movement to define phase of disease and determine need for intervention with GCs, ongoing management of GC regimen, and side-effect management</li> </ul>			
<b>Orthopaedic management</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Orthopaedic surgery rarely necessary</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Consider surgical options for TA contractures in certain situations</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Monitor for scoliosis: intervention with posterior spinal fusion in defined situations</li> <li>Possible intervention for foot position for wheelchair positioning</li> </ul>	
<b>Rehabilitation management</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Education and support</li> <li>Preventive measures to maintain muscle extensibility/minimise contracture</li> <li>Encouragement of appropriate exercise/activity</li> <li>Support for function and participation</li> <li>Provision of adaptive devices, as appropriate</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Continue previous measures</li> <li>Provision of appropriate wheelchair and seating, and aids and adaptations to allow maximum independence in ADL, function, and participation</li> </ul>			
<b>Pulmonary management</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Normal respiratory function</li> <li>Ensure usual immunisation schedule includes 23-valent pneumococcal and influenza vaccines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Low risk of respiratory problems</li> <li>Monitor progress</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Increasing risk of respiratory impairment</li> <li>Trigger respiratory assessments</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>High risk of respiratory impairment</li> <li>Trigger respiratory investigations and interventions</li> </ul>
<b>Cardiac management</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Echocardiogram at diagnosis or by age 6 years</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Maximum 24 months between investigations until age 10 years, annually thereafter</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Assessment same as in the younger group</li> <li>Increasing risk of cardiac problems with age, requires intervention even if asymptomatic</li> <li>Use of standard heart failure interventions with deterioration of function</li> </ul>		
<b>GI, speech/swallowing, nutrition management</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Monitor for normal weight gain for age</li> <li>Nutritional assessment for over/underweight</li> </ul>				<ul style="list-style-type: none"> <li>Attention to possible dysphagia</li> </ul>
<b>Psychosocial management</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Family support, early assessment/intervention for development, learning, and behaviour</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Assessment/intervention for learning, behaviour, and coping</li> <li>Promote independence and social development</li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>Transition planning to adult services</li> </ul>

Tabella 1: Fasi della malattia e relative considerazioni cliniche multidisciplinari. Tratta da "Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1:" <sup>(20)</sup>.

### **1.3 Il trattamento**

Ad oggi il trattamento farmacologico delle distrofinopatie è rappresentato dai corticosteroidi, che pur non rappresentando una cura, si sono dimostrati efficaci nel rallentare il declino della forza e della funzione muscolare <sup>(23, 24, 25, 26)</sup>, prolungando la capacità di mantenimento della deambulazione di circa due anni, nel ridurre il rischio di scoliosi e nello stabilizzare la funzionalità respiratoria <sup>(27, 28)</sup> e quella cardiaca <sup>(29)</sup>. Anche dopo la perdita della deambulazione il trattamento con cortisonici può essere continuato allo scopo di preservare la forza a carico degli arti superiori, di prevenire la scoliosi e di rallentare il declino respiratorio e cardiaco <sup>(28)</sup>. Il trattamento con cortisonici dovrebbe essere proposto nel momento in cui il bambino ha raggiunto il plateau di sviluppo motorio, ossia quando mostra il massimo delle abilità, e prima che inizi la fase di declino, tale periodo si colloca solitamente intorno ai 4-6 anni. L'effetto funzionale è minore se il farmaco viene iniziato in prossimità della perdita della deambulazione. La terapia con corticosteroidi non è raccomandata nei bambini di età inferiore ai due anni <sup>(32)</sup>.

I corticosteroidi comunemente impiegati sono il Prednisolone e il Deflazacort, si ipotizza che la loro efficacia terapeutica sia da un lato legata ad un effetto di stabilizzazione della membrana, con riduzione del meccanismo di disgregazione della fibra muscolare, e dall'altro legata alla riduzione dei fenomeni di infiammazione e di necrosi con stimolazione della rigenerazione muscolare. Il regime di trattamento prevede la somministrazione giornaliera di 0.75mg/Kg per il Prednisolone e di 0.9mg/Kg per il Deflazacort. ([www.treat-nmd.eu](http://www.treat-nmd.eu)). Tali schemi posologici sembrano fornire un buon compromesso tra effetto terapeutico ed effetti collaterali <sup>(30)</sup>. Sono tuttavia possibili schemi posologici alternativi che prevedono un dosaggio giornaliero più basso o la

somministrazione a giorni alterni o a regimi intermittenti (10 giorni sì e 10 no, alte dosi nei weekend); tali schemi sono principalmente utilizzati per ridurre l'incidenza degli effetti collaterali.

L'uso cronico dei corticosteroidi può favorire infatti: aumento del peso, aspetto cushingoide, bassa statura con ritardo puberale, acne, intolleranza al glucosio, ipertensione, epigastralgia, difetti di assorbimento intestinale, cataratta, alterazioni del comportamento, osteoporosi, ipertricosi. I principali effetti collaterali le indicazioni per il loro monitoraggio sono riportate nella Tabella 2. Nonostante gli effetti collaterali siano frequenti, solo in una minima percentuale di casi, rappresentano una controindicazione assoluta al trattamento; nella maggior parte dei pazienti è infatti sufficiente modificare lo stile di vita, ridurre la dose terapeutica o passare a schemi posologici alternativi senza perdere i sostanziali benefici del trattamento. Tra le due formulazioni farmacologiche il deflazacort sembra offrire, rispetto al Prednisolone, un profilo più favorevole sugli effetti collaterali <sup>(31)</sup>, in particolare è da preferirsi quando si vuole ottenere un migliore controllo sul peso <sup>(25)</sup>, ma determina, rispetto al prednisolone, una maggiore incidenza di cataratta asintomatica.

Durante il decorso della DMD, al fianco del trattamento con corticosteroidi, sono inoltre necessari interventi terapeutici, farmacologici e non, finalizzati al mantenimento della funzionalità motoria, respiratoria, alla prevenzione delle deformità scheletriche, delle complicanze cardiache, nutrizionali ed ortopediche.

In futuro, grazie agli importanti sforzi che la ricerca ha compiuto negli anni, le strategie terapeutiche nella lotta alla DMD potranno essere più specifiche ed efficaci. Al momento le principali sperimentazione in corso riguardano l'*exon skipping*, che mediante l'impiego di oligonucleotidi antisenso, permetterebbe lo *skipping* dell'esone mutato. L'idea alla base è di ripristinare il corretto schema di lettura del gene eliminando quelle sequenze in

cui è presente la mutazione, così da garantire la sintesi di una quota, seppure ridotta o ipofunzionante di distrofina <sup>(33)</sup>, convertendo la DMD in DMB e rallentando quindi la progressione della malattia <sup>(34)</sup> Altri importanti progetti in fase di sperimentazione sono Ataluren (PTC 124) <sup>(35)</sup> e le cellule staminali <sup>(36)</sup>.

	Recommended monitoring	Intervention
Constitutional and cosmetic		
Cushingoid features, obesity	Particular vigilance needed if patient, parents, or siblings are obese Dietary advice to be reinforced before starting steroids; warn about increased appetite	Implement proactive dietary management for the entire family, not just the patient Consider change from prednisone to deflazacort Select an alternative regimen
Hirsutism	Forewarn parents	Does not usually occur to an extent that warrants a change in medication
Acne, tinea, warts	More notable in teenagers	Use ancillary treatment measures (topical prescription) and do not rush to change the GC regimen unless the boy is emotionally distressed
Growth retardation	Monitor height at least every 6 months as part of general care (stature tends to be small in DMD even without steroid treatment )	Consider endocrine evaluation if growth plateaus
Delayed puberty	Monitor Tanner stage Identify any family history of delayed sexual maturation	Consider endocrine assessment if notably delayed or patient is upset by the delay
Adverse behavioural changes	Identify any baseline mood, temperament, ADHD issues, and advise parents that these often transiently worsen in the initial 6 weeks on GC therapy	Decide whether baseline issues should be treated before starting GC therapy (eg, ADHD counselling or prescription) Consider changing timing of GC medication to later in the day Consider behavioural health referral
Immune/adrenal suppression	Advise parents of risk of serious infection and need to promptly address minor infection Advise parents to inform all medical personnel that their child is on steroids and carry steroid alert card Ensure that the GC is not stopped abruptly	Obtain varicella immunisation before starting GC therapy; confirm with protective serum titre Engage in tuberculosis surveillance Obtain infectious diseases consultation if serious infection occurs Substitute prednisone equivalent if deflazacort is temporarily unavailable Implement intravenous stress-dose hydrocortisone or methylprednisolone coverage for surgery or major illness (no accepted treatment strategy; anaesthesia or endocrine consultation recommended) Give intravenous coverage if nothing by mouth
Hypertension	Monitor blood pressure as percentile for height and sex at each clinic visit	If blood pressure >99%, reduce salt intake, weight reduction If ineffective, refer for possible ACE inhibitor or $\beta$ blocker medication
Glucose intolerance	Urine dipstick for glucose at clinic visits Enquire about polyuria, polydipsia	If urine is glucose-positive, then try fasting or post-prandial blood glucose, and if abnormal, then seek an endocrine consultation
GERD	Enquire about GERD symptoms (heartburn) Advise parents to report symptoms	Avoid NSAIDs Prescribe ranitidine or proton-pump inhibitor and antacid if symptomatic
Peptic ulcer disease	Advise parents of risk and to report symptoms History of gastritis, GERD, abdominal pain, or faecal blood Test stool for blood if anaemic or suggestive history	Avoid NSAIDs Prescribe ranitidine or proton-pump inhibitor and antacid if symptomatic Seek gastrointestinal consultation
Cataracts	Annual ophthalmological examination	Consider switching from deflazacort to prednisone if cataracts evolve that affect vision Seek ophthalmology consultation
Bone demineralisation and increased fracture risk	Take careful fracture history Annual DEXA to monitor bone density Annual monitoring of 25-hydroxy vitamin D blood concentration (ideally late winter in seasonal climates) and supplement with vitamin D3 if level is <32 nmol/L Dietitian should assess calcium and vitamin D intake	For 25-hydroxy vitamin D concentration 20–31 nmol/L, give 1000 IU orally twice daily, for <20 nmol/L, give 2000 IU orally twice daily Recheck serum 25-hydroxy vitamin D concentration again after 3 months on therapy Encourage weight-bearing activities Take multivitamin supplements with vitamin D3 Consider bisphosphonates, such as pamidronate
Myoglobinuria	Enquire about abnormal coloration of urine after exercise, urine testing	Advise avoidance of excessive eccentric (eg, descending stairs, squatting down, trampolining) and resistive exercise Commence renal investigations if persistent

Tabella 2: Principali effetti collaterali nell'uso cronico di corticosteroidi, indicazioni per il monitoraggio e la cura. Tratta da "Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1:" <sup>(20)</sup>.

#### **1.4 La valutazione motoria clinica e funzionale: misure di outcome**

Dopo l'introduzione della terapia corticosteroidica e, ancor più, in seguito all'avvio dei nuovi trials terapeutici, l'impiego di misure standardizzate di outcome clinico e funzionale ha assunto un ruolo fondamentale nello stabilire l'efficacia e la sicurezza di un trattamento specifico <sup>(37)</sup>. Le principali misure di outcome sono rappresentate da scale funzionali motorie, dalla misurazione della forza, del range di movimento, dalla valutazione delle abilità funzionali legate alle attività della vita quotidiana <sup>(38)</sup> dal monitoraggio della progressione scoliotica, della funzionalità respiratoria (FEV1, FVC) e di quella cardiaca. La valutazione motoria del paziente con distrofinopatia prevede da un lato la quantificazione della forza muscolare e la misurazione dei ROM, range di movimento, dall'altro la valutazione qualitativa e funzionale motoria, che avviene mediante l'impiego di scale standardizzate che includono anche abilità motorie legate alla vita quotidiana (Tabella 3).

La misurazione quantitativa della forza muscolare viene effettuata nei diversi distretti muscolari e può avvenire mediante l'impiego di un miometro, che fornisce un punteggio oggettivo, o mediante una valutazione soggettiva tramite la scala *Medical Research Council* (MRC) <sup>(39)</sup>. La MRC prevede la valutazione della forza in 19 distretti muscolari da parte di un operatore esperto, che è tenuto ad attribuire, a ciascun distretto, un punteggio numerico che varia da 0 a 5: il punteggio 0 viene attribuito quando non vi è evidenza di alcuna contrazione muscolare; il punteggio 1 quando sono visibili tracce di contrazione muscolare; il punteggio 2 (+/-) viene attribuito quando sono possibili movimenti in assenza di gravità o contro minima resistenza; il punteggio 3 (+/-) è indicativo della possibilità di compiere movimenti contro gravità ma non contro

resistenza; il punteggio 4 (+/-) è attribuito quando il paziente dimostra un grado di debolezza da lieve a moderata e il punteggio 5 quando è presente una normale stenia. La scala ha lo scopo di monitorare nel tempo la progressione della ipostenia.

La misurazione periodica dell' ampiezza articolare o ROM, range of motion, consente di monitorare le modificazioni dell'escursione articolare allo scopo di prevenire o rallentare le retrazioni tendinee mediante la proposta di interventi fisioterapici mirati, di ortesi o di eventuali interventi ortopedici.

Per quanto riguarda la valutazione funzionale motoria negli ultimi anni, al fine di ottenere misure di outcome standardizzate, sono state redatte scale di valutazione specifiche per la popolazione distrofinopatica; alla stesura di tali strumenti ha contribuito anche il Nostro Istituto.

La principale scala funzionale è la NSAA, **North Scale Ambulatory Assessment** (NSAA) realizzata e validata per i pazienti DMD deambulanti; questa scala fornisce misure di outcome consentendo di quantificare modificazioni funzionali nel tempo<sup>(40, 41)</sup>. La scala valuta le attività grosso motorie ed è costituita dai 17 items che richiedono un impegno motorio crescente. Ad ogni item è possibile attribuire un punteggio che va da 0 a 2; il punteggio 0 è attribuito quando il paziente è incapace di realizzare il compito richiesto in maniera autonoma, il punteggio 1 quando ha la possibilità di farlo in modo autonomo, ma con ricorso a compensi, il punteggio 2 quando ha la possibilità di effettuare il compito in modo autonomo e senza ricorso a compensi. Tra gli items della scala sono presenti due prove con misurazione a tempo: il cammino per 10 metri e il tempo impiegato per sollevarsi da terra. Il punteggio totale è di 34/34. Altra prova motoria, largamente impiegata come misura di outcome, è il **6 minute Walk Test** (6MWT) che, tramite la misurazione dei metri percorsi in un tempo di 6 minuti, fornisce informazioni sulla capacità di resistenza al cammino<sup>(42, 43)</sup>.

Per i pazienti DMD non deambulanti sono al momento in uso varie scale motorie che valutano la funzionalità degli arti superiori come la *Egen Klassifikation* (EK) e la dimensione 3 della *Gross Motor Function Measure* (GMFM), tuttavia tali strumenti non sembrano in grado di riflettere i diversi livelli di capacità funzionale nelle attività di vita quotidiana nelle diverse fasce di età dei DMD<sup>(44)</sup>; per tale motivo è in corso di standardizzazione una specifica scala per pazienti duchenne non deambulanti. Tra le misure di outcome trovano inoltre impiego scale di valutazione dell'autonomia e della Qualità della Vita.

	Method	Aim of testing	Ambulatory	Non-ambulatory
Strength testing	Manual muscle testing (MRC scale) <sup>52</sup> Quantitative myometry (beneficial if muscle strength 3-5 on MRC scale)*	Serial assessment; to identify outliers from expected clinical course; to monitor disease progression and predict functional losses; to assess response to treatment; and to monitor muscle imbalance	Test lower extremity strength by manual muscle testing every 6 months	Early stages: test upper and lower extremity strength every 6 months Later stages: value of testing is less certain
Range of motion	Goniometry <sup>53</sup>	Baseline: to identify emerging muscle hypoe extensibility and joint contractures that might contribute/lead to functional deterioration or musculoskeletal or integumentary problems To identify need for additional or altered therapeutic/surgical intervention (ie, orthoses, splinting, use of standers, iliotibial band lengthening)	Lower extremities: hip, knee, ankle joints; iliotibial band; hamstrings, gastrocnemius	Lower extremities: hip, knee, ankle joints; iliotibial band; hamstrings, gastrocnemius Upper extremities: elbow, wrist, long finger flexors
Timed testing	Standardised use of timed function tests <sup>52,54</sup>	Easy and relevant measure of daily functional status; responsive to change	Timed 10 m walk, timed Gowers' manoeuvre, time to climb 4 stairs, time to rise from chair, 6-min walk test Time to put on a shirt might be relevant in late ambulatory stage	Time to put on a shirt might be relevant in early non-ambulatory stage, timed testing not applicable in late non-ambulatory stage
Activities of daily living	Assessment of impairment in daily activities in the home, school, and community settings	Highly relevant to targeted input with aids, adaptations, and access to environmental controls	Frequency of falls, step activity monitoring, self-care skills, writing, computer use Functioning in school and community settings	Self-care skills, writing, computer use, control of manual and electric wheelchair Functioning in school and community settings
Motor function scales	Assessment of motor function in specific domains to give a composite score	Allows monitoring of progression and response to therapy	Vignos lower extremity scale, North Star Ambulatory Assessment, motor function measure	Brooke upper extremity scale, Egen Klassifikation functional assessment, Hammersmith motor scales, motor function measure

Tabella 3: Tabella riassuntiva dei metodi e degli scopi della valutazione motoria nel paziente con distrofinopatia. Tratta da "Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management"<sup>(20)</sup>

Questo breve excursus ha avuto lo scopo di evidenziare quanto il decorso delle distrofie sia complesso ed articolato e quanto profonde possano essere le ripercussioni sulla vita del paziente e della sua famiglia.

E' indispensabile pertanto che l'approccio e la presa in carico del paziente distrofico siano di tipo multidisciplinare e prevedano il monitoraggio e la prevenzione delle complicanze legate alla storia naturale della DMD (Figura 3) ma anche la presa in carico degli aspetti emotivi e sociali del paziente e del nucleo familiare di appartenenza.

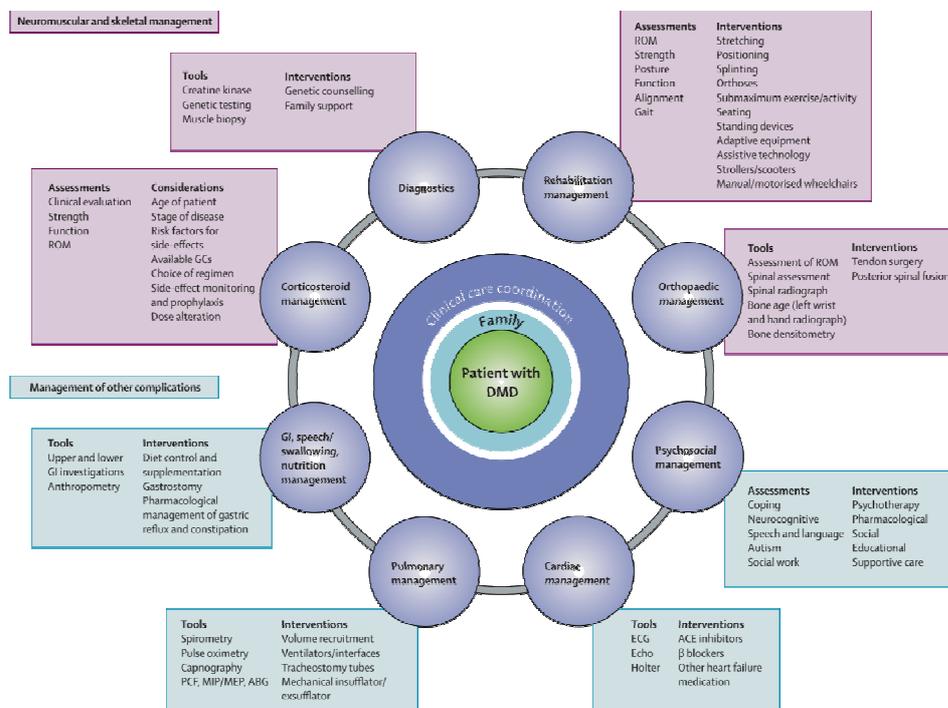


Figura 3: Rappresentazione schematica della *Coordination of clinical care* nella gestione della DMD. Tratta da [www.thelancet.com/neurology](http://www.thelancet.com/neurology), Published online November 30, 2009 " (20).

## **Capitolo 2**

### **2. Picco di massa ossea**

L'acquisizione della massa ossea inizia durante la vita fetale e raggiunge il suo picco intorno alla fine del secondo decennio di vita, ossia quando la crescita scheletrica si è completata. Durante la fase di crescita il tessuto osseo è sottoposto ad un processo di formazione e rimodellamento, che determina modificazioni strutturali sia in termini di spessore che di lunghezza <sup>(45)</sup>. L'accumulo della massa ossea avviene seguendo una curva che mostra un progressivo incremento nell'età evolutiva, infatti, tra gli 8 e i 18 anni, la massa ossea raddoppia il suo valore. Queste modificazioni interessano oltre alla densità, le dimensioni del diametro osseo, dello spessore corticale e, in misura minore, del tessuto trabecolare <sup>(46)</sup>, ma non si accompagnano a significative modificazioni della densità minerale ossea volumetrica (BMDv) <sup>(47)</sup>. La massa ossea raggiunge il suo picco dopo la pubertà, ossia quando la geometria e la microarchitettura scheletrica hanno acquisito le caratteristiche dello scheletro adulto <sup>(48)</sup>. Questo picco è definito "Picco di Massa Ossea" (PMO). Nei due sessi il PMO avviene in tempi lievemente diversi, più precocemente nelle femmine rispetto ai maschi; questi ultimi presentano infatti tempi di maturazione scheletrica più tardivi con un periodo di deposito osseo più prolungato raggiungendo un PMO del 10-15% maggiore rispetto alle femmine (Figura 4).

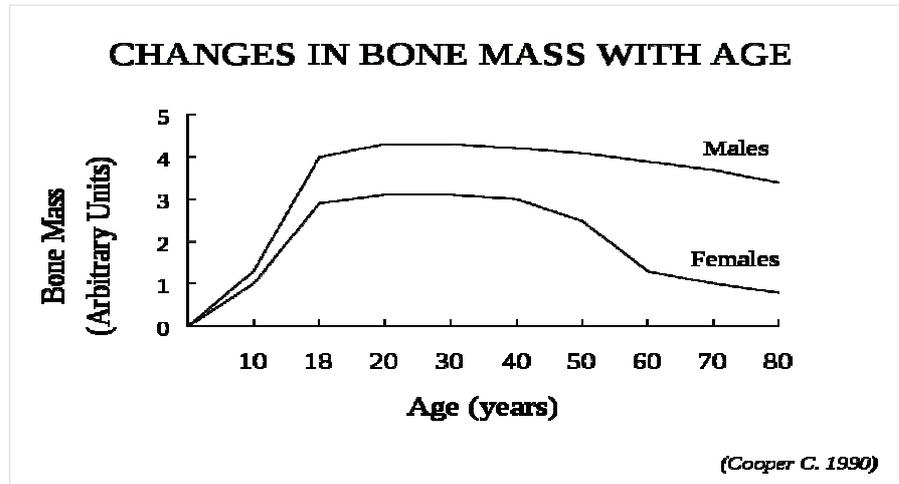


Figura 4

Rappresentazione delle variazioni della massa minerale ossea in rapporto all'età e al sesso. (da Cooper 1990)

Con l'ausilio di alcune tecniche densitometriche è stato possibile stimare l'epoca di comparsa del PMO in diverse sedi scheletriche e nei due sessi. Secondo studi effettuati con tecniche densitometriche a doppio raggio-X (DXA) l'acquisizione del PMO avverrebbe a livello delle vertebre intorno ai 16 anni nelle femmine ed intorno ai 18 anni nei maschi; a livello del collo femorale il PMO sarebbe lievemente più precoce essendo raggiunto rispettivamente ai 15 anni nelle femmine e intorno ai 16 anni nei maschi. A livello delle falangi prossimali della mano, il PMO misurato mediante tecniche ultrasonografica, viene raggiunto intorno ai 30 anni di età per entrambi i sessi. (Figura 5) <sup>(49)</sup> Queste differenze di *timing* nel raggiungimento del PMO sarebbero in parte da riferire alla diverse proporzioni tra la componente di osso corticale e di trabecolare della sede esaminata ed in parte riferibili alle caratteristiche tecniche della metodica densitometrica impiegata.

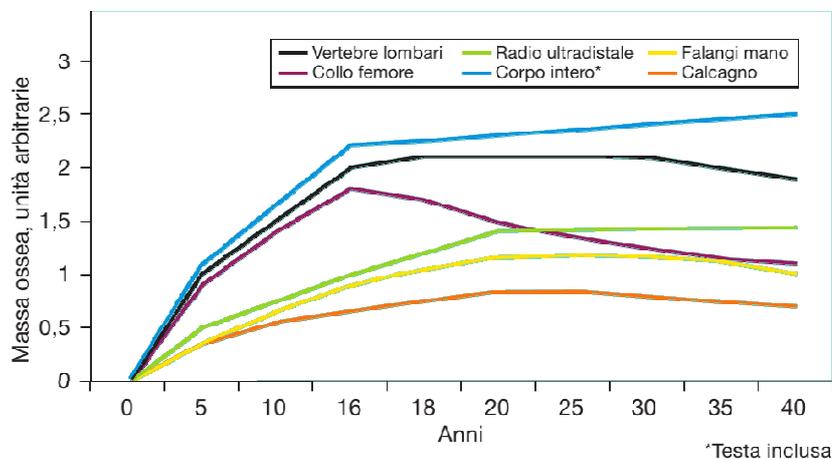


Figura 5: Accumulo e picco di massa ossea durante l'età evolutiva e l'età giovane adulta, misurata in alcune sedi corporee mediante DXA, a livello delle vertebre, del collo femorale, del radio ultradistale e del corpo intero, calcolati in  $\text{g}/\text{cm}^2$ , e mediante l'ultrasonografia quantitativa QUS a livello delle falangi prossimali della mano, parametri calcolati in AD-Sos,  $\text{m}/\text{s}$  (*Amplitude-dependent Speed of Sound*).

Successivamente alla fase di deposizione e di mineralizzazione ossea si realizza una fase in cui prevale il rimodellamento osseo che, in misura variabile nei diversi distretti scheletrici, determina una perdita di osso corticale e trasecolare con conseguente progressiva riduzione della densità ossea. Tale rimodellamento mostra un'accelerazione, nel sesso femminile dopo la menopausa e nel sesso maschile durante l'invecchiamento, predisponendo al rischio di frattura.

Il processo di accumulo della massa ossea è subordinato principalmente a fattori genetici, la cui influenza è stimata tra il 60-80%.<sup>(50)</sup>, ma risulta influenzato anche da fattori ormonali (ormoni sessuali, PTH), nutrizionali (apporto di calcio, vitamina D), ambientali o legati allo stile di vita (esposizione al sole, attività fisica, trattamenti farmacologici cronici) (Figura 6).



Figura 6: Principali fattori che influenzano l'acquisizione della massa minerale ossea

Tra i fattori ormonali gli ormoni sessuali e l'asse ormone della crescita-*insulin like growth factor-1* (GH-IGF1), contribuiscono in modo significativo al raggiungimento del PMO. In particolare l'asse GH-IGF1 favorisce il PMO sia direttamente, attraverso la stimolazione, la proliferazione e la differenziazione dei condrociti e degli osteoblasti, sia indirettamente aumentando la conversione renale di 25-idrossivitamina D (25-OH-D), in 1,25-diidrossivitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D], che a sua volta svolge un'azione favorente sulla mineralizzazione dell'osso. Tra i fattori nutrizionali contribuiscono a massimizzare il PMO l'assunzione di calcio, di vitamina D, di proteine e prodotti lattiero-caseari<sup>(47)</sup>. Anche lo stile di vita, ed in particolare l'attività fisica, sembrano influenzare il processo di acquisizione della massa ossea.

Studi dimostrano che il tipo, l'intensità, la frequenza e la durata dell'esercizio fisico <sup>(51)</sup>, esplicano un'importante azione sul modellamento e sulla densità minerale ossea tanto che la massa muscolare e la forza sono stati identificati come predittori di resistenza ossea <sup>(47)</sup>; al contrario, l'ipomobilità ha ripercussioni negative sulla struttura e sulla massa ossea. Alcuni studi osservazionali suggeriscono che gli effetti dell'attività fisica sullo scheletro possano inoltre essere sito-specifici ed età correlati, con maggiore effetto negli stadi di sviluppo prepuberali. In particolare da una meta-analisi di 22 studi clinici sugli effetti della attività fisica in bambini e adolescenti, è emerso come l'esercizio fisico abbia un effetto significativamente positivo sulla densità minerale ossea; tale efficacia sarebbe massimizzata inoltre da un adeguato apporto nutrizionale di calcio <sup>(47)</sup>. Oltre ai fattori ad azione sistemica, l'acquisizione della massa ossea sarebbe influenzata anche da fattori ad azione locale che stimolando la produzione di alcune proteine ossee tra cui l'osteocalcina, il collagene di tipo I e il *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF3), un regolatore dell'omeostasi del fosfato, favorirebbero la differenziazione degli osteoblasti. Tale meccanismo sembrerebbe verosimilmente diretto dal sistema RANK-RANKLigando-Osteoprotegerina (OPG) <sup>(47)</sup>.

### ***2.1 Condizioni patologiche che si associano ad una riduzione della densità minerale ossea in età evolutiva***

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, nel soggetto adulto si parla di osteoporosi quando i valori quantitativo densitometrici di densità minerale ossea (BMD), misurati in T-score alle vertebre o al femore, sono inferiori o uguali a -2.5 DS.

Tale definizione non è del tutto valida per la popolazione pediatrica, dove, poiché il tessuto osseo è in fase di evoluzione, la definizione di osteoporosi, esclusivamente in termini quantitativo densitometrici risulterebbe riduttiva. Secondo le indicazioni della *International Society for Clinical Densitometry*, nella popolazione pediatrica è preferibile parlare di "riduzione della densità ossea rispetto l'atteso per l'età cronologica"; che in termini densitometrici corrisponde a valori inferiori a  $-2$  Z-score. Lo Z-score rappresenta il numero di DS al di sopra o al di sotto del valore atteso in rapporto all'età cronologica<sup>(52)</sup>. Possiamo schematicamente differenziare le condizioni patologiche che in età pediatrica possono interferire con l'acquisizione della massa ossea in forme primarie, ossia legate ad un primitivo danno a carico del tessuto osseo, e forme secondarie dove il danno a carico del tessuto osseo è determinato da una patologia sottostante<sup>(53, 54)</sup> (Tabella 4).

Tabella 4: **Principali cause di riduzione della densità minerale ossea in età pediatrica**

<b>Forme primarie</b>
➤ Osteogenesi imperfetta
➤ Osteoporosi giovanile idiopatica
➤ Malattie genetiche (omocistinuria, sindrome di Marfan, sindrome di Ehlers Danlos)
<b>Forme secondarie</b>
➤ Errori congeniti del metabolismo (glicogenosi, fenilchetonuria, m di Wilson, galattosemia);
➤ terapie croniche con farmaci tra cui corticosteroidi, anticonvulsivanti, chemioterapici, analoghi del GnRH,
➤ malattie croniche reumatiche, infiammatorie, ematologiche, epato biliari, immunologiche, renali e cardiache
➤ <b>malattie che determinano immobilizzazione cronica o progressiva: paralisi cerebrali infantili e malattie neuromuscolari</b>
➤ disordini endocrini tra cui ipogonadismo, deficit GH, panipopituitarismo, sindrome di Turner, sindrome di Klinefelter
➤ Anoressia nervosa, alterazioni nutrizionali stati carenziali di calcio, diete vegetariane strette, malnutrizione o nutrizione parenterale prolungata ed ipovitaminosi D.

## **2.2 Metodiche di valutazione densitometrica della massa minerale ossea**

La misurazione densitometrica ossea nel bambino si avvale delle stesse metodiche utilizzate nell'adulto, tuttavia nell'impiego, ed in particolare, nella elaborazione dei dati è necessario utilizzare importanti accorgimenti per evitare di incorrere in diagnosi errate. Le principali metodiche impiegate per la valutazione della massa ossea sono la DXA, che si basa sull'assorbimento e sull'interazione dei fotoni incidenti emessi dalla sorgente con il tessuto osseo, l'ultrasonografia quantitativa (QUS) e la tomografia computerizzata quantitativa periferica (pQCT). Quest'ultima metodica, pur essendo molto precisa, trova scarsa applicabilità in età pediatrica a causa della mancanza di valori di riferimento sia per la popolazione normale che patologica.

La DXA è una tecnica radiografica, con bassa esposizione a radiazioni, ad elevata precisione ed accuratezza che consente la misurazione 1) del contenuto minerale osseo (BMC, *Bone Mineral Content*; espresso in g); 2) della densità minerale ossea corretta per l'area dell'osso esaminato (BMD, *Bone Mineral Density*; espressa in  $\text{g}/\text{cm}^2$ ); 3) della vBMD ossia del contenuto minerale osseo in rapporto al volume osseo stimato mediante formula matematica ed espresso in  $\text{g}/\text{cm}^3$ . Tale correzione consente di ridurre l'effetto interferente delle dimensioni ossee sulla stima dello stato minerale osseo. Inoltre consente la quantificazione del lean body mass (massa magra), espresso in g; e della fat body mass (massa grassa), espressa in g. <sup>(55)</sup>. La misurazione mediante DXA viene usualmente eseguita a livello delle vertebre lombari, del collo femorale e del corpo in toto.

Le tecniche QUS utilizzano invece onde acustiche, comprese tra 500 KHz e 1,25 MHz, sensibilmente più basse rispetto a quelle comunemente impiegate nelle indagini

ecografiche. Queste metodiche sono in grado di fornire informazioni non solo sulla densità ma anche sulla struttura e sulle proprietà meccaniche del tessuto osseo. Le metodiche differiscono tra loro per alcune caratteristiche legate alla sede scheletrica misurata (ad esempio falangi prossimali della mano, tibia, calcagno radio), alle componenti ossee esaminate, alla via primaria di trasmissione dell'onda ultrasonica all'interno del tessuto osseo e ai parametri ultrasonometrici valutati; che sono rappresentati dalla misura del grado di attenuazione (BUA, *Broadband Ultrasound Attenuation*), dalla velocità (SOS, *Speed of Sound*, AD-SoS, *Amplitude-dependent Speed of Sound*) o dal tempo di trasmissione (BTT, *Bone Transmission Time*) dell'onda ultrasonica durante l'attraversamento del tessuto osseo esaminato <sup>(56)</sup>.

In tabella 5 sono riassunte le principali caratteristiche delle varie metodiche QUS.

Sito misurazione	Regione-di-interesse	Componenti ossee	Via di trasmissione	Parametri misurati
Calcagno	Sede centrale*	Trabecolare (>90%)	Trasversale	SoS, BUA, SI/QUI
Falangi prossimali della mano	Porzione distale diafisi sotto i condili	Corticale (~60%) Trabecolare (~40%) Piccolo canale midollare	Trasversale	AD-SoS, BTT
Radio	Terzo distale	Corticale (>95%)	Assiale	SoS
Tibia	Porzione centrale diafisi	Corticale (~100%)	Assiale	SoS

Tabella 5: Sito di misurazione, regione-di-interesse (ROI), componenti ossee valutate, via principale di trasmissione e parametri misurati dagli ultrasuoni all'interno del segmento osseo esaminato e variabili misurate con le principali metodiche densitometriche a ultrasuoni in uso in età pediatrica.

Legenda: \* La sede e le dimensioni dell'area misurata variano in base al produttore e al modello utilizzato. SoS, speed of sound (velocità degli ultrasuoni); BUA, broadband ultrasound attenuation (misura del grado di attenuazione degli ultrasuoni); SI, Stiffness Index = [(0.67 x BUA) + (0.28 x SoS) - 420]; QUI, Quantitative Ultrasound Index = [0.41 x (BUA + SoS) - 571]. Tratto da. "Ultrasuonografia ossea falangea. La valutazione dello stato minerale osseo in pediatria" <sup>(57)</sup>

Le metodiche QUS sono ben tollerate, non impiegano radiazioni ionizzanti e consentono di valutare con buona precisione lo stato minerale osseo. Nel bambino e nell'adolescente

i valori dei parametri QUS sono espressi in Z-score, ossia tramite confronto del valore misurato con valori misurati in soggetti di pari età e sesso, o in centili. Le tecniche densitometriche ad ultrasuoni, in particolare l'ultrasonografia ossea falangea, si è dimostrata efficace nella valutazione dello stato minerale osseo integrale ossia nella componente trabecolare e corticale, inoltre, come dimostrato da alcuni studi, è risultata in grado di predire il rischio di frattura nei bambini e negli adolescenti <sup>(58)</sup>.

Per quanto riguarda l'interpretazione dei dati, anche per la metodica QUS valgono le indicazioni riportate in precedenza, ossia sono da considerarsi patologici valori di AD-SoS o BTT inferiori a -2 Z-score o inferiori al 3° centile <sup>(59)</sup>.

Diversi autori hanno riportato una correlazione tra QUS e DXA ( $r = 0.30 - r = 0.60$ ); in effetti, queste due tecniche forniscono risultati complementari tra loro in quanto le sedi di misurazione, le tecniche di rilevazione e la struttura ossea misurata sono differenti <sup>(60)</sup>

### **2.3 Indici biochimici del turnover osseo**

La valutazione dello stato minerale osseo, oltre alla stima della massa ossea, si avvale anche del dosaggio sierico di alcuni indici biochimici che riflettono il *turnover* osseo. Alcuni di questi indici esprimono il processo di formazione ossea mentre altri ne riflettono il processo di riassorbimento. Tra i primi gli indici biochimici più utilizzati sono rappresentati dall'osteocalcina (OC), dall'isoenzima osseo della fosfatasi alcalina e dai propeptidi del procollagene di tipo I che rappresentano le porzioni N o C terminale dei prodotti di degradazione del collagene I (rispettivamente PINP e PICP), che derivano dall'attività osteoblastica; tra i secondi ricordiamo i telopeptici sierici (ICTP) e urinari del

collagene di tipo I, le piridinoline e la deossipiridinolina, che invece derivano dall'attività degli osteoclasti.

Nel bambino e nell'adolescente l'interpretazione dei valori degli indici biochimici del turnover osseo deve tenere conto del fatto che tali parametri sono influenzati non solo dall'attività del turnover osseo ma anche dallo sviluppo scheletrico (età, stadio puberale, velocità di crescita, maturazione minerale, regolazione ormonale, stato nutrizionale). Pertanto questi indici biochimici hanno scarso valore nel singolo soggetto, data la loro estrema variabilità, anche se possono essere utili in studi che comprendono ampi gruppi di soggetti accuratamente selezionati tra loro <sup>(61)</sup> .

## Capitolo 3

### **3. Metabolismo e valutazione dello stato vitaminico D**

La vitamina D esplica un ruolo essenziale nel metabolismo osseo; per l'uomo tale fonte vitaminica è in parte di origine alimentare (vitamina D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) ed in parte di origine endogena (vitamina D<sub>3</sub>) derivante dalla conversione, a livello della cute, del 7-deidrocolesterolo a colecalciferolo attraverso l'azione dei raggi UV. Durante l'esposizione alla luce solare il 7-deidrocolesterolo contenuto nella pelle (strato Malpighiano) viene convertito in pre-vitamina D<sub>3</sub> che viene poi convertita in vitamina D<sub>3</sub>. L'eccessiva esposizione ai raggi solari determina la degradazione della previtamina D<sub>3</sub> in fotoprodotto inattivi rappresentati soprattutto dal Lumisterolo e dal Tachisterolo. La produzione endogena di vitamina D è subordinata a fattori ambientali e geografici (latitudine, altitudine, ore di esposizione, stagione) ed a fattori individuali (colore della pelle, filtri solari, superficie esposte, variabili genetiche).

La vitamina D che deriva da fonti alimentari nell'intestino viene incorporata all'interno dei chilomicroni e quindi trasportata dal sistema linfatico nella circolazione venosa; è inoltre possibile un deposito vitaminico all'interno degli adipociti.

La vitamina D, sia di origine endogena che esogena, è trasportata nel circolo ematico legata ad una proteina la DBP, *Vitamin D Binding Protein*, che giunta nel fegato subisce un processo di idrossilazione in posizione C-25 formando la 25-OH-D. Tale metabolita è considerato il migliore indicatore dello stato vitaminico D di un individuo. Successivamente, a livello dei reni, la 25-OH-D subisce un secondo processo di idrossilazione in posizione C-1 con la formazione del metabolita più attivo della vitamina

D, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Le sue concentrazioni non riflettono il reale stato vitaminico D di un individuo poiché tale metabolita è regolato, tramite un meccanismo di *feedback*, dalle concentrazioni dell'ormone paratiroideo (PTH), dalle concentrazioni di calcio e di fosforo e del FGF23. Infine la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  viene degradata dalla 25-idrossivitamina D-24-idrossilasi (24-OHase) e escreta con le urine (Figura 7).

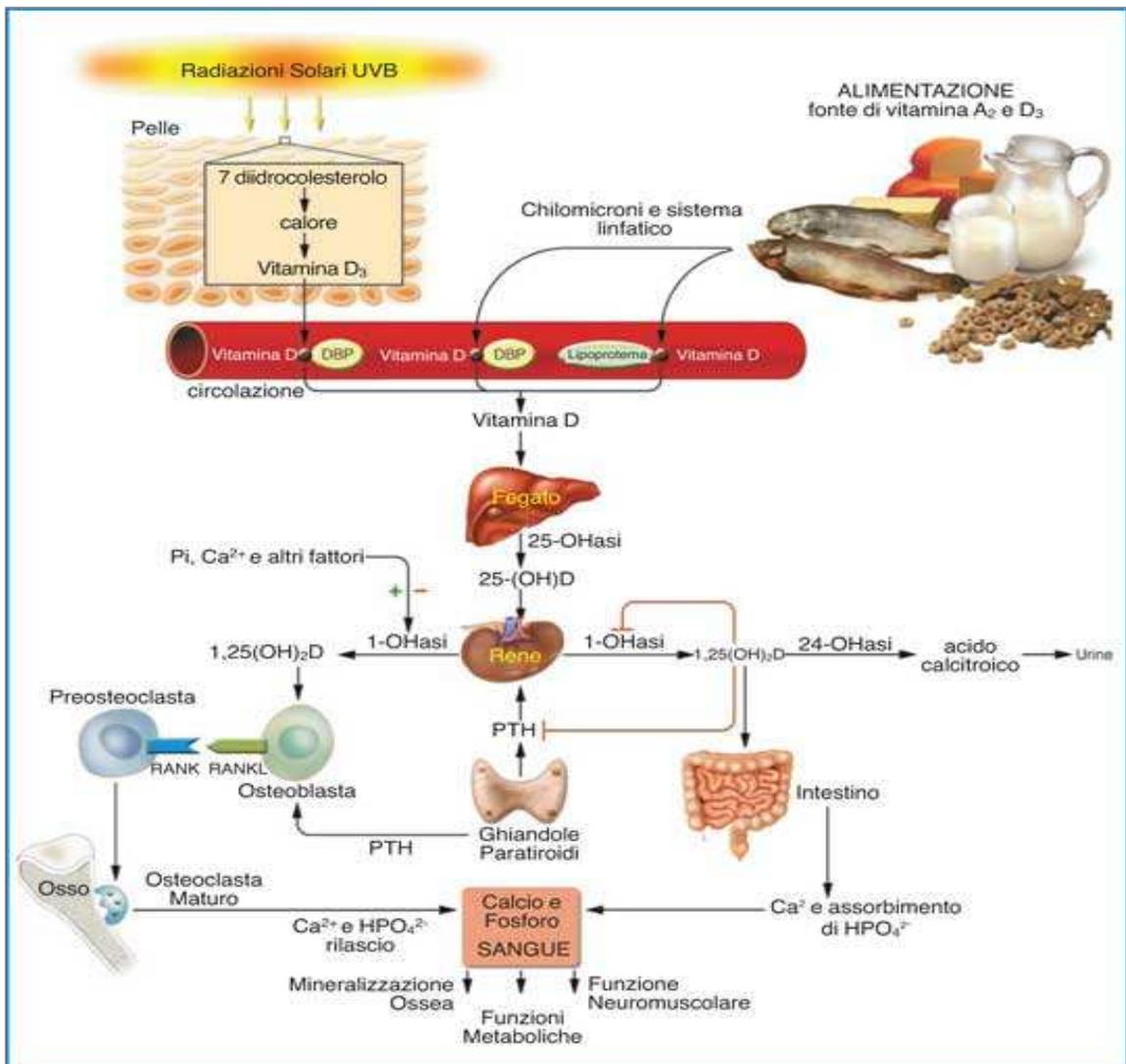


Figura 7. Rappresentazione schematica della fotoproduzione e del metabolismo della vitamina D e dei vari effetti biologici del metabolita attivo  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  sul metabolismo del calcio, del fosforo e dell'osso. (Mod. da: Holick MF. J Clin Invest., 2006<sup>(62)</sup>).

L'1,25(OH)<sub>2</sub>D svolge le sue funzioni biologiche mediante l'interazione con specifici recettori VDR, *Vitamin D Receptor* stimolando direttamente l'assorbimento intestinale del calcio, il riassorbimento osseo del calcio e del fosforo, in associazione con il PTH, e l'eliminazione urinaria del calcio e del fosforo. L'1,25(OH)<sub>2</sub>D interviene inoltre nella regolazione del rimodellamento osseo tramite l'interazione RANK-RANKL<sup>(62, 63)</sup>.

Secondo le indicazioni dell'Accademia Americana di Pediatria (AAP), confermate anche dalla *Drug and Therapeutics Committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society*<sup>(64)</sup>, nel lattante, nel bambino e nell'adolescente le concentrazioni "desiderabili" di 25-OH-D dovrebbero raggiungere valori  $\geq 20$  ng/ml con range massimo fino a 100 ng/ml. Valori inferiori a 20 ng/ml sono da considerarsi insufficienti, e valori inferiori o uguali a 10 ng/ml sono ritenuti francamente deficitari (Figura 8).

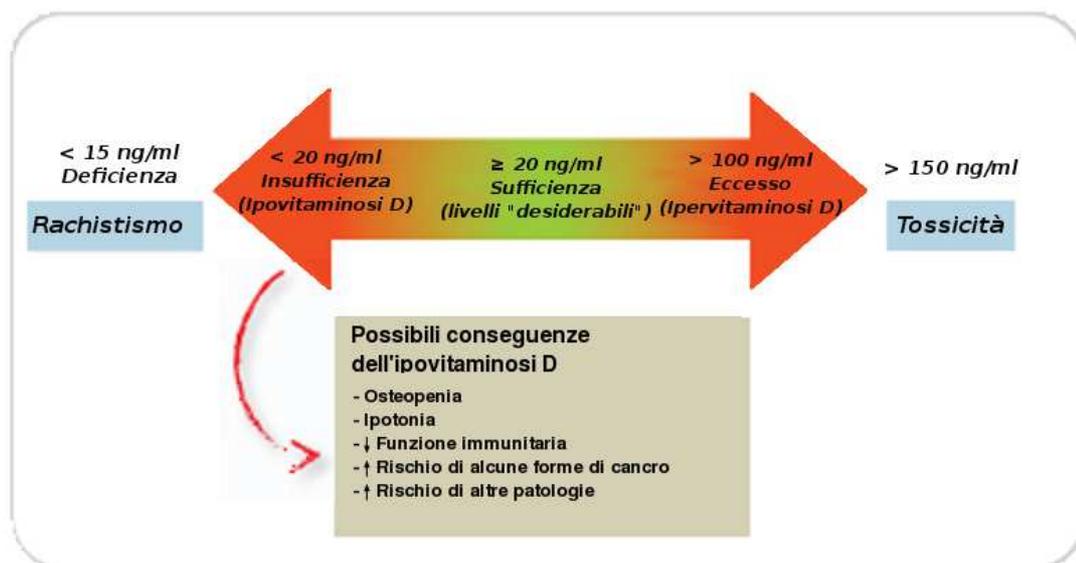


Figura 8: Variazione dello stato vitaminico D in base alla concentrazione ematica di 25-OH-D durante l'età evolutiva e possibili conseguenze dell'ipovitaminosi D. I valori normali di 25-OH-D sono compresi tra 20-100 ng/ml. Valori superiori a 150 ng/ml possono associarsi a ipercalcemia. Valori inferiori a 20 ng/ml sono indicativi di una condizione di insufficienza (o ipovitaminosi D). Valori inferiori a 15 ng/ml possono associarsi sia a forme lievi che a forme gravi di rachitismo.

Le fonti naturali di approvvigionamento della vitamina D non sono sempre sufficienti a garantirne il fabbisogno individuale, tranne nel caso della assunzione di alimenti fortificati con vitamina D.

Le principali cause di ipovitaminosi D sono:

- allattamento esclusivo al seno o con formule latte con contenuto di vitamina D inferiore a 400 UI/die,
- scarsa esposizione ai raggi solari, cute eccessivamente coperta da indumenti o elevata pigmentazione della cute,
- vivere ad elevate latitudine (> 40° nel periodo invernale)
- concomitante presenza di malattie croniche a carico di organi deputati all'assorbimento intestinale (digiuno e duodeno) o alla metabolizzazione (fegato, rene) della vitamina D,
- trattamento cronico con farmaci come il fenobarbital, la dintoina, la rifampicina, l'isoniazide, i corticosteroidi, ed i farmaci antiretrovirali.
- obesità per riduzione della biodisponibilità

L'ipovitaminosi D determina una riduzione delle concentrazioni di calcio e di fosforo con secondaria secrezione di PTH che, tramite la mobilizzazione di calcio dal tessuto osseo, con normalizzazione dei valori di calcio e fosforo. L'aumentata secrezione del PTH aumenta l'attività osteoclastica con riduzione della densità minerale ossea <sup>(65)</sup>. Inoltre sembra che ridotti livelli di vitamina D determinino debolezza e riduzione del tono muscolare <sup>(66)</sup>.

Esistono diverse Linee Guida per la prevenzione dell'ipovitaminosi D. L'APP raccomanda una dose giornaliera di 400 UI/die di vitamina D per tutte le fasce di età pediatrica <sup>(64)</sup>.

*"Le distrofinopatie nell'età evolutiva: valutazione clinica, omeostasi fosfo-calcica, turnover e stato minerale osseo"*

L'Istituto di Medicina degli Stati Uniti raccomanda una dose giornaliera di 400 UI/die nel primo anno di vita, e negli anni successivi una dose di 600 UI/die (<http://www.nap.edu>), infine, Pornpoj Pramy e Holick raccomandano valori di supplementazione più elevati, fino a 1000 UI/die per mantenere valori medi di 30 ng/ml <sup>(67)</sup>.

## **Capitolo 4**

### **4. Stato minerale osseo nella DMD**

Nel corso della storia naturale della DMD anche il tessuto osseo può essere coinvolto; i pazienti affetti mostrano infatti una progressiva riduzione della massa minerale ossea sia a livello vertebrale che femorale, che diventa più evidente con l'aumentare dell'età e dopo la perdita del cammino. La riduzione della densità minerale ossea predispone inoltre al rischio di frattura <sup>(68)</sup>. Le probabili cause del progressivo depauperamento osseo sono state finora prevalentemente attribuite alla riduzione progressiva della mobilità muscolare e all'impiego dei corticosteroidi. In particolare, la precoce riduzione della densità minerale ossea a livello degli arti inferiori potrebbe essere attribuita alla progressiva riduzione della stenia e della mobilità muscolare che determinerebbe una insufficiente stimolazione sito specifica sull'osso <sup>(47)</sup>. L'impiego dei corticosteroidi, invece, sembrerebbe correlare direttamente con la riduzione della massa minerale ossea soprattutto a livello delle vertebre lombari in cui è riportato anche un aumento dell'incidenza delle fratture <sup>(69)</sup>. Tuttavia gli studi sul coinvolgimento osseo nella DMD appaiono scarsi ed i meccanismi etiopatogenetici alla base di tale processo non sembrano sufficientemente esaustivi. L'interpretazione della riduzione della massa minerale ossea, come effetto secondario della terapia con steroidi e/o della ipomobilità da deficit stenico, non trova infatti riscontro in lavori che evidenziano come una riduzione della massa minerale ossea, soprattutto a carico degli arti inferiori, sia presente anche in soggetti che non assumono steroidi e che mantengono la capacità di deambulazione <sup>(70, 71)</sup>. In uno studio di Bianchi et al. <sup>(72)</sup>, nel quale sono stati esaminati 32 ragazzi

deambulanti affetti da DMD, 22 dei quali in trattamento quotidiano con prednisolone e 10 non in terapia, tutti i pazienti hanno mostrato parametri di densità minerale ossea più bassa rispetto ai valori normali; tuttavia la riduzione appare più evidente nel gruppo di pazienti trattati con corticosteroidi rispetto ai pazienti non trattati. I risultati hanno inoltre evidenziato una correlazione negativa tra dose cumulativa di corticosteroidi e densità minerale ossea vertebrale ed una correlazione lineare tra forza muscolare e densità minerale ossea.

In un altro lavoro sono stati valutati i parametri densitometrici e volumetrici ossei in un campione di bambini DMD a confronto con controlli sani (non trattati). Le misurazioni sono state effettuate prima dell'avvio del trattamento con corticosteroidi (T0) e dopo 30 mesi di trattamento continuativo con corticosteroidi (T1). Gli autori hanno evidenziato tra i due gruppi, ancor prima dell'avvio del trattamento con corticosteroidi, differenze di volume e di contenuto minerale osseo. In particolare già a T0 segnalavano nel gruppo DMD, rispetto ai controlli, una riduzione della BMD a livello delle ossa lunghe e a livello vertebrale, le dimensioni volumetriche erano invece nella norma a livello delle vertebre e ridotte a livello femorale. Dopo 30 mesi dall'inizio del trattamento con corticosteroidi (T1) gli autori hanno rilevato nei pazienti DMD un lieve aumento della densità minerale ossea a livello vertebrale, che tuttavia rimaneva ridotta rispetto ai controlli, ed un volume vertebrale invariato rispetto a T0. A livello delle ossa lunghe invece, dopo l'avvio della terapia (T1), si evidenzia una ulteriore riduzione della BMD associata a variazione dei parametri volumetrici (aumento del diametro osseo e assottigliamento della corticale). Quindi anche da questo studio emerge come, ancor prima del trattamento con corticosteroidi, l'osso del paziente distrofico presenti, rispetto ai controlli sani, differenze densitometriche e volumetriche, potenziate poi dall'uso dei corticosteroidi e dalla ipomobilità progressiva <sup>(73)</sup>. [figura disponibile presso [www.jpeds.co](http://www.jpeds.co)].

In accordo con la riduzione dello stato minerale osseo nei soggetti con DMD, rispetto alla popolazione generale, si rileva una più elevata incidenza di fratture <sup>(74, 75)</sup>. Le fratture agli arti rappresentano una importante complicanza secondaria poiché l'immobilità da frattura si accompagna frequentemente, per difficoltà nel recupero completo, ad una perdita funzionale motoria <sup>(70)</sup>. Inoltre nei pazienti DMD in terapia cronica con corticosteroidi l'incidenza delle fratture vertebrali risulta maggiore rispetto alla popolazione generale; tali fratture possono essere asintomatiche e pertanto andrebbero scrupolosamente ricercate attraverso uno studio radiografico mirato in tutti i soggetti che effettuano trattamento steroideo da lungo tempo.

La possibilità di un coinvolgimento osseo anche nella distrofia muscolare di Becker è riportata in letteratura in un solo studio comparativo e longitudinale condotto su una popolazione pediatrica di pazienti Becker vs pazienti Duchenne. Nel corso del periodo di osservazione longitudinale gli autori hanno rilevato, anche nel gruppo di paziente DMB, una riduzione della densità minerale ossea a livello femorale <sup>(76)</sup>.

Le conoscenze attuali non consentono al momento di trarre conclusioni sui fattori causali; dell'interessamento osseo nella DMD, infatti se da un lato l'ipomobilità non appare sufficiente a spiegare la precoce riduzione della mineralizzazione ossea nei soggetti deambulanti, dall'altro neanche il solo impiego dei corticosteroidi può chiarire l'interessamento osseo. Probabilmente entrambi questi fattori contribuiscono ad aggravare una situazione già presente.

Nel tentativo di interpretare il substrato patogenetico dell'interessamento osseo nella DMD, di recente sono stati effettuati interessanti studi biochimici e densitometrici anche su modello animale (topi mdx). In particolare uno studio densitometrico osseo effettuato su topo mdx in terza settimana di vita, ossia quando non è ancora presente una significativa evidenza clinica della malattia, ha mostrato un contenuto ed una densità

minerale ossea ridotta nei topi mdx rispetto ai controlli sani. Inoltre l'analisi biomeccanica dell'osso ha evidenziato nei topi mdx strutture ossee meno resistenti e robuste e pertanto più sensibili alle fratture. Gli autori hanno pertanto ipotizzato che alla base della fragilità ossea del topo mdx possa esserci un difetto di mineralizzazione e di organizzazione delle molecole della matrice extracellulare, ed in particolare del collagene e dei proteoglicani, fattori di crescita ed interleuchine<sup>(77)</sup>.

A supporto di tale ipotesi si segnala un originale lavoro di Rufo et al.<sup>(78)</sup>, in cui gli autori hanno effettuato una analisi densitometrica e biochimica comparata nel topo mdx e nei soggetti DMD prima dell'avvio della terapia steroidea. La valutazione biochimica prevedeva la misurazione di indici biochimici su siero, tra cui citochine e fattori di crescita. Gli autori hanno riscontrato in entrambi i gruppi malati, topi mdx e soggetti DMD, elevati valori di IL-6, una citochina infiammatoria già nota per la sua attività osteoclastica<sup>(78)</sup>, ipotizzando che l'azione di tale marker possa contribuire sensibilmente alla perdita ossea attraverso un disaccoppiamento tra l'attività osteoblastica ed osteoclastica.

#### **4.1 Attuali indicazioni per il monitoraggio dell'osso nei pazienti DMD in trattamento con corticosteroidi.**

Durante i numerosi workshops sulla salute delle ossa nella DMD <sup>(76, 79)</sup> sono state redatte indicazioni per la prevenzione ed il monitoraggio del benessere dell'osso e per il trattamento dell'osteoporosi nel paziente con distrofia muscolare di Duchenne in trattamento con corticosteroidi.

Le indicazioni consigliano di effettuare dal momento della diagnosi una valutazione dello stato osseo attraverso la raccolta anamnestica della eventuale storia di fratture e mediante un bilancio nutrizionale con particolare attenzione all'introito di Calcio e di Vitamina D. E' consigliato il dosaggio dello stato vitaminico D a partire dalla diagnosi ogni 1-2 anni e si suggerisce un trattamento supplementare con vitamina D qualora il valore sierico di 25-OH-D fosse inferiore a 20 ng/ml. Le raccomandazioni generali includono inoltre la promozione di attività fisica adeguata alle possibilità motorie del paziente, il mantenimento di un appropriato regime alimentare e l'esposizione solare.

All'avvio del trattamento con corticosteroidi, oltre alle indicazioni precedentemente fornite, sono consigliate: valutazione densitometrica ossea (DXA), da ripetere ogni 12-24 mesi, studio radiografico della colonna, ed in età prepuberale studio radiografico della mano sinistra per età ossea e monitoraggio dello sviluppo puberale. Inoltre se nel *follow up* i parametri densitometrici risultassero  $<-2$  Z-score, anche in assenza di dolore al rachide, è consigliato uno studio radiografico della colonna per l'esclusione della presenza di microfratture ossee ed una consulenza specialistica endocrinologica per eventuale trattamento con bifosfonati <sup>(80)</sup> (Figura 9).

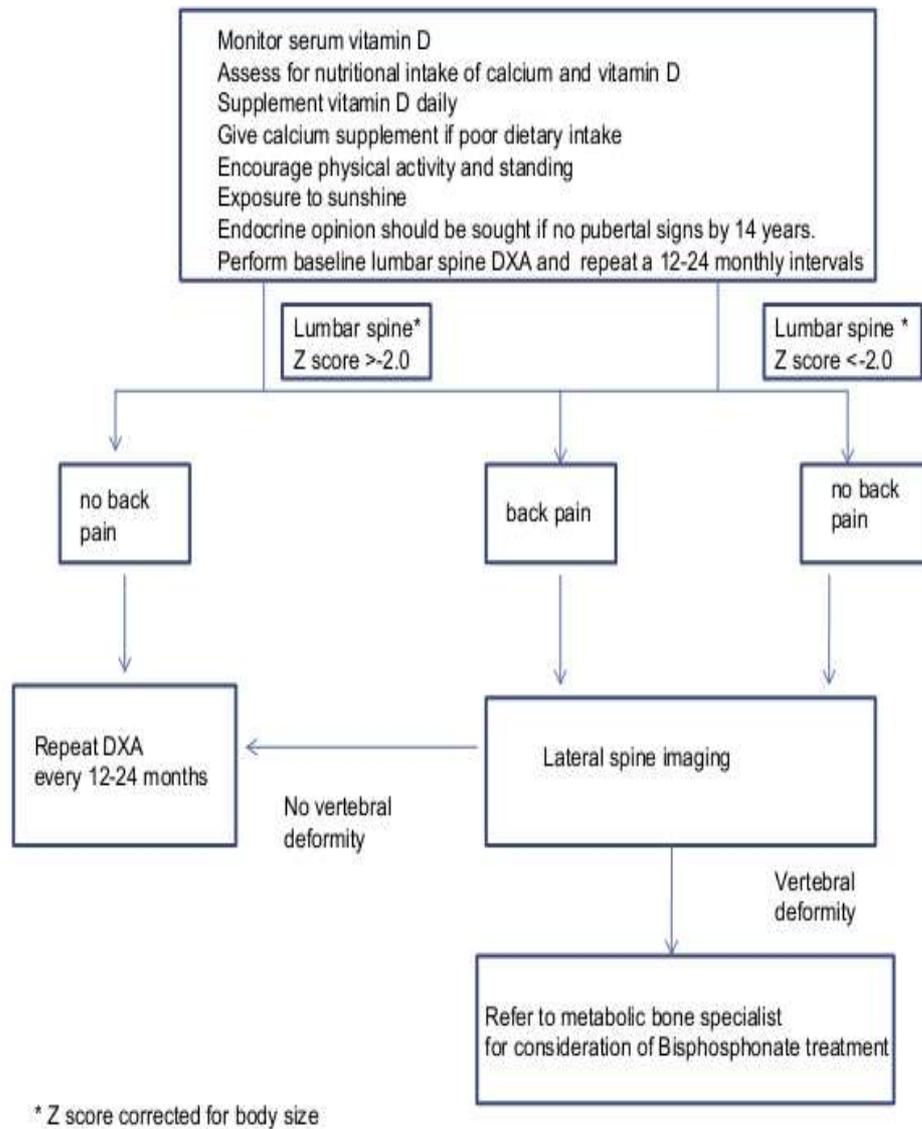


Figura 9: Indicazioni per la protezione e la cura del tessuto osseo nei bambini con DMD in trattamento con corticosteroidi. Tratto da "ENMC International Workshop: Bone protection for corticosteroid treated Duchenne muscular dystrophy"<sup>(80)</sup>.

## Capitolo 5

### 5. Scopi dello studio

Lo studio in oggetto si propone di:

- ✦ valutare lo stato minerale osseo mediante l'impiego di tecniche densitometriche in un gruppo di pazienti affetti da distrofinopatia (DMB/DMD);
- ✦ valutare l'omeostasi fosfo-calcica, lo stato vitaminico D e il *turnover* osseo in un gruppo di pazienti affetti da distrofinopatia (DMB/DMD);
- ✦ correlare lo stato minerale osseo con i risultati ottenuti dalla valutazione motoria effettuata nel gruppo di pazienti distrofinopatici;
- ✦ comparare i risultati ottenuti nei pazienti DMD in trattamento con corticosteroidi vs i pazienti DMB non trattati;
- ✦ comparare i dati biochimici con quelli densitometrici;
- ✦ fornire indicazioni per l'individuazione precoce di un possibile danno osseo e per la sua prevenzione.

## **Capitolo 6**

### **6. Pazienti**

Lo studio è stato condotto presso l'IRCCS "Stella Maris" di Pisa in collaborazione con U.O. Pediatria I dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana.

I dati sono stati raccolti tra il mese di Novembre 2011 ed il mese di Giugno 2012; pertanto tra la stagione invernale e primaverile.

Il campione in studio era costituito da 17 bambini affetti da Distrofia Muscolare di Becker (DMB) o da Distrofia Muscolare Duchenne (DMD) geneticamente confermata; l'età media del campione era di  $10 \pm 3,9$  anni.

La descrizione analitica del campione è riportata in Tabella 6.

Il pazienti del campione oggetto di studio sono regolarmente seguito presso l'IRCCS "Stella Maris" dove effettuano valutazioni cliniche e funzionali periodiche in equipe multidisciplinare, che comprendono valutazioni fisiatriche, monitoraggio cardiologico e respiratorio, valutazioni neuropsicologiche ed emotivo-comportamentali.

"Le distrofinopatie nell'età evolutiva: valutazione clinica, omeostasi fosfo-calcica, turnover e stato minerale osseo"

	Diagnosi	Età'	Statura (Z-score)	Peso (Z-score)	BMI (Z-score)	D/nD	T/nT	Δcortene/ deflan	posologia	durata terapia (mesi)	cortisone lifetime (mg)	fratture
Pz 1	DMB	7,5	2,8	1	-0,3	D	nT	-	-	-	-	-
Pz 2	DMB	7,5	1,6	-1	-4	D	nT	-	-	-	-	-
Pz 3	DMB	16,1	1,5	0,7	-1,2	D	nT	-	-	-	-	-
Pz 4	DMB	12,7	-1,1	-1,4	-1,6	D	nT	-	-	-	-	-
Pz 5	DMB	8,3	1,1	-0,4	0,4	D	nT	-	-	-	-	-
Pz 6	DMB	16,7	-0,5	0	1,8	D	T	Δcortene	die	41	37125	-
Pz 7	DMB	7,3	1,3	2	0,2	D	nT	-	-	-	-	-
Pz 8	DMD	15,8	-0,43	1,22	1,6	nD	nT	(Δcortene*)	(die*)	(5*)	(3750*)	1
Pz 9	DMD	12,6	-2,2	0,38	1,7	D	T	Δcortene	die	66	44220	-
Pz 10	DMD	12,6	-2,35	1,09	2,46	D	T	deflan	20 on/10 off	41,5	39330	2
Pz 11	DMD	10,7	-0,09	0,84	1,19	D	T	Δcortene	die	63	33273	-
Pz 12	DMD	10,8	-0,48	-1,03	-1,09	D	T	Δcortene	20 on/10 off	38,5	14437	-
Pz 13	DMD	4,1	0,7	-0,14	-0,81	D	nT	-	-	-	-	-
Pz 14	DMD	6,3	-1,27	-1,02	-0,23	D	T	deflan	die	7	3150	-
Pz 15	DMD	9,9	-0,54	-0,88	-0,82	D	T	deflan	die	60	27798	-
Pz 16	DMD	4,7	-1,47	-2,32	-1,52	D	nT	-	-	-	-	-
Pz 17	DMD	6,7	0,33	-0,35	-0,23	D	T	deflan	alternato	7,5	4050	-

Tabella 6: Caratteristiche principali del campione oggetto di studio.

D: deambulante; nD: non deambulante; T: trattato con corticosteroidi; nT: non trattato con corticosteroidi. Δcortene: deltacortene.

(\*): il paziente aveva effettuato in precedenza terapia con corticosteroidi, ma al momento dello studio era nT (per dettagli vedi il testo).

*"Le distrofinopatie nell'età evolutiva: valutazione clinica, omeostasi fosfo-calcica, turnover e stato minerale osseo"*

Diagnosi	Numero pazienti	Età'	Statura (Z-score)	Peso (Z-score)	BMI (Z-score)	Deambulanti	Pz trattati con corticosteroidi (n)	durata terapia (mesi)	cortisone lifetime (mg)	fratture
DMB	7	10,9±4,2	0,9±1,3	0,1 ± 1,2	-0,7 ± 1,8	7	1	41	37.125	-
DMD	10	9,4±3,8	-0,8±1	-0,2 ± 1,1	0,2 ± 1,4	9	7	36 ±26,3	21.251 ± 16.979	
DMB+DMD	17	10 ±3,9	-0,1±1,4	-0,1 ± 1,1	-0,1± 1,6	16	8	36,6±24,6	23.014 ± 16.740	3

Tabella 7: Valori medi e di DS delle principali caratteristiche dei pazienti DMB, dei pazienti DMD e del campione oggetto di studio.

I pazienti dal numero 1 al numero 7 (Tabella 6) erano affetti da DMB. L'età media dei pazienti DMB era di  $10,9 \pm 4,2$  anni (Tabella 7), i pazienti erano tutti deambulanti e non presentano significative limitazioni funzionali motorie. Nessun paziente assumeva terapia con corticosteroidi, ad eccezione del paziente n°6 che, per la presenza di frequenti cadute e perdita progressiva di forza al cingolo pelvico, effettuava da 41 mesi terapia con deltacortene, con dose cumulativa pari a 37.125 mg. I pazienti n° 6 e n° 7, per la presenza di ipertrofia ventricolare, assumevano terapia cronica con ACE-inibitore. I parametri auxologici dei pazienti affetti da DMB erano tutti nei limiti della norma, i pazienti n° 3 e n°6 erano puberi (Tabella 6). In nessun paziente erano riferite pregresse fratture.

I pazienti dal numero 8 al 17 erano affetti da DMD, per un totale di 10 soggetti DMD (Tabella 6). L'età media dei pazienti era di  $9,4 \pm 3,8$  anni (Tabella 7). Tutti i pazienti DMD erano deambulanti (D) ad eccezione del paziente n° 8 che ha perso la capacità di deambulazione all'età di 11 anni. Sette pazienti erano in trattamento con corticosteroidi, quattro dei quali con Deflan (0.9 mg/Kg) ed i restanti tre con Prednisolone (0.75 mg/Kg). Due dei quattro pazienti in trattamento con Deflan seguivano uno schema giornaliero, i restanti due (pz nn° 10, 17; Tabella 6) uno schema non continuativo, uno a giorni alterni, mentre l'altro 20 on/10 off; lo schema non continuativo era stato consigliato nel primo caso per la recente introduzione del trattamento farmacologico (pz. n° 17; Tabella 6), nel secondo caso per controllare meglio l'eccessivo incremento ponderale, in bambino già sovrappeso (pz n° 10, Tabella 6). Dei tre pazienti in trattamento con Prednisolone, due seguivano uno schema continuativo, mentre uno (pz. n° 12; Tabella 6) seguiva uno schema 20 on/10 off, per la comparsa di irritabilità e disturbi del sonno durante il trattamento quotidiano; il paziente presentava inoltre in comorbidità un disturbo dello spettro autistico. Il trattamento cortisonico, ad eccezione di un paziente (n° 8; Tabella 6), era stato iniziato tra i 5 ed i 6 anni. I tre pazienti senza trattamento (pz. n° 8, 13, 16;

Tabella 6) erano costituiti da due bambini in età inferiore a 5 anni, quindi ancora in attesa di inizio trattamento, e da un paziente di 15,8 anni non deambulante dall'età di 11, per il quale i genitori avevano deciso liberamente la sospensione del trattamento precedentemente utilizzato (pz n° 8; Tabella 6).

La durata media del trattamento con corticosteroidi nei DMD era di  $36 \pm 26,3$  mesi, per una dose cumulativa media di corticosteroidi, dall'inizio del trattamento, pari a  $21.251 \pm 16.979,2$  mg (Tabella 7). I pazienti DMD non assumevano altri farmaci in cronico.

I parametri auxologici erano nei limiti della norma in tutti i pazienti ad eccezione di due pazienti che presentano una statura  $<-2$  Z-score (pz. n° 9, 10; Tabella 6) ; uno di questi (pz. n° 10; Tabella 6) aveva un BMI  $>2$  Z-score. Tutti i pazienti affetti da DMD erano prepuberi, ad eccezione del paziente n° 8.

Tra i dati anamnestici dei pazienti DMD, si segnalavano tre episodi di frattura in due dei dieci pazienti DMD (pz. n° 8, 10; Tabella 6).

I due gruppi, DMB e DMD, non differivano significativamente per età ( $p= ns$ ).

## **Capitolo 7**

### **7. Metodi**

#### **7.1 Le tecniche densitometriche**

La valutazione dello stato minerale osseo è stata effettuata mediante l'impiego di due tecniche densitometriche.

#### **7.2 QUS**

Il dispositivo utilizzato per la valutazione dello stato minerale osseo mediante QUS falangea (DBM Sonic, IGEA, Carpi, Modena) si basa sull'analisi della trasmissione degli ultrasuoni attraverso la porzione distale della diafisi della falange prossimale, in prossimità dei condili (regione-di-interesse, ROI) delle ultime quattro dita della mano (II-V). I condili della diafisi sono una sede di repere adeguata per ridurre l'eventuale errore da riposizionamento durante le misurazioni longitudinali <sup>(60, 81)</sup>. L'estremità distale della diafisi della falange prossimale (a livello della ROI) contiene sia osso corticale (circa il 60%) che trabecolare, ed un piccolo canale midollare <sup>(58)</sup>.

Due trasduttori (uno emittente ed uno ricevente) del diametro di 12 mm vengono posizionati sulla superficie laterale e mediale di ogni dito da esaminare. La superficie mediale e laterale della falange a livello della ROI è approssimativamente parallela, riducendo così la dispersione dell'onda ultrasonica <sup>(82)</sup>. (Figura 10/A) <sup>(58)</sup>. Il contatto delle due sonde alla cute viene acquisito mediante l'uso di gel ecografico standard. Lo strumento calcola la velocità del segnale ultrasonico attraverso la falange misurando la

larghezza del dito, inclusi i tessuti molli, e dividendola per il tempo che l'ultrasuono impiega a percorrerla, definito in base al tempo che il segnale emesso impiega ad essere ricevuto e a raggiungere per la prima volta un valore di ampiezza minima prefissata pari a 2 mV. Questo parametro è definito come la velocità dell'ultrasuono ampiezza dipendente (AD-SoS, m/s) (Figura 10/B)<sup>(58)</sup>. Lo strumento fornisce inoltre un secondo parametro, definito come "tempo di trasmissione attraverso l'osso" o *Bone Transmission Time (BTT)*, espresso in  $\mu$ s. Tale valore indica la differenza tra il tempo in cui il primo picco del segnale ricevuto raggiunge il suo massimo ed il tempo che verrebbe misurato se tra i trasduttori fosse presente soltanto tessuto molle, in assenza di tessuto osseo (Figura 10/B)<sup>(58, 81)</sup>. La velocità con cui gli ultrasuoni attraversano i tessuti molli viene misurata durante ogni sessione, prima della misurazione a livello delle falangi nell'area compresa tra la base del pollice e la base del dito indice. Il risultato finale è la misura media di AD-SoS e BTT calcolata su quattro dita della mano<sup>(81)</sup>.

Il coefficiente di variazione [ $CV = (DS/media) \times 100$ ], in vivo, è risultato pari a 0.83% per l'AD-SoS e a 1.47% per il BTT<sup>(81)</sup>. L'esame è stato effettuato, come usualmente suggerito<sup>(81)</sup> a livello delle falangi prossimali delle ultime quattro dita della mano non dominate. L'esame è stato condotto in tutti i pazienti del campione in studio.

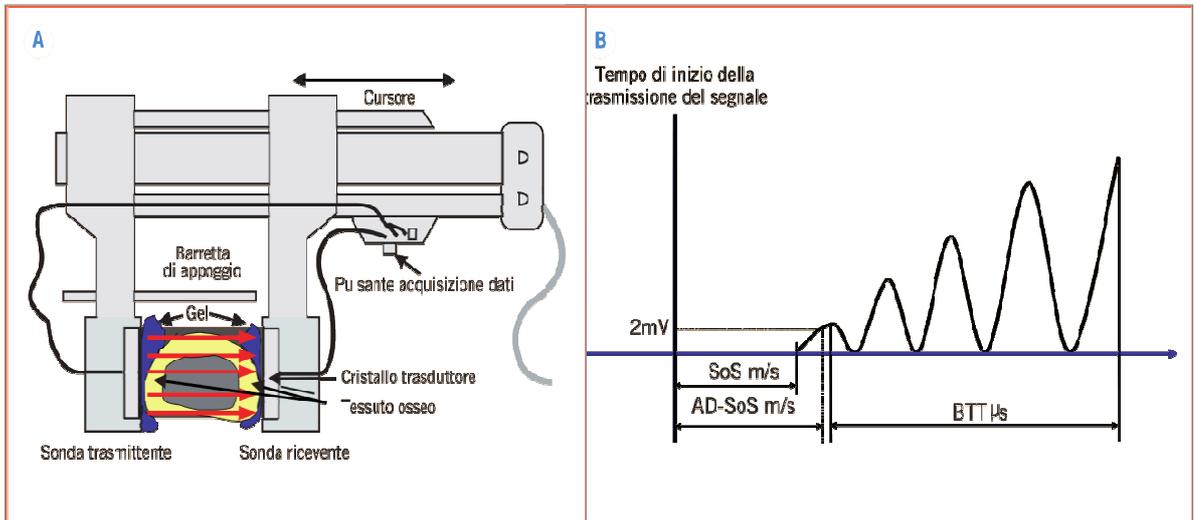


Figura 10. A. Rappresentazione schematica della metodica ultrasuonografica falangea (DBM Sonic, IGEA). B: modalità di calcolo dei parametri ultrasonometrici (B). La SoS (speed of sound, velocità dell'ultrasuono) è calcolata come rapporto tra la distanza percorsa dall'impulso (distanza tra la sonda trasmittente e la sonda ricevente) e il tempo necessario per coprire tale distanza. La AD-SoS (amplitude-dependent speed of sound, velocità dell'ultrasuono ampiezza dipendente) è calcolata nello stesso modo della SoS ma la misurazione inizia dal primo impulso che ha una ampiezza di almeno 2 mV. Il BTT (bone transmission time, tempo di trasmissione del segnale all'interno del tessuto osseo) rappresenta l'intervallo di tempo tra il primo picco del segnale ricevuto, che raggiunge il suo massimo livello, e il tempo misurato fino a quando il segnale non incontra il tessuto molle (sottocute e cute).

### **7.3 DXA**

La valutazione della densità minerale ossea è stata acquisita a livello delle vertebre lombari (L2-L4), del collo del femore e del corpo in toto (TB) mediante macchinario DXA con raggio postero-anteriore (Lunar-GE, Prodigy, Madison, WI, USA).

La BMD, espressa in g/cm<sup>2</sup>, viene calcolata in base al rapporto tra contenuto minerale osseo (BMC) e area stimata (BA) del segmento osseo misurato <sup>(83)</sup>.

$$\text{BMC/BA} = \text{BMDa o semplicemente BMD}$$

I valori di BMDa si riferiscono ad una misura integrale tra osso corticale e trabecolare.

I valori di BMD volumetrica lombare (L-BMDv), espressi in g/cm<sup>3</sup>, riflettono una misurazione della BMD corretta per il volume osseo stimato. Per la stima del volume osseo di L2-L4 è stata utilizzata la formula suggerita da Kroger et al. <sup>(84, 85)</sup>.

$$\text{L-BMDv} = \text{BMDa (L2-L4)} \times [4/(\pi \times \text{larghezza media} \\ \text{misurata a livello delle vertebre lombari L2-L4})].$$

Secondo questo modello si assume che il corpo della vertebra lombare abbia una forma cilindrica. La validità di questo modello è stata dimostrata utilizzando i dati volumetrici ottenuti in vivo mediante impiego della risonanza magnetica nucleare eseguita a livello delle vertebre lombari <sup>(86)</sup>.

Nonostante la correzione dei valori di BMD in base al volume vertebrale stimato non sia anatomica, i valori di L-BMDv esprimono una migliore approssimazione della "vera"

densità minerale ossea rispetto alla L-BMDa <sup>(85)</sup>. La larghezza, l'altezza e l'area dei corpi vertebrali (L<sub>2</sub>-L<sub>4</sub>) sono forniti dal software dell'apparecchiatura DXA.

La stima della BMD volumetrica femorale si basa, al pari della misurazione a livello lombare, sul modello matematico proposto da Kroger et al. <sup>(84)</sup>. Tale modello paragona il collo femorale ad un cilindro e permette di calcolare la densità volumetrica femorale (F-BMDv) utilizzando la seguente formula:

$$\text{F-BMDv} = \text{BMDa} \times (4/\pi) \times (\text{altezza della sezione cilindrica} \\ \text{esaminata del collo femorale/area del collo femorale}).$$

La BMDa, l'altezza e l'area del collo femorale sono misurati dal software dell'apparecchiatura DXA. I valori di L-BMDa e F-BMDa, come quelli di L-BMDv e F-BMDv, e del TB-BMDa sono stati espressi secondo le rispettive unità di misura ed in Z-score utilizzando la stessa formula impiegata per il calcolo dello Z-score della statura. I valori di L-BMDa e L-BMDv ottenuti nei pazienti sono stati comparati con quelli di Boot et al. <sup>(87)</sup>, mentre i valori di F-BMDa e F-BMDv sono stati comparati con quelli di Kroger et al. <sup>(84)</sup>.

I valori di riferimento sono stati acquisiti utilizzando la stessa metodica DXA e le stesse procedure di calcolo impiegate nei pazienti esaminati.

Il CV, in vivo, per la L-BMD e per il corpo in toto è risultato <1.0% <sup>(58.)</sup> e <2.0% per la F-BMD <sup>(84)</sup>. L'esame DXA è stato condotto in tutti i pazienti del campione in studio di età superiore ai sette anni; pertanto è stato eseguito in tutti i pazienti del gruppo DMB e in sette pazienti su dieci del gruppo DMD.

#### **7.4 Misurazione della omeostasi fosfo-calcica, dello stato vitaminico D e degli indici di turnover osseo**

Abbiamo quantificato in tutti i pazienti i parametri biochimici sierologici per calcio (Ca), fosforo (P), magnesio (Mg), fosfatasi alcalina (ALP), lo stato vitaminico D per 1,25-OH<sub>2</sub>-D e 25-OH-D, ed il PTH. In tutti i pazienti inoltre sono stati dosati alcuni indici biochimici di *turnover* osseo quali l'Osteocalcina (OC), il PINP e ICTP.

Il dosaggio dei metaboliti della vitamina D e degli è stato condotto presso il Laboratorio di Medicina Nucleare dell'A.O.U Pisana.

I valori di PTH sono stati valutati con metodica IRMA (DiaSorin, Stillwater, MN, USA).

I metaboliti della vitamina D sono stati determinati con metodica RIA (DiaSorin, Stillwater, MN, USA). Gli indici biochimici del *turnover* osseo sono stati dosati con metodica RIA (CISbio, Bioassays, Codolet, FR per l'osteocalcina e per il propeptide N-terminale del procollagene tipo I; UniQ ORION Diagnostica, Espoo, Finland per il telopeptide del collagene tipo I).

#### **7.5 Valutazione della forza e della funzionalità motoria**

La misurazione della forza muscolare è stata effettuata in tutti i pazienti mediante applicazione della Scala *Medical Research Council* (MRC). La MRC consente la valutazione della forza a livello distrettuale mediante l'attribuzione da parte di un operatore esperto di un punteggio che, in base a criteri stabiliti, varia da 0 a 5. (0= nessuna contrazione muscolare; 1= tracce di contrazione muscolare; 2 (+/-)= possibili movimenti in assenza di

gravità o contro minima resistenza; 3 (+/-)= movimenti contro gravità ma non contro resistenza; 4 (+/-)= grado di debolezza da lieve a moderata, 5= normostenia).

Nello studio in oggetto nella valutazione della forza sono stati presi in esame i soli distretti muscolari relativi al cingolo pelvico, di cui ne è stata presa in considerazione la media aritmetica.

La valutazione motoria ha inoltre compreso la somministrazione di una scala funzionale standardizzata e validata su una popolazione di pazienti deambulanti affetti da distrofinopatia; la *North Scale Ambulatory Assessment* (NSAA) e un test di resistenza al cammino denominato *Six Minute Walk Test* (6MWT). Questi strumenti sono validi e specifici per i pazienti affetti da distrofinopatie e sono ampiamente utilizzati, sia nella pratica clinica che nei trial sperimentali, in quanto in grado di fornire utili misure di *outcome*.

La NSAA è stata proposta a tutto il campione in studio ad eccezione di tre pazienti appartenenti al gruppo DMD; in un caso la scala non è stata eseguita per inadeguatezza dello strumento alle caratteristiche funzionali motorie del paziente: soggetto non deambulante (pz n° 8; Tabella 8). Negli altri due la scala non è stata somministrata per insufficiente collaborazione durante la prova da parte dei pazienti più giovani del campione (pz n 13, 16; Tabella 8). Il 6MWT è stato somministrato in tutti i pazienti del gruppo DMB ed a sei pazienti su dieci del gruppo DMD. La misurazione non è stata quindi ottenuta in quattro pazienti del campione; in particolare in un caso la prova non è stata proposta per incapacità al cammino (pz n° 8; Tabella 8), nei restanti tre casi per insufficiente collaborazione al test da parte dei pazienti più giovani del campione (pz n° 13, 16, 17).

Durante la valutazione motoria è stato inoltre misurato il tempo impiegato nel passaggio dalla posizione supina alla statica eretta (*tempo di Gowers*), che rappresenta un valido indice indiretto dell'ipostenia a carico del cingolo pelvico. La misurazione è espressa in secondi, è stata effettuata in tutti i pazienti, tranne in due affetti da DMD (pz. n° 8, 11; Tabella 8) per incapacità a compiere il passaggio posturale.

## **Capitolo 8**

### **8. Analisi statistica**

I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  DS. La comparazione dei valori densitometrici, espressi come Z-score, rispetto al valore 0 e tra i valori basali e quelli finali, è stata effettuata mediante l'impiego del test non parametrico di Wilcoxon (Mann-Whitney). La comparazione dei parametri densitometrici tra il gruppo DMD e il gruppo DMB è stata effettuata mediante l'impiego del test non parametrico di Wilcoxon (Mann-Whitney). Le correlazioni lineari tra i vari parametri densitometrici e la durata della terapia con corticosteroidi nel gruppo DMD e la correlazione tra i vari parametri densitometrici e la funzionalità motoria in entrambi i gruppi è stata effettuata mediante l'analisi di regressione lineare semplice utilizzando la formula di Pearson.

E' stato considerato significativo un valore di  $p < 0.05$  per tutte le analisi statistiche effettuate.

Tutte le valutazioni statistiche sono state eseguite mediante programma SPSS-versione 13.0 (Statistical Package of Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## Capitolo 9

### 9. Risultati

#### 9.1 Parametri auxologici

I due gruppi, DMB e DMD, sono stati comparati per i parametri auxologici espressi in Z-score, senza evidenza di differenze statisticamente significative per peso e BMI (Figura 11); era evidente invece una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda i valori della statura (Figura 11).

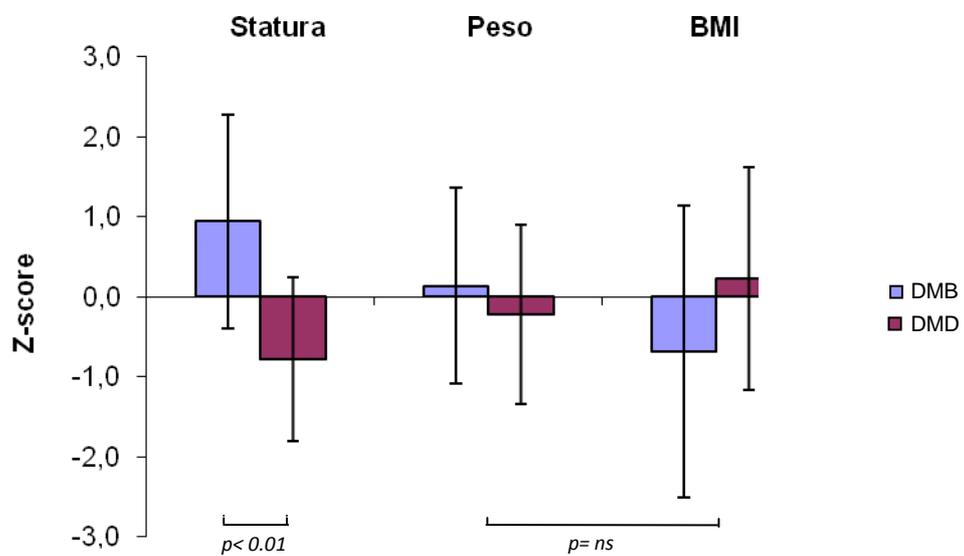


Figura 11: Valori medi  $\pm$  DS relativi alla statura, al peso e al BMI, espressi in Z-score, nei pazienti con Distrofia Becker vs i pazienti con Distrofia Duchenne

## 9.2 Score ottenuti dalle scale di valutazione funzionale motoria e dalla valutazione della forza al cingolo pelvico.

In tabella 8 sono riportati gli score ottenuti dalla valutazione motoria nel campione in studio. Gli score dei pazienti dal n° 1 al n° 7 sono relativi ai pazienti affetti da DMB, quelli dal n°8 al n° 17 sono relativi ai pazienti affetti da DMD.

	diagnosi	età' (a,m)	D/nD	T/nT	MRC (5/5)	NSAA (34/34)	passaggio posturale da supino ad eretto (sec.)	6MWT (mt)
Pz. 1	DMB	7,5	D	nT	4	30/34	2"41	491,55
Pz. 2	DMB	7,5	D	nT	4+	32/34	2"32	478
Pz. 3	DMB	16,1	D	nT	5	34/34	1"53	627,7
Pz. 4	DMB	12,7	D	nT	4-	27/34	3"19	617,7
Pz. 5	DMB	8,3	D	nT	4	30/34	2"09	531,7
Pz. 6	DMB	16,7	D	T	4-	29/34	3"62	462,4
Pz. 7	DMB	7,3	D	nT	4	26/34	2"	475,3
Pz. 8	DMD	15,8	ND	nT	2	**	**	**
Pz. 9	DMD	12,6	D	T	3+	26/34	5"63	363,70
Pz. 10	DMD	12,6	D	T	3+	18/34	13"60	344
Pz. 11	DMD	10,7	D	T	3	13/34	**	210
Pz. 12	DMD	10,8	D	T	4	23/34	5"08	455
Pz. 13	DMD	4,1	D	nT	4+	*	1"18	*
Pz. 14	DMD	6,3	D	T	4	25/34	3"31	431,4
Pz. 15	DMD	9,9	D	T	4-	14/34	45"	270,9
Pz. 16	DMD	4,7	D	nT	4	*	2"	*
Pz. 17	DMD	6,7	D	T	4	13	5"41	*

Tabella 8 Score ottenuti dalla valutazione funzionale dei pazienti affetti da DMB

Legenda: D: deambulante; nD: non deambulante; T: in terapia con corticosteroidi; nT: non in terapia con corticosteroidi. \*\*: misurazione non eseguita, per impossibilità funzionale. \*: misurazione non eseguita effettuata per scarsa collaborazione alla prova da parte dei pazienti più giovani.

Come atteso, la media e la deviazione standard dei punteggi ottenuti alle singole valutazioni motorie nel gruppo DMB risultano maggiori rispetto a quelle ottenute nel gruppo DMD (Tabella 9).

Diagnosi	età' (a,m)	deam- bulanti	Pz trattati con corico-steroidi	MRC (5/5)	NSAA (34/34)	passaggio da supino ad eretto (sec.)	6MWT (mt)
DMB	10,9±4,2	7	7	4,1 ± 0,5	29,7 ± 2,8	2,5 ± 0,7	526,3 ± 69,3
DMD	9,4±3,8	9	1	3,6 ± 0,7	19,8 ± 5,6	10,2 ± 14,5	410,1 ± 58,5

Tabella 9: Valori medi e di DS degli score ottenuti dalla valutazione nei pazienti DMB e nei pazienti DMD.

In figura 12 e 13 sono rispettivamente riportate le medie e le DS ottenute dai risultati della valutazione motoria effettuata mediante *NSAA* e *6MWT* nei pazienti DMB a confronto con i pazienti DMD. La differenza tra i due gruppi di pazienti è risultata statisticamente significativa. Non abbiamo ottenuto invece una differenza significativa nella comparazione tra le medie e le DS ottenute alla valutazione distrettuale della forza tramite *MRC* e nel tempo di passaggio dalla posizione supina alla statica, espresso in secondi.

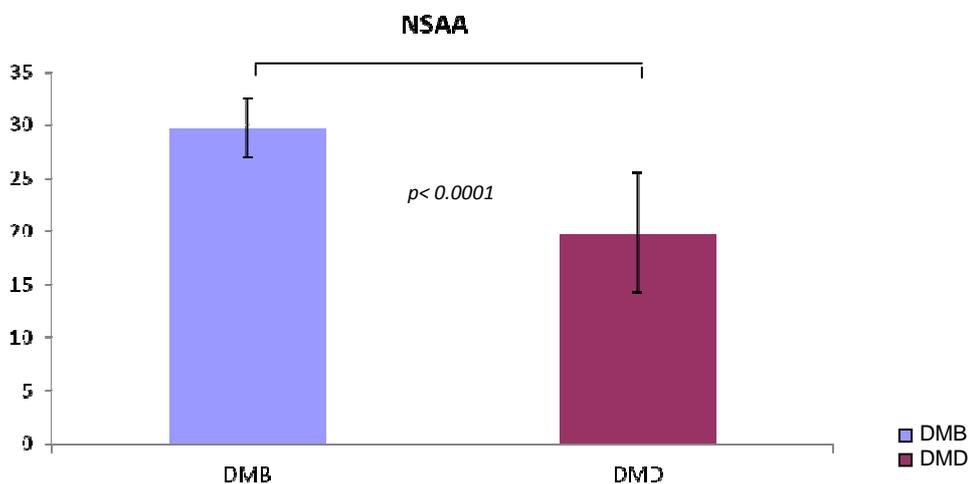


Figura 12: Valori medi medi ± DS relativi allo score ottenuto alla scala *NSAA* nei pazienti con Distrofia Becker vs i pazienti con Distrofia Duchenne; la differenza tra i due gruppi è risultata statisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ).

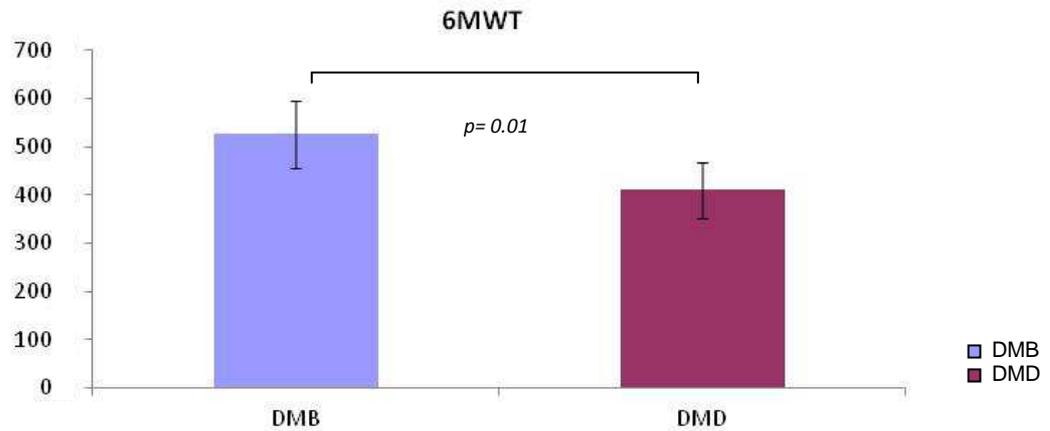


Figura 13: Valori medi medi  $\pm$  DS, in metri, relativi allo score ottenuto alla 6MWT nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) vs i pazienti con Distrofia Duchenne (DMD); la differenza tra i due gruppi è risultata statisticamente significativa ( $p=0.01$ ).

### 9.3 Parametri densitometrici

Nei pazienti DMB lo stato minerale osseo, valutato mediante tecnica QUS, è risultato non significativamente ridotto ( $p=ns$ ) rispetto al valore 0 sia per il parametro AD-SoS ( $1.1 \pm 1$  Z-score) che per il parametro BTT ( $0,1 \pm 0,6$  Z-score). Nei pazienti DMD lo stato minerale osseo, valutato con tecnica QUS, per il parametro AD-SoS ( $0,4 \pm 1,4$  Z-score) è risultato non significativamente ridotto ( $p=ns$ ) rispetto al valore 0, il parametro BTT ( $-0,8 \pm 1$  Z-score) è invece risultato statisticamente significativo ( $p<0.05$ ) rispetto al valore 0.

In figura 14 e 15 sono riportati, rispettivamente, i valori di AD-SoS e di BTT dei singoli pazienti ed il valore medio di ciascun gruppo. In figura 16 sono riportati le medie dei due gruppi a confronto; la differenza tra i due gruppi di pazienti è risultata statisticamente non significativa.

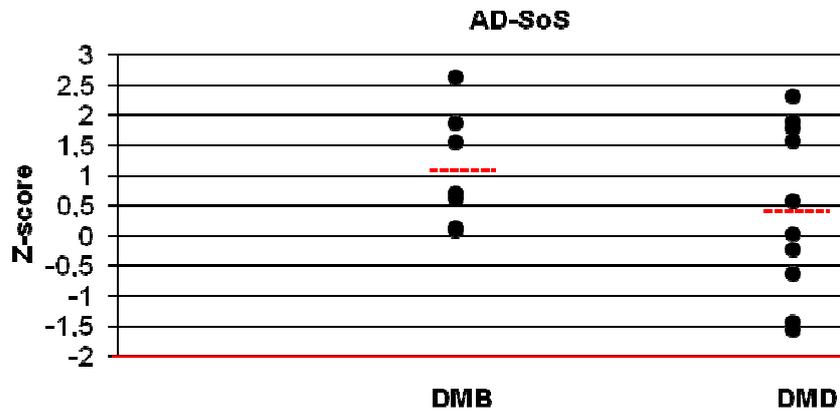


Figura 14: Valori di AD-SoS espressi in Z-score nei pazienti con Distrofia di Becker (DMB) e nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD). Il segmento tratteggiato in rosso indica la media del gruppo, la linea rossa continua il cut off di significatività.

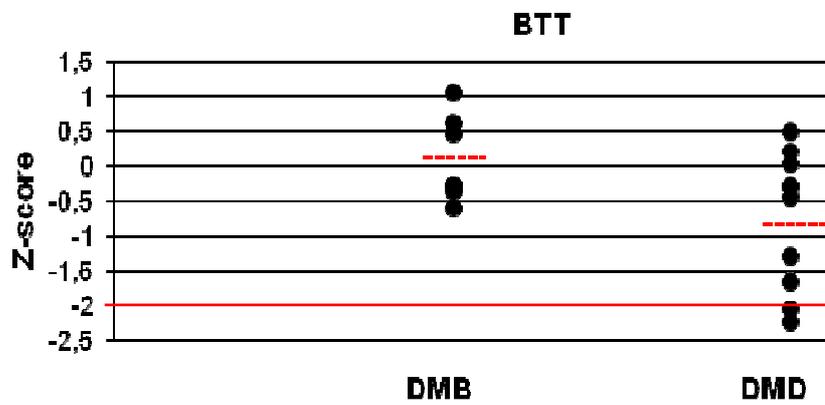


Figura 15: Valori di BTT espressi in Z-score nei pazienti con Distrofia di Becker (DMB) e nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD). Il breve segmento tratteggiato in rosso indica la media del gruppo, la linea rossa continua il cut off di significatività.

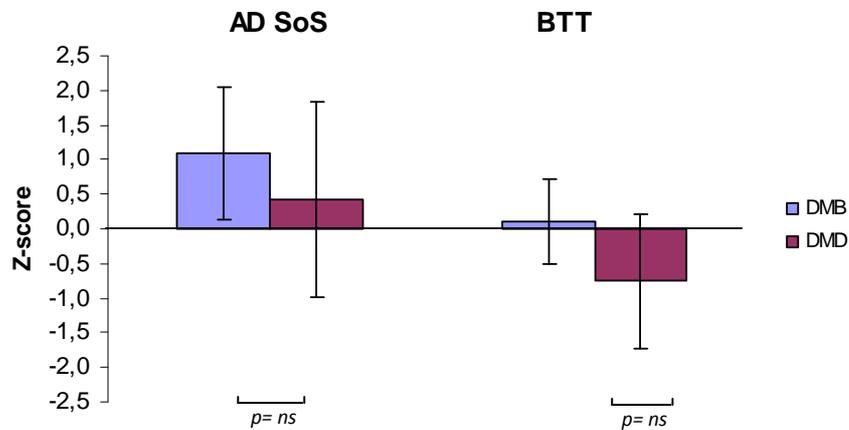


Figura 16. Valori medi  $\pm$  DS di AD-SoS e BTT nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) vs i pazienti con Distrofia Duchenne (DMD); la differenza tra i due gruppi è risultata statisticamente non significativa ( $p= ns$ ).

Dalla misurazione dello stato minerale osseo mediante tecnica DXA a livello delle vertebre lombari (L2-L4), del collo del femore e del corpo in toto è emerso che:

Nei pazienti DMB la L-BMD è risultata non significativamente ridotta rispetto al valore 0 sia per L-BMDa ( $-0,5 \pm 1$  Z-score) che per L-BMDv ( $0,1 \pm 0,9$  Z-score). Nei pazienti DMD la L-BMD è risultata non significativamente ridotta ( $p= ns$ ) rispetto al valore 0 per il parametro L-BMDa ( $-1,1 \pm 0,8$  Z-score), invece è risultata significativamente ridotta ( $p<0.01$ ) rispetto al valore 0 per il parametro L-BMDv ( $-0,6 \pm 1,3$  Z-score).

In figura 17 e 18 sono riportati, rispettivamente, i valori di L-BMDa e di L-BMDv dei singoli pazienti ed il valore medio di ciascun gruppo di pazienti.

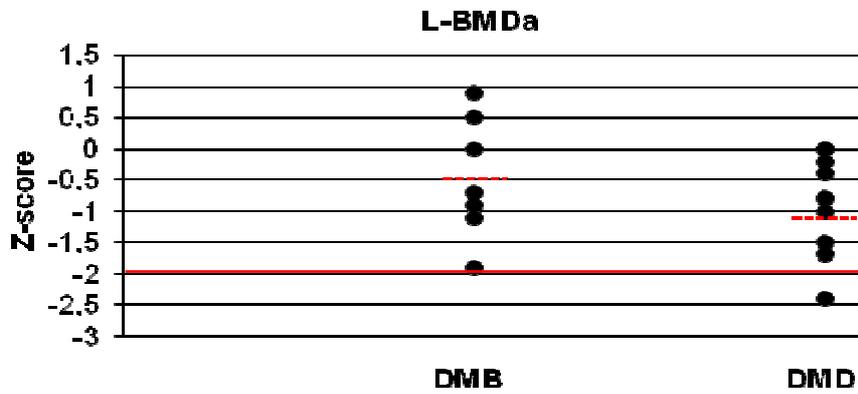


Figura 17: Valori di L-BMDa espressi in Z-score nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) e nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD). Il breve segmento tratteggiato in rosso indica la media del gruppo, la linea rossa continua il cut off di significatività.

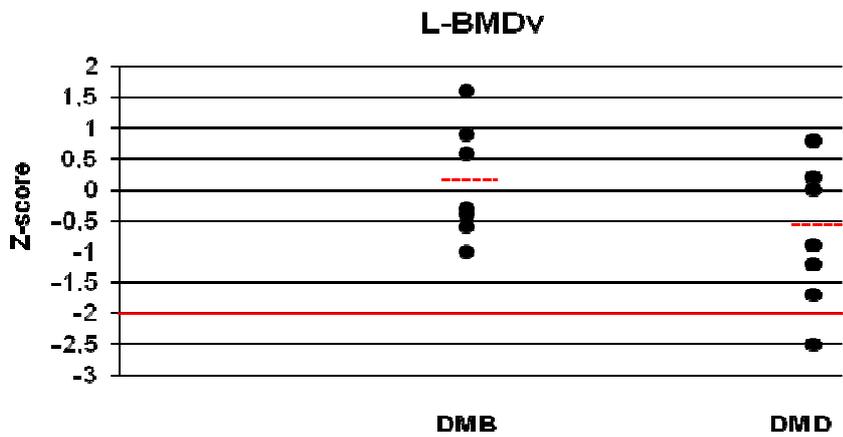


Figura 18: Valori di L-BMDv espressi in Z-score nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) e nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD). Il breve segmento tratteggiato in rosso indica la media del gruppo, la linea rossa continua il cut off di significatività.

In figura 19 sono riportate le medie dei due gruppi di pazienti a confronto; la differenza tra i due gruppi è risultata statisticamente non significativa.

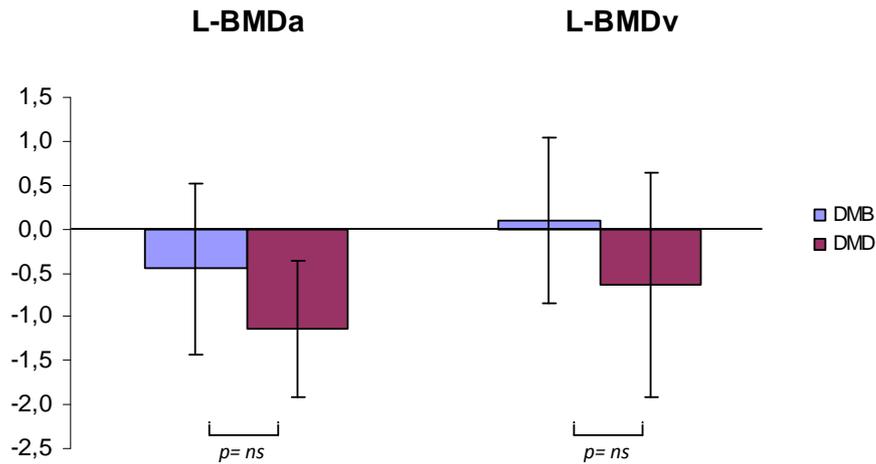


Figura 19. Valori medi  $\pm$  DS di L-BMDa e L-BMDv nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) vs i pazienti con Distrofia Duchenne (DMD); la differenza tra i due gruppi è risultata statisticamente non significativa ( $p=ns$ ).

Nei pazienti DMB la F-BMD media è risultata significativamente ridotta rispetto al valore 0 sia per F-BMDa ( $-1,4 \pm 0,8$  Z-score;  $p<0.01$ ) che per F-BMDv ( $-1,2 \pm 0,9$  Z-score;  $p<0.02$ ). Anche nei pazienti DMD la F-BMD è risultata significativamente ridotta ( $p<0.01$ ) rispetto al valore 0, sia per i valori di F-BMDa ( $-4,2 \pm 2,3$  Z-score) che per i valori di F-BMDv ( $-3,1 \pm 1,4$  Z-score); sei pazienti su sette mostrano parametri di F-BMDa e F-BMDv  $< -2$  Z-score. In figura 20 e 21 sono riportati, rispettivamente i valori F-BMDa e F-BMDv dei singoli pazienti e il valore medio di ciascun gruppo. In figura 22 sono riportati le medie e le DS dei due gruppi di pazienti a confronto; la differenza tra i due gruppi di pazienti è risultata statisticamente significativa.

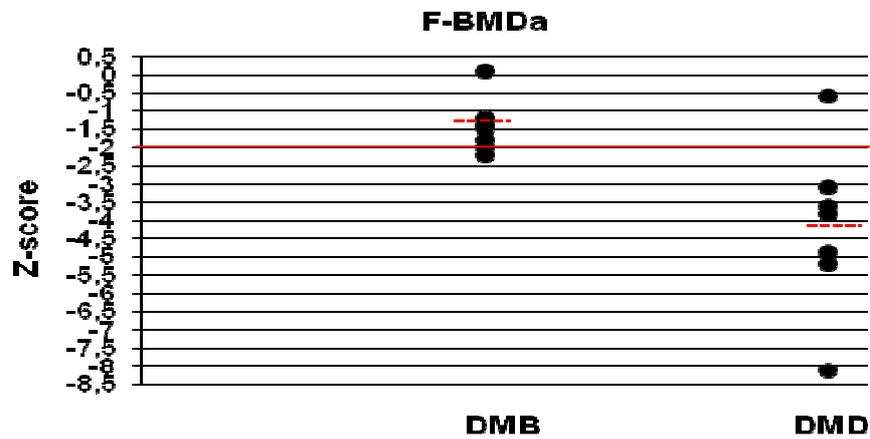


Figura 20: Valori di F-BMDa espressi in Z-score nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) e nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD). Il breve segmento tratteggiato in rosso indica la media del gruppo, la linea rossa continua il cut off di significatività.

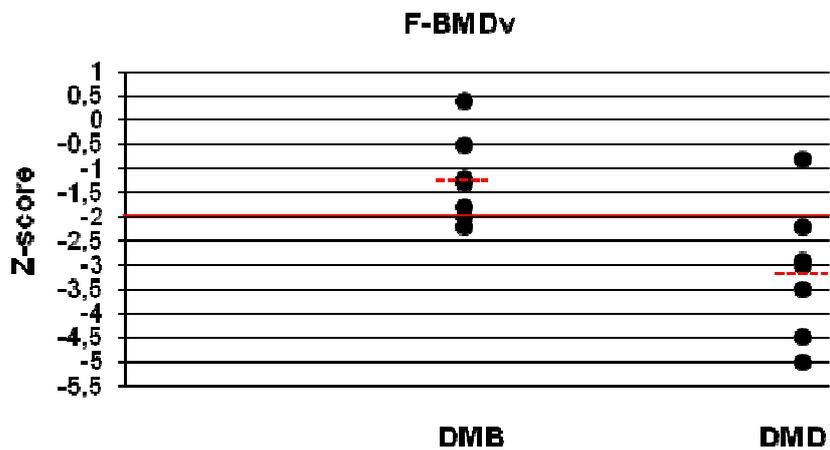


Figura 21 : Valori di F-BMDv espressi in Z-score nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) e nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD). Il breve segmento tratteggiato in rosso indica la media del gruppo, la linea rossa continua il cut off di significatività.

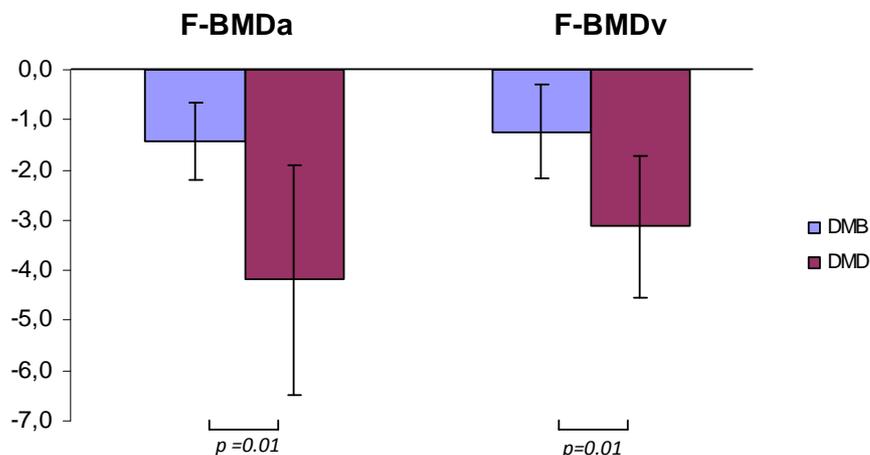


Figura 22: Valori medi  $\pm$  DS di L-BMDa e L-BMDV nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) vs i pazienti con Distrofia Duchenne (DMD); la differenza tra i due gruppi è risultata statisticamente significativa ( $p=0.01$ )

Nei pazienti DMB la TB-BMDa media ( $-0,5 \pm 1$  Z-score) è risultata non significativamente ridotta ( $p=ns$ ) rispetto al valore 0; un solo paziente affetto da DMB mostra una TB-BMD  $<-2$  Z-score; il paziente è in trattamento con corticosteroidi da 41 mesi per una dose cumulativa lifetime di 37125 mg (pz. 7; tabella 6). Nei pazienti DMD la TB-BMDa è risultata significativamente ridotta ( $p < 0.05$ ) rispetto al valore 0 per i valori di TB-BMDa ( $-1,5 \pm 1,5$  Z-score).

In figura 23 sono riportati i valori TB-BMDa dei singoli pazienti e il valore medio di ciascun gruppo, in figura 24 sono riportate le medie e le DS dei due gruppi a confronto; la differenza tra i due gruppi è risultata statisticamente significativa.

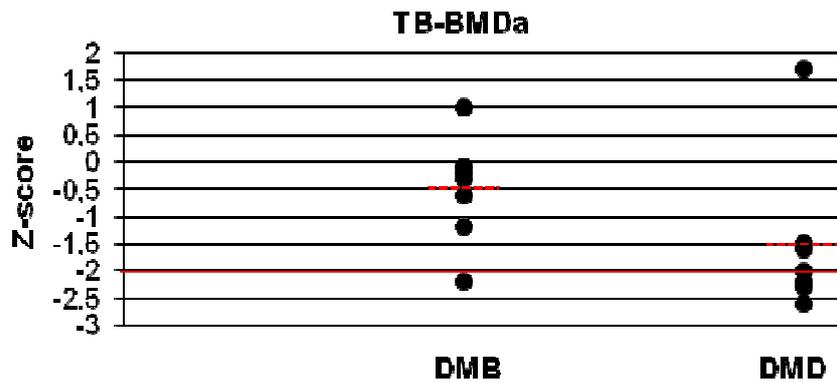


Figura 23 : Valori di TB-BMDa espressi in Z-score nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) e nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD). Il breve segmento tratteggiato in rosso indica la media del gruppo, la linea rossa continua il cut off di significatività.

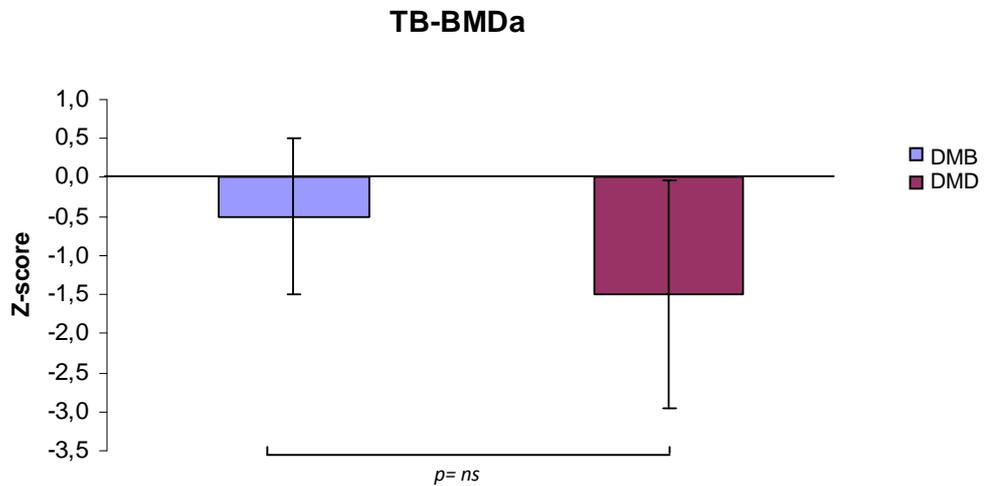


Figura 24: Valori medi  $\pm$  DS di TB-BMDa nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) vs i pazienti con Distrofia Duchenne (DMD); la differenza tra i due gruppi è risultata statisticamente non significativa ( $p = ns$ )

#### **9.4 Correlazioni tra i parametri densitometrici, i parametri di valutazione funzionale-motoria, il trattamento corticosteroideo e lo stato vitaminico D**

Nei 14 pazienti che hanno effettuato l'esame DXA è stata evidenziata una correlazione positiva tra BMD e forza muscolare (MRC) e tra BMD e funzionalità motoria misurata con la scala *NSAA* e *6MWT*. (Figure 25-30).

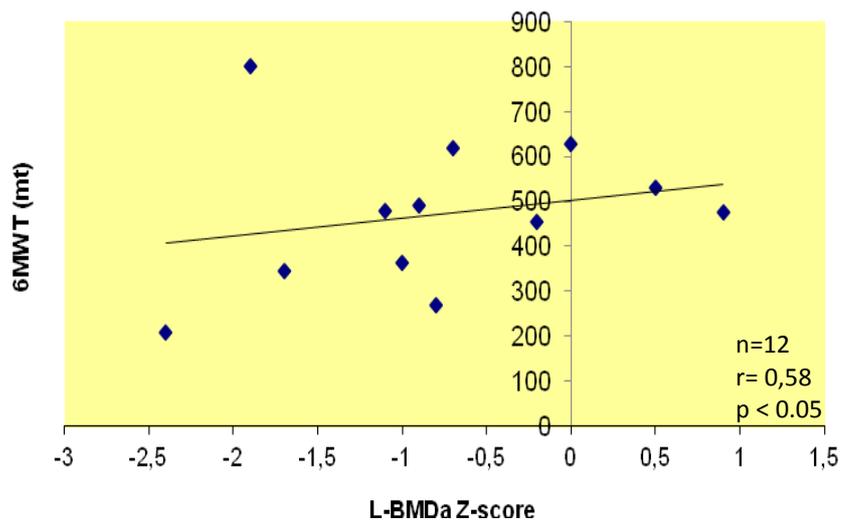


Figura 25 Correlazione tra i valori di L-BMDa e *Six Minute Walk Test* (6MWT).

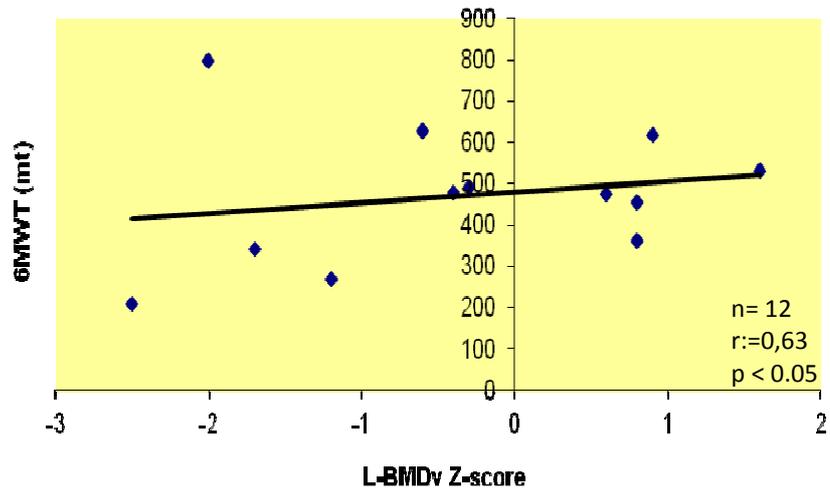


Figura 26 Correlazione tra i valori di L-BMDv e *Six Minute Walk Test* (6MWT).

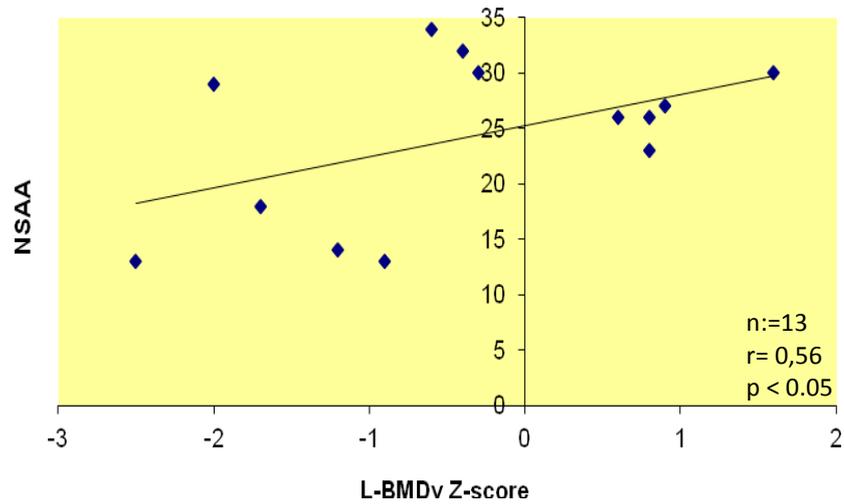


Figura 27 Correlazione tra i valori di L-BMDv e *Nort Star Ambulatory Assessment* (NSAA)

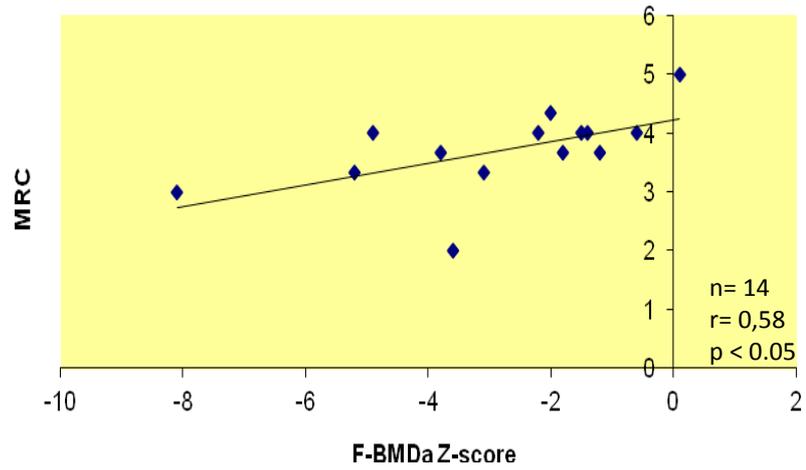


Figura 28 Correlazione tra i valori di F-BMDa e *Medical Research Council* (MRC).

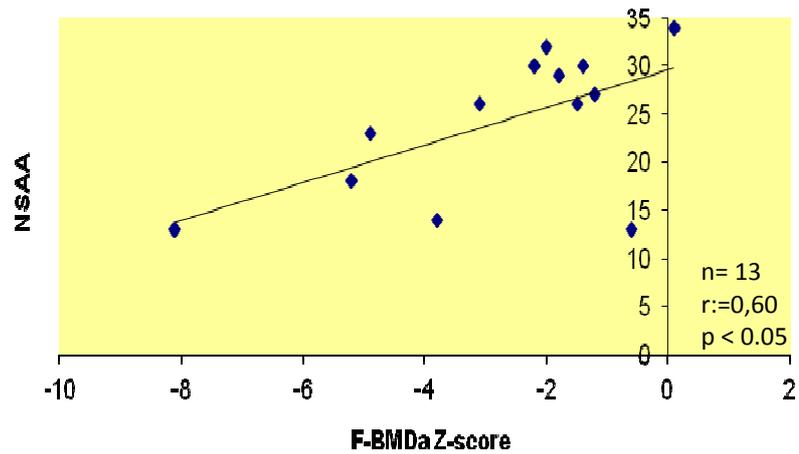


Figura 29 Correlazione tra i valori di F-BMDa e *Nort Star Ambulatory Assessment* (NSAA).

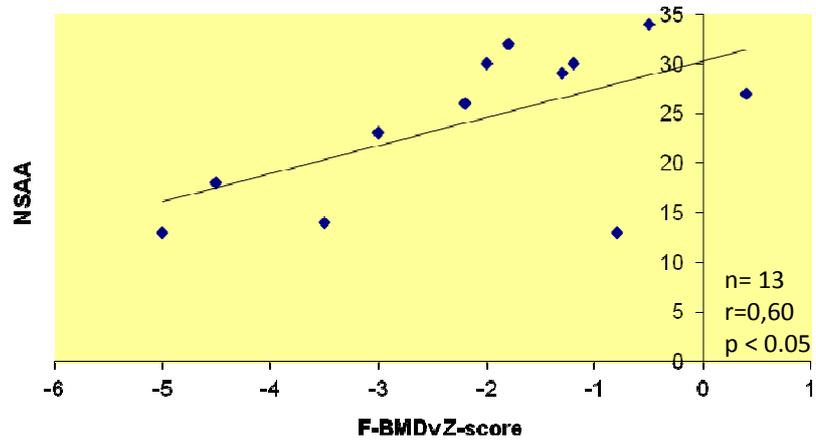


Figura 30 Correlazione tra i valori di F-BMDv e Nort Star Ambulatory Assessment (NSAA).

In particolare, i livelli più elevati di correlazione sono stati osservati tra i valori di F-BMD e 6MWT (Figure 31-32) e tra TB-BMDa e NSA (figura 33). Non vi era correlazione tra F-BMD e tempo impiegato per sollevarsi da terra (L-BMBa,  $r = -0.18$ ,  $p = ns$ ; L-BMDv,  $r = -0.45$ ,  $p = ns$ ).

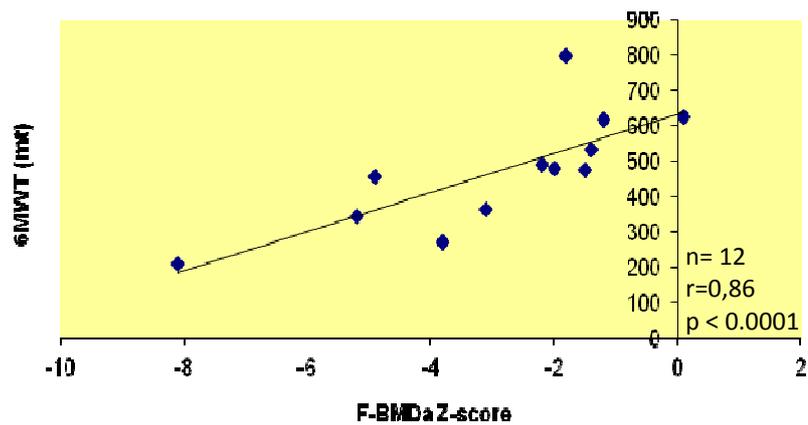


Figura 31 Correlazione tra i valori di F-BMDa e Six Minute Walk Test (6MWT).

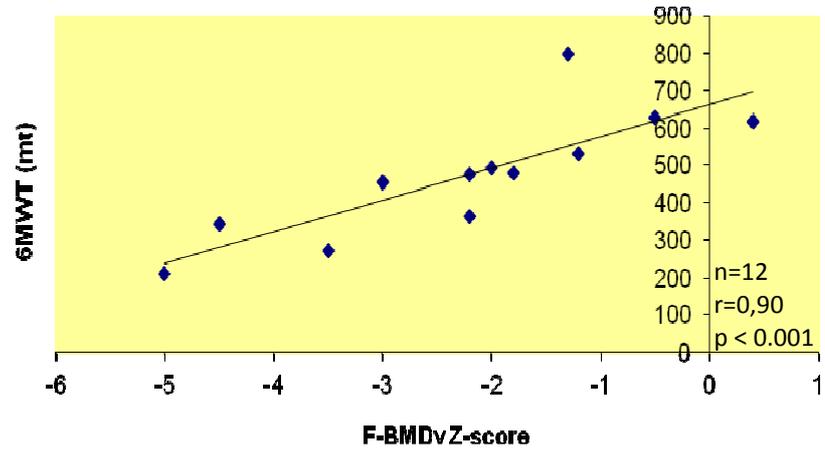


Figura 32 Correlazione tra i valori di F-BMDV e *Six Minute Walk Test* (6MWT).

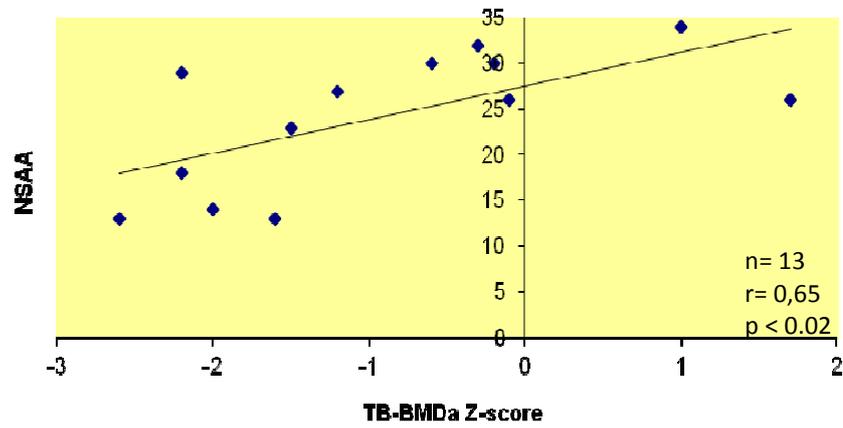


Figura 33 Correlazione tra i valori di TB-BMDa e *Nort Star Ambulatory Assessment* (NSAA).

Dallo studio non sono emerse correlazioni tra i parametri densitometrici ed i parametri relativi al trattamento corticosteroidico (Tabella 10) e tra i parametri densitometrici e lo stato vitaminico D (Tabella 11).

	Durata terapia con corticosteroidi, in mesi	Dose cumulativa di corticosteroidi, in mg
<b>AD-SoS</b>	$r = 0,15$ $p = 0,70$	$r = -0,14$ $p = 0,71$
<b>BTT</b>	$r = 0,83$ $p = 0,83$	$r = -0,07$ $p = 0,84$
<b>L-BMDa</b>	$r = -0,44$ $p = 0,23$	$r = -0,60$ $p = 0,08$
<b>L-BMDv</b>	$r = -0,27$ $p = 0,47$	$r = -0,33$ $p = 0,42$
<b>F-BMDa</b>	$r = -0,61$ $p = 0,76$	$r = -0,46$ $p = 0,21$
<b>F-BMDv</b>	$r = -0,60$ $p = 0,89$	$r = -0,49$ $p = 0,18$
<b>TB-BMDa</b>	$r = 0,13$ $p = 0,41$	$r = 0,26$ $p = 0,48$

Tabella 10: Indici di correlazione ( $r$ ) e di significatività ( $p$ ) ottenuti dalla correlazione tra parametri densitometrici studiati e la durata della terapia con corticosteroidi, in mesi, e di dose cumulativa, in mg. Le correlazioni ottenute sono risultate non significative.

	AD-SoS	BTT	L-BMDa	L-BMDv	F-BMDa	F-BMDv	TB-BMD
<b>25-OH-D</b>	$r = 0,31$ $p = 0,21$	$r = 0,42$ $p = 0,09$	$r = -0,24$ $p = 0,33$	$r = -0,11$ $p = 0,66$	$r = -0,20$ $p = 0,43$	$r = -0,08$ $p = 0,76$	$r = -0,20$ $p = 0,42$

Tabella 11: Indici di correlazione ( $r$ ) e di significatività ( $p$ ) ottenuti dalla correlazione tra il valore di 25-OH-D, espresso in ng/ml ed i parametri densitometrici studiati. La correlazione ottenuta è risultata non significativa.

### 9.5 Correlazioni tra i parametri densitometrici

Era evidente una correlazione positiva tra i valori di AD-SoS e BTT ( $r= 0,54$  ,  $p= 0,03$ ) e tra i valori di L-BMDa e L-BMDv ( $r= 0,78$  ,  $p= 0,001$ ) , F-BMDa e F-BMDv ( $r= 0,91$  ,  $p= 0,000$  ) e L-BMDv e F-BMDv ( $r= 0,55$  ,  $p= 0,04$ ) .

Non è stata invece evidenziata alcuna correlazione tra i parametri densitometrici misurati con metodica QUS e quelli misurati con metodica DXA in tutti le sedi valutate (Tabella 12).

	L-BMDa	L-BMDv	F-BMDa	F-BMDv	TB-BMDa
<b>AD-SoS</b>	$r= 0,37$ $p=0,19$	$r= 0,43$ $p=0,12$	$r= 0,17$ $p=0,54$	$r= 0,35$ $p=0,21$	$r= 0,17$ $p=0,55$
<b>BTT</b>	$r= 0,35$ $p=0,20$	$r= 0,69$ $p=0,81$	$r= 0,14$ $p=0,63$	$r= 0,12$ $p=0,66$	$r= 0,22$ $p=0,44$

Tabella 12: Indici di correlazione ( $r$ ) e di significatività ( $p$ ) ottenuti dalla correlazione tra i parametri densitometrici ottenuti mediante metodica QUS ed i parametri ottenuti mediante metodica DXA. Le correlazione ottenute sono risultate non significative.

### 9.6 Parametri del metabolismo fosfo-calcico e stato vitaminico D.

In tabella 13 sono riportati i valori medi di calcio, fosforo, magnesio e fosfatasi alcalina ottenuti nei pazienti affetti da DMB, in quelli affetti da DMD e nei pazienti in toto. Non erano evidenti differenze significative tra i valori di calcio, fosforo e magnesio tra i due gruppi di pazienti (Figura 34), mentre i valori di fosfatasi alcalina risultavano significativamente ridotti nei pazienti DMD (Figura 35). Per quanto riguarda i parametri biochimici ematici relativi a Ca, P, Mg, ALP in tutti i pazienti si ottengono valori nella norma (valori di riferimento: Ca 8,5-10,5 mg/dl; P 4-7 mg/dl; Mg 1,7-2,3 mg/dl; ALP <300 UI/L). Tra i due gruppi di pazienti, DMB vs DMD, non si apprezza una differenza

statisticamente significativa per Ca, P e Mg; si rileva invece una differenza significativa per la ALP ( $p < 0.05$ ). (Figura 34)

	Calcio, mg	Fosforo, mg	Magnesio, mg	ALP, UI/l
<b>DMD</b>	9,4 ± 0,3	4,9 ± 0,5	2,0 ± 0,1	114,2 ± 54,6
<b>DMB</b>	9,6 ± 0,3	4,6 ± 0,7	1,9 ± 0,1	173,4 ± 37,8
<b>DMD+DMB</b>	9,5 ± 0,3	4,8 ± 0,6	2,0 ± 0,1	138,6 ± 55,8

Tabella 13: Valori medi ± DS dei valori ottenuti dalla misurazione dei parametri ematici del metabolismo fosfo-calcico nei pazienti con Distrofia Becker (DMB), pazienti con Distrofia Duchenne (DMD) e nel campione oggetto di studio.

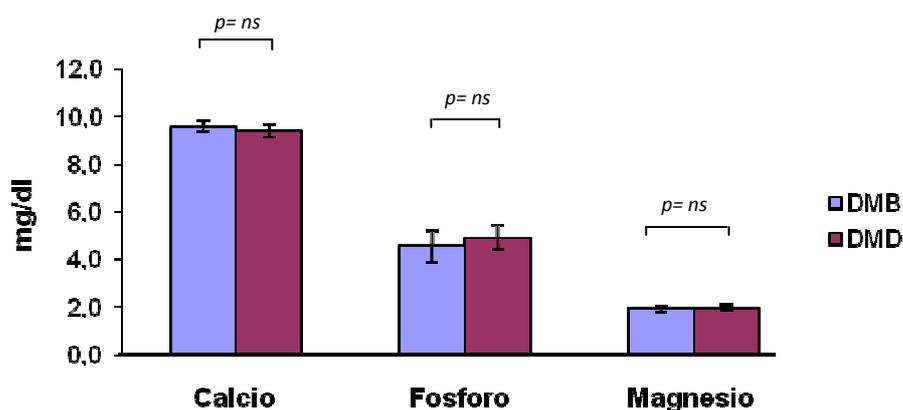


Figura 34 Valori medi ± DS di calcio (Ca), fosforo (P) e magnesio (Mg), espressi in mg/dl, nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) vs i pazienti con Distrofia Duchenne (DMD); la differenza tra i due gruppi di pazienti è risultata statisticamente non significativa ( $p = ns$ )

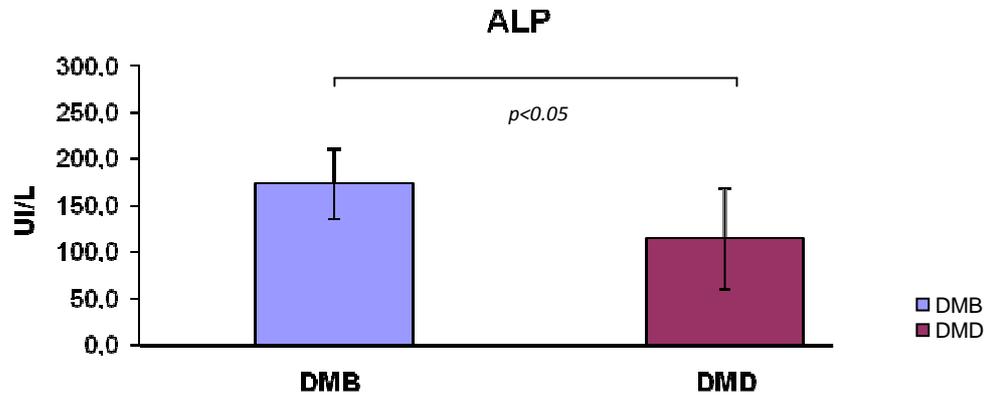


Figura 35 Valori medi  $\pm$  DS di fosfatasi alcalina (ALP), espressa in U/L, nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) vs i valori dei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD); la differenza tra i due gruppi di pazienti è risultata statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

I valori di PTH nell'intero campione è risultato di  $45,1 \pm 22,4$  pg/ml (v.n. 10 - 65 pg/ml). Tutti i pazienti DMB mostrano valori di PTH nella norma ( $38,1 \pm 8,9$  pg/ml). Anche i pazienti affetti da DMD i valori di PTH erano nei limiti della norma ( $49,7 \pm 26,5$  pg/ml) ad eccezione un paziente che, in associazione a valori di 25-OH-D nel range dell'ipovitaminosi D ( $10,1$  ng/ml) presentava valori di PTH francamente aumentati ( $117$  pg/ml) (Figura 36). I valori medi di PTH non differivano tra i pazienti DMB e DMD (Figura 39).

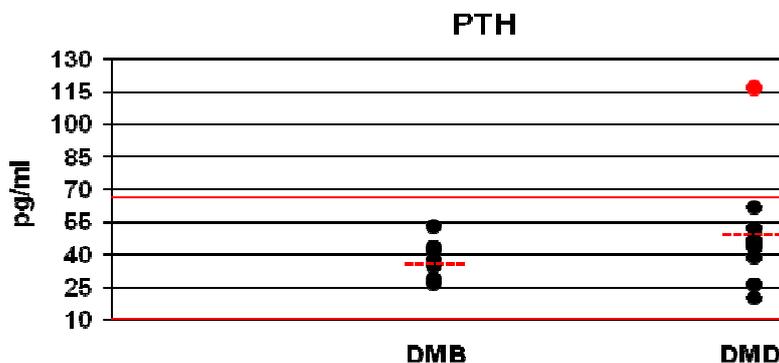


Figura 36: Valori di PTH espressi in pg/ml nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) e nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD). Il breve segmento tratteggiato in rosso indica la media del gruppo, la linea rossa continua indica il range di normalità

I valori medi di 25-OH-D risultano compresi nel range dell'ipovitaminosi D ( $11,0 \pm 3,9$  ng/ml; v.n. 20 - 100 ng/ml). Tra i pazienti affetta da DMB cinque su sette presentavano valori di 25-OH-D erano compresi tra 10 e 20 ng/ml (ipovitaminosi D) in un paziente <10 ng/ml (deficit di vitamina D); soltanto un paziente aveva valori di 25-OH-D nella norma (il paziente era l'unico in trattamento con corticosteroidi). Tra i pazienti DMD sette pazienti su dieci mostravano valori di 25-OH-D erano compresi tra 10 e 20 ng/ml (ipovitaminosi D), e tre pazienti su dieci valori <10 ng/ml (deficit di vitamina D) (Figura 37).

I valori medi di 25-OH-D non differivano tra i pazienti DMB e DMD (Figura 39).

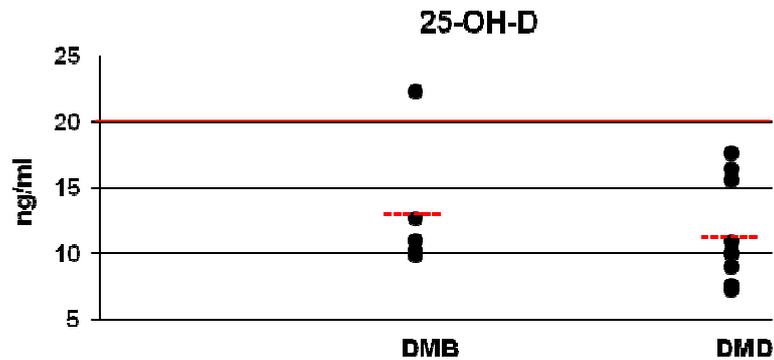


Figura 37: Valori di 25-OH-D espressi in ng/ml nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) e nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD). Il segmento in rosso indica la media del gruppo, la linea in rosso indica il cut off.

I valori medi di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  risultavano nella norma ( $30,2 \pm 12,9$  pg/ml; v.n. 20-80 pg/ml) in tutti i pazienti affetti da DMB, mentre nei pazienti affetti da DMD tre su dieci presentavano valori di  $1,25\text{-OH}_2\text{-D}$  inferiori a 20 pg/ml (Figura 38). I valori medi di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  non differivano tra i pazienti DMB e DMD (Figura 39).

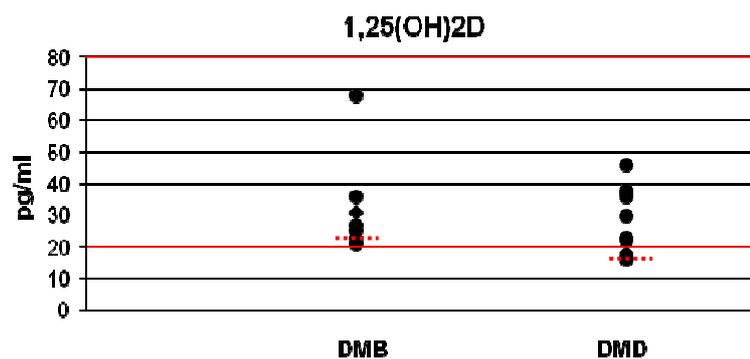


Figura 38: Valori di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  espressi in pg/ml nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) e nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD). Il breve segmento tratteggiato in rosso indica la media del gruppo, la linea rossa continua indica il range di normalità

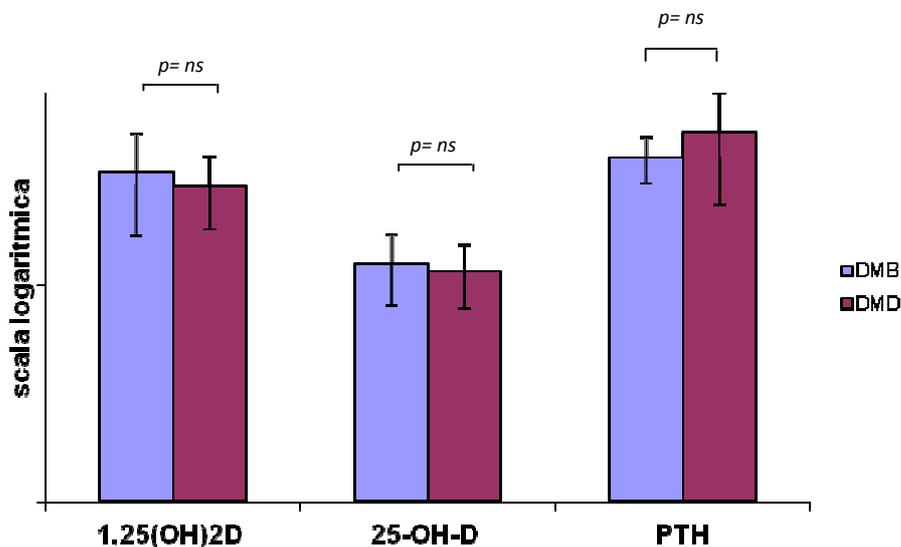


Figura 39 Valori medi  $\pm$  DS di 1,25(OH)<sub>2</sub>D, 25-OH-D, PTH, espressi in scala logaritmica, ottenuti nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) vs i pazienti con Distrofia Duchenne (DMD). la differenza tra i due gruppi è risultata statisticamente non significativa ( $p = ns$ )

### 9.7 Indici biochimici del turnover osseo

I valori medi di OC risultavano di  $54,9 \pm 22,6$  ng/ml (v.n. 20 - 100 ng/ml per i soggetti prepuberi, 50 - 200 ng/ml per i soggetti puberi, segnalati nel grafico con ^). I valori di OC nei singoli pazienti DMB e DMD sono riportati, rispettivamente, in figura 40 e figura 41. Un paziente pubere dei pazienti affetti da DMB mostrava valori di OC inferiore al range di riferimento. Tre pazienti affetti da DMD mostrano valori di OC inferiori rispetto al range di riferimento. Nei pazienti DMB i valori di OC erano in media di  $47,9 \pm 22,1$  ng/ml e tra i pazienti DMD di  $65,1 \pm 20,5$  ng/ml; tale differenza non era significativa (Figura 46).

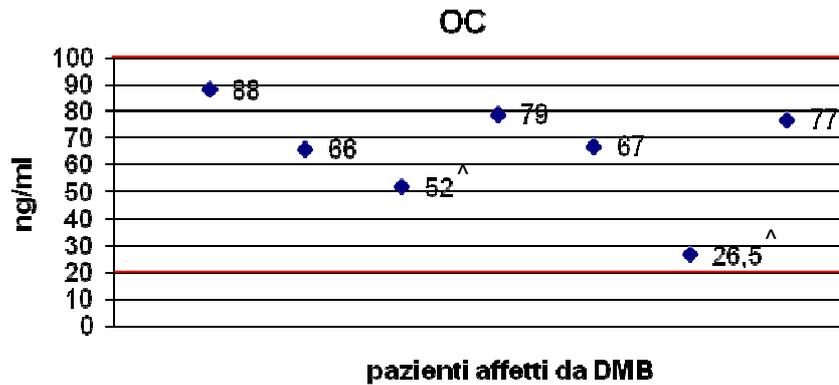


Figura 40: Valori di OC, espressi in ng/ml ottenuti nei pazienti con Distrofia Becker (DMB), le linee rosse indicano il range di normalità nei soggetti prepuberi. I due pazienti puberi sono indicati con il simbolo ^.

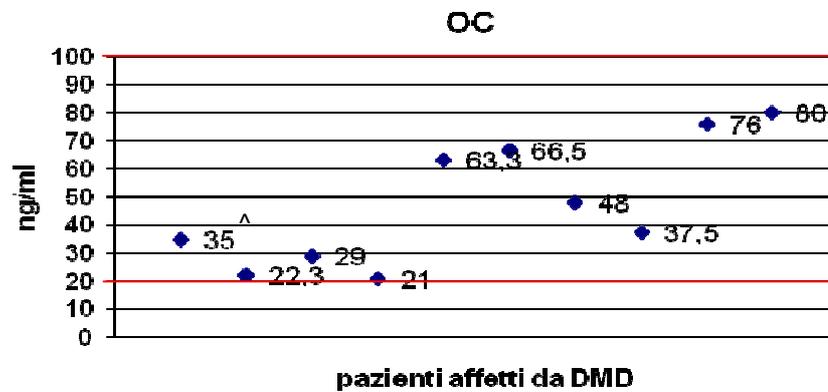


Figura 41: Valori di OC, espressi in ng/ml ottenuti nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD), le linee rosse indicano il range di normalità nei soggetti prepuberi. Il paziente pubere è indicato con il simbolo ^.

I valori medi di PINP nel campione in toto risultavano di  $184,0 \pm 86,9 \mu\text{g/l}$ , (v.n: 180 - 480  $\mu\text{g/l}$  per i soggetti prepuberi, 220 - 660  $\mu\text{g/l}$  per i soggetti puberi). Due pazienti affetti da

DMB e cinque affetti da DMD mostravano ridotti valori di PINP (Figure 42 e 43). Tra i pazienti DMB il valore medio di PINP risultavano di  $169,5 \pm 73,9 \mu\text{g/l}$ , mentre tra i pazienti DMD il valore medio era di  $204,7 \pm 105,3 \mu\text{g/l}$ ; le differenza tra le medie non era significativa (Figura 46 ).

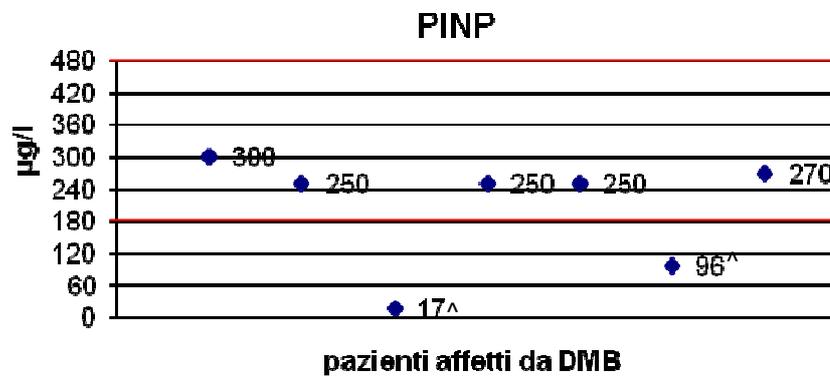


Figura 42: Valori di PINP, espressi in  $\mu\text{g/ml}$ , ottenuti nei pazienti con Distrofia Becker (DMB), le linee rosse indicano il range di normalità nei soggetti prepuberi. I due pazienti puberi sono indicati con il simbolo  $\wedge$ .

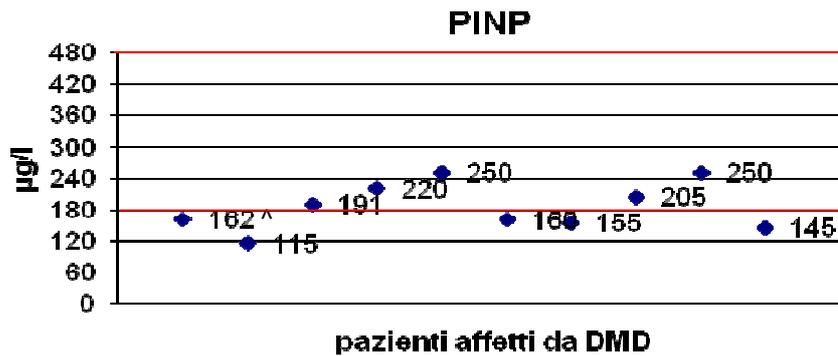


Figura 43: Valori di PINP, espressi in  $\mu\text{g/ml}$ , ottenuti nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD), le linee rosse indicano il range di normalità nei soggetti prepuberi. Il paziente pubere è indicato con il simbolo  $\wedge$ .

I valori medi di ICTP nel campione in toto erano di  $14,8 \pm 4,9 \mu\text{g/l}$ ; (v.n.  $12 - 15 \mu\text{g/l}$  per i soggetti prepuberi,  $12 - 28 \mu\text{g/l}$  per i soggetti puberi). Un paziente affetto da DMB e quattro affetti da DMD mostravano ridotti valori di tale indice, invece sei pazienti affetti da DMB e tre affetti da DMD mostrano valori aumentati. (Figure 44 e 45). I valori medi di ICTP nei pazienti affetti da DMB era di  $13,9 \pm 4,2 \mu\text{g/l}$ , nei pazienti affetti da DMD era di  $16,0 \pm 5,8 \mu\text{g/l}$ , la differenza tra i due valori non era significativa (Figura 46)

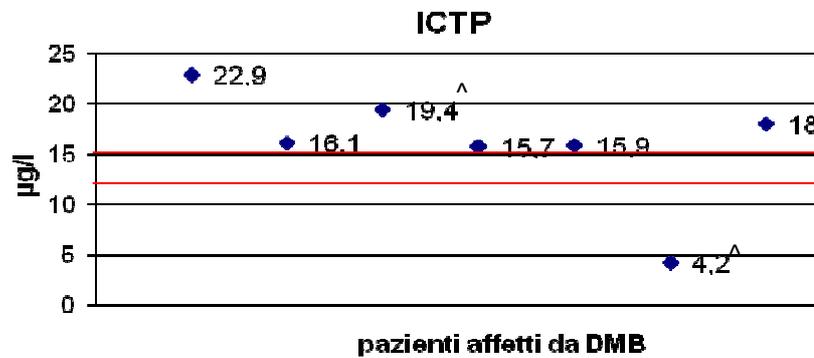


Figura 44: Valori di ICTP espressi in  $\mu\text{g/ml}$  ottenuti nei pazienti con Distrofia Becker (DMB), le linee rosse indicano il range di normalità nei soggetti prepuberi. I due pazienti puberi sono indicati con il simbolo ^.

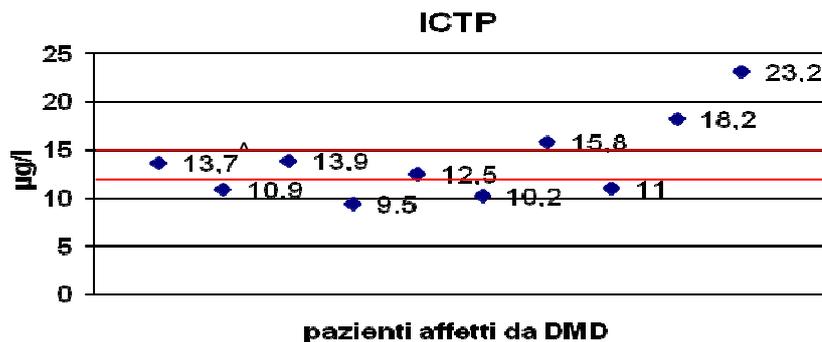


Figura 45: Valori di ICTP espressi in  $\mu\text{g/ml}$  nei pazienti con Distrofia Duchenne (DMD), le linee rosse indicano il range di normalità nei soggetti prepuberi. Il paziente pubere è indicato con il simbolo ^

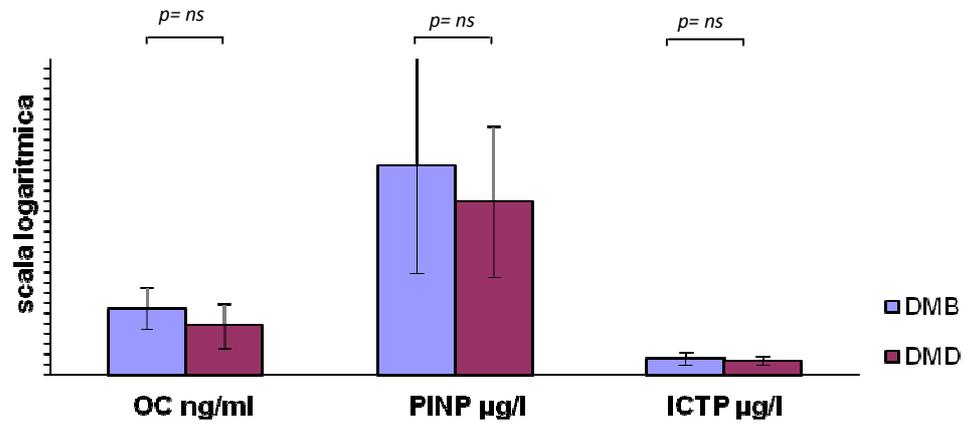


Figura 46 Valori medi  $\pm$  DS OC, PINP, ICTP espressi in scala logaritmica ottenuti nei pazienti con Distrofia Becker (DMB) vs i pazienti con Distrofia Duchenne (DMD). La differenza tra i due gruppi di pazienti è risultata statisticamente non significativa ( $p = ns$ ).

## Capitolo 10

### 10. Discussione

Studi in letteratura, hanno dimostrato che nel corso della storia naturale della Duchenne è probabile che si realizzi anche un danno a carico del tessuto osseo che si esprime sostanzialmente con una riduzione della densità minerale ossea (BMD) <sup>(70)</sup>. Le probabili cause del progressivo depauperamento osseo sono state finora prevalentemente attribuite all'impiego dei corticosteroidi e alla riduzione progressiva della mobilità muscolare.

Partendo da tali presupposti ci siamo proposti di studiare in un campione di pazienti distrofinopatici (DMB/DMD): - lo stato minerale osseo mediante ultrasonografia ossea (QUS) e densitometria a doppio raggio-X (DXA).

- l'omeostasi fosfo-calcica (calcio, fosforo, magnesio, fosfatasi alcalina e paratormone), i metaboliti della vitamina D [25-OH-D e 1,25(OH)<sub>2</sub>D] e gli indici biochimici del *turnover* osseo (osteocalcina, procollagene I e telopeptidi del collagene I).

I dati densitometrici ottenuti sono stati correlati con il grado di forza muscolare, valutata tramite *Medical Research Council* (MRC), con il grado di funzionalità motoria e con la capacità di resistenza al cammino, valutati rispettivamente mediante l'impiego di recenti e specifiche scale funzionali validate sulla popolazione distrofinopatica; *North Star Ambulatory Assessment* (NSAA) e *6 Minute Walk Test* (6MWT).

Queste scale, NSAA e 6MWT, recentemente introdotte, sono ritenuti strumenti sensibili nella discriminazione delle abilità motorie all'interno della popolazione distrofinopatica.

A conferma della sensibilità nella capacità di discriminazione del grado di compromissione delle abilità motorie all'interno del nostro campione, abbiamo riscontrato alle scale funzionali (*NSAA*, *6MWT*) valori significativamente più elevati nei pazienti affetti da distrofia muscolare di Becker rispetto a quelli affetti da distrofia muscolare di Duchenne; i risultati sono in accordo con il diverso grado di compromissione funzionale presente tra le due forme cliniche (DMB vs DMD).

Per quanto riguarda lo studio dello stato minerale osseo, dal nostro studio è emerso che i pazienti affetti da distrofinopatie hanno una riduzione dello stato minerale osseo soprattutto a carico degli arti inferiori e che l'entità della riduzione dello stato minerale osseo varia in rapporto alla malattia e alla sede di valutazione. Per quanto riguarda la patologia è risultato che i pazienti affetti da DMB mostravano una riduzione dei valori di densità minerale ossea solo a carico del collo femorale mentre i pazienti affetti da DMD avevano una riduzione a livello del collo femorale, delle vertebre lombari e del corpo in toto. I pazienti con DMD presentavano inoltre una riduzione dei valori di BTT a carico delle falangi prossimali della mano, espressione di un alterato stato minerale osseo. Nei pazienti DMB il parametro densitometrico BTT non mostrava valori ridotti rispetto alla norma probabilmente per una minore compromissione dello stato minerale osseo nel paziente Becker rispetto al paziente Duchenne, soprattutto in rapporto alla diversa compromissione muscolare.

Questi dati indicano che il coinvolgimento osseo è maggiore nei pazienti affetti da DMD rispetto a quelli affetti da DMB, nonostante le competenze funzionali motorie dei pazienti DMD del nostro campione durante lo studio non fossero ancora molto compromesse; infatti, i pazienti DMD esaminati nel nostro studio, erano tutti ancora deambulanti ad eccezione di un caso pz. n° 8; Tabella 6). Questi risultati potrebbero suggerire che il danno

a carico dello stato minerale osseo è precoce nei pazienti con DMD e che coinvolge tutto lo scheletro.

I nostri risultati ottenuti nei pazienti DMD sono in accordo con i primi studi sulla densità minerale ossea nel DMD di Larson e Henderson <sup>(70)</sup> e di Aparicio et al. <sup>(71)</sup>, che hanno dimostrato in soggetti DMD deambulanti una riduzione della massa minerale ossea, soprattutto a livello femorale. E' stata inoltre evidenziata una riduzione della densità minerale ossea a livello femorale anche nel gruppo di pazienti affetti da distrofia Becker, ma a differenza dei pazienti affetti da distrofia Duchenne, non si accompagnava ad una riduzione della densità minerale ossea vertebrale, del corpo in toto e dei parametri QUS. La riduzione della densità minerale ossea a livello femorale nel gruppo dei pazienti affetti da DMB, che quindi non presentano significative limitazioni funzionali dal punto di vista motorio, potrebbe essere legata alla riduzione della forza muscolare a livello del cingolo pelvico, dove il deficit di forza è in questa forma la caratteristica saliente. A sostegno di tale ipotesi, come già dimostrato in un lavoro di Bianchi et al. <sup>(72)</sup> e di Soldepalm et al. <sup>(88)</sup>, anche nel nostro campione abbiamo trovato una correlazione tra valori di BMD, forza e funzionalità motoria. In particolare nel nostro campione abbiamo osservato una correlazione tra densità minerale ossea femorale (F-BMD) e forza muscolare (*Medical Research Council*, MRC), tra densità minerale ossea femorale (F-BMD) e vertebrale (L-BMD) e *North Star Ambulatory Assessment* (NSAA), tra densità minerale ossea vertebrale (L-BMD) e *Six Minute Walk Test* (6MWT) ed infine tra densità minerale ossea del corpo in toto (TB-BMD) e NSAA e tra densità minerale ossea femorale (F-BMD) e 6MWT. Non è stata invece riscontrata una correlazione tra parametri densitometrici e tempo di passaggio dalla posizione supina alla statica eretta.

Tali dati suggeriscono che il mantenimento della capacità di deambulazione ha degli effetti positivi sullo stato minerale osseo, soprattutto a livello femorale. Inoltre indicano

che, nonostante il mantenimento della capacità di deambulazione, la riduzione nel tempo delle abilità motorie, valutate attraverso la scala NSAA, ha degli effetti negativi sull'acquisizione della massa ossea non soltanto a livello femorale, ma anche a livello vertebrale e del corpo in toto. Emerge quindi da questi risultati che nei nostri pazienti i valori di BMD sembrerebbero prevalentemente influenzati dalla funzionalità motoria, confermando l'ipotesi che riconduce la riduzione della BMD alla progressiva riduzione della stenia e della mobilità muscolare <sup>(47)</sup>. La mancata correlazione tra il tempo di passaggio dalla posizione supina alla statica eretta e parametri densitometrici, potrebbe a nostro avviso, essere influenzata dal ricorso, da parte del paziente ad un compenso funzionale durante l'esecuzione della prova.

I risultati confermano le conoscenze sugli effetti positivi che la forza e la massa muscolare hanno nell'acquisizione della massa ossea durante l'età evolutiva <sup>(47)</sup> e sugli effetti negativi che le patologie osteo-muscolari hanno su tale processo <sup>(47)</sup>, determinando la *c.d.* "osteoporosi da scarso uso". Tale condizione, spesso ingravescente, determina una riduzione della massa ossea che si associa a fratture patologiche anche per trauma minimo. Nei nostri pazienti DMD 2 su 10 avevano presentato fratture per lievi traumi e questi due pazienti avevano valori densitometrici francamente ridotti.

La comparazione dei nostri risultati con quelli riportati dallo studio di Bianchi et al. <sup>(72)</sup> ha messo in evidenza una minore compromissione della densità minerale ossea vertebrale (L-BMD) e la mancanza di una correlazione tra la dose cumulativa di corticosteroidi, espressa in mg totali, e riduzione della BMD, e tra valori di BMD e durata della terapia in mesi. Queste differenze potrebbero essere dovute, almeno in parte, i) alle dimensioni del campione che probabilmente influenza la significatività statistica della correlazione relativa all'uso dei corticosteroidi; ii) al diverso macchinario DXA utilizzato e iii) al diverso grado di insufficienza muscolare dei pazienti esaminati.

Per quanto riguarda i parametri auxologici non abbiamo osservato differenze significative tra i pazienti DMB e quelli DMD per peso e BMI, mentre era evidente una differenza significativa per la statura che risultava minore nei pazienti DMD. Una causa possibile della ridotta statura nei pazienti DMD potrebbe essere la maggiore severità della patologia muscolare, anche se i meccanismi di tale processo non sono noti, piuttosto che il trattamento corticosteroidico in quanto sia nel nostro lavoro che in quello di Bianchi et al non è evidenziata una correlazione tra statura e corticosteroidi.

A riguardo dei parametri principali della omeostasi fosfo-calcica si è evidenziato che sia i pazienti DMB che DMD hanno normali valori circolanti di calcio, fosforo, magnesio e fosfatasi alcalina e non mostrano differenze tra i due gruppi ad eccezione dei valori di fosfatasi alcalina che risultano più bassi nei pazienti DMD. Questo risultato potrebbe essere dovuto, almeno in parte, alla minore statura e alla maggiore compromissione del processo di formazione ossea presente nei pazienti DMD rispetto ai pazienti DMB. Anche i valori di PTH risultano nei limiti della norma in tutti i pazienti, tranne in un soggetto con DMD che mostra livelli francamente elevati (117 pg/ml). Tali valori sono espressione di un iperparatiroidismo secondario a deficit di vitamina D (10.1 ng/ml) che consente il mantenimento di una normocalcemia (9.2 mg/dl). Ciò suggerisce che alcuni pazienti con DMD possono sviluppare un danno osseo non solo in termini di riduzione della massa ossea ma anche di una riduzione della mineralizzazione della cartilagine di crescita, che rappresenta il prodromo del rachitismo da deficit di vitamina D. I valori medi di 1,25(OH)<sub>2</sub>D risultano nei limiti della norma in tutti i pazienti DMB/DMD. In 3 pazienti DMD i livelli di 1,25(OH)<sub>2</sub>D risultano lievemente ridotti non in maniera significativa.

Lo stato vitaminico D, valutato mediante la misurazione dei livelli circolanti di 25-OH-D, è risultato ridotto in tutti i pazienti, tranne in uno del gruppo DMB, indipendentemente dalla assunzione di corticosteroidi. Questo dato è piuttosto rilevante perché mette in

evidenza che i pazienti affetti da distrofinopatie sono soggetti a rischio di ipovitaminosi D indipendentemente dal trattamento corticosteroideo. La causa principale di ipovitaminosi D potrebbe essere probabilmente riconducibile ad una ridotta esposizione solare che determina una diminuita sintesi di vitamina D, tuttavia tale asserzione resta da dimostrare in quanto lo studio attuale non prevedeva la stima dell'esposizione solare nei mesi precedenti all'inizio dello studio stesso. Inoltre le valutazioni sono state effettuate durante il periodo invernale nel quale, alle nostre latitudini, non avviene una sufficiente fotosintesi di vitamina D<sub>3</sub> per carente disponibilità di raggi UV-B (290-315 nm) che sono quelli deputati alla sintesi cutanea della vitamina D<sub>3</sub><sup>(89)</sup>. E' quindi possibile che i pazienti abbiano manifestato una progressiva diminuzione dello stato vitaminico D fino a raggiungere una condizione di ipovitaminosi D durante il periodo dello studio. Tale risultato indica inoltre che i pazienti affetti da distrofinopatie necessitano di una supplementazione con vitamina D che potrebbe essere di maggior beneficio, se continuativa. Tutti i pazienti con ipovitaminosi D sono stati inseriti in un protocollo di supplementazione che prevede l'assunzione di 25,000 UI/mese vitamina D.

Non essendoci unanimità di intenti sul dosaggio suppletivo<sup>(64, 67)</sup>, i risultati della supplementazione con vitamina D saranno valutati in un campione ampliato e per un periodo di tempo prolungato allo scopo di individuare i dosaggi più appropriati per il mantenimento di un normale stato vitaminico D nei pazienti affetti da distrofinopatia alla nostra latitudine.

Non è stata trovata nessuna correlazione tra stato vitaminico D e parametri densitometrici, né tra stato vitaminico D e trattamento corticosteroideo, sia in termini di dose (mg) che in termini di durata della terapia (mesi). Tuttavia, il limitato numero dei pazienti esaminati potrebbe avere influenzato la significatività delle correlazioni pur essendo alcuni valori di  $r$  di media entità.

L'ipovitaminosi D, determinando una riduzione delle concentrazioni di calcio e di fosforo, potrebbe determinare una riduzione della densità minerale ossea secondaria all'attività osteoclastica mediata dall'aumento del PTH indotto dall'ipovitaminosi D <sup>(65)</sup>. Alcuni studi hanno inoltre suggerito che una condizione di ipovitaminosi D può associarsi alla debolezza e a riduzione del tono muscolare <sup>(66, 90)</sup>; effetti sicuramente negativi per i pazienti affetti da distrofinopatia e pertanto da evitare.

Lo studio degli indici biochimici del *turnover* osseo non ha messo in evidenza significative alterazioni del processo di formazione ossea (osteocalcina e propeptide N-terminale del procollagene tipo I) e del processo di riassorbimento osseo (telo peptide del collagene tipo I) nei pazienti esaminati. Nel confronto tra i pazienti affetti da DMB e quelli affetti da DMD non sono state riscontrate differenze significative; tuttavia, si registra la tendenza nei pazienti affetti da DMD a presentare valori più bassi di osteocalcina e PINP. Tali risultati non consentono quindi di identificare variazioni del turnover osseo in questi pazienti, almeno con l'impiego dei parametri utilizzati ma Rufo et al. <sup>(78)</sup> e Bianchi et al. <sup>(72)</sup>, con una batteria di markers più ampia, hanno trovato valori urinari aumentati di NTX (telo peptide N-terminale del procollagene tipo I) in pazienti DMD, che riflette un aumentato processo di riassorbimento osseo.

## Capitolo 11

### 11. Conclusioni

Dai nostri risultati emerge che:

- i pazienti DMB e DMD hanno una ridotta densità minerale ossea a carico del collo femorale.
- i pazienti DMD, ma non quelli DMB, mostrano una riduzione della densità minerale ossea anche a livello delle vertebre lombari, del corpo e delle falangi prossimali della mano. Quest'ultima sede scheletrica può essere misurata anche nei bambini molto piccoli con tecnica ultrasonografica (senza esposizione a raggi-X) che non necessita di una eccessiva collaborazione del paziente.
- è presente una correlazione positiva tra i parametri densitometrici ossei e la forza e tra i parametri densitometrici ossei e la funzionalità motoria, misurata con specifiche scale di *outcome* per le distrofinopatie (*NSAA, 6MWT*).
- non è stata trovata alcuna correlazione tra parametri densitometrici e dose cumulativa di corticosteroidi, espressa in mg totali, o durata della terapia, espressa in mesi.
- tutti i pazienti, sia DMB che DMD, mostrano una ipovitaminosi D che potrebbe influenzare negativamente l'acquisizione della massa ossea e il tono muscolare.

Pertanto le considerazioni e le riflessioni effettuate suggeriscono che è:

- opportuno un controllo periodico (almeno annuale) dello stato minerale osseo mediante metodiche densitometriche in tutti i pazienti con distrofinopatie indipendentemente dal trattamento corticosteroidico, anche in epoca precoce
- opportuno un controllo periodico (almeno semestrale) dello stato vitaminico D e dei parametri del metabolismo fosfo-calcico in tutti i pazienti con distrofinopatie a partire dall'epoca della diagnosi.
- necessario supplementare con vitamina D tutti i pazienti con distrofinopatie che mostrano una condizione di ipovitaminosi D.
- necessario garantire un normale stato vitaminico D in tutti i pazienti con distrofinopatie (supplementazione continuativa).

In conclusione, il nostro studio, pur con caratteristiche di progetto ancillare, ha concorso all'ampliamento dei dati di letteratura, specie a quelli relativi alla popolazione DMB e suggerisce l'impiego della *NSAA* e del *6MWT* come possibile strumento di *follow-up* e di *outcome* anche sullo stato minerale osseo.

Tuttavia nonostante l'importante influenza che la funzionalità motoria dimostra nell'acquisizione e nel mantenimento dello stato minerale osseo; il precoce coinvolgimento osseo che si verifica nelle distrofinopatie, specie nella DMD, potrebbe verosimilmente essere determinato dalla combinazione di diversi fattori tra cui la riduzione progressiva della mobilità e della stenia, il trattamento corticosteroidico ed ancora l'azione di markers infiammatori, citochine o fattori legati a polimorfismi genici. A tale proposito, recenti acquisizioni su modello animale mutato per DMD (topi mdx) hanno evidenziato come l'interessamento osseo possa essere ancor più precoce della

manifestazione clinica della malattia e pertanto non strettamente legata a fattori legati alla forza o al trattamento con corticosteroidi ipotizzando che alla base del meccanismo patogenetico possa esserci un difetto di mineralizzazione e di organizzazione della matrice extracellulare, ed in particolare del collagene e dei proteoglicani <sup>(77)</sup>, legato a fattori genetici e biochimici. A supporto di tale ipotesi un recente lavoro di Rufo et al <sup>(78)</sup>, condotto su pazienti DMD e su topi mdx a confronto, ha riportato, in entrambi i campioni, elevati valori di IL-6, una citochina infiammatoria, nota per la sua attività osteoclastica <sup>(78)</sup> che potrebbe pertanto contribuire sensibilmente alla perdita di massa ossea nei gruppi affetti. Questi risultati suggeriscono che il danno osseo osservato nei pazienti affetti da distrofinopatie possa essere dovuto ad un disaccoppiamento tra l'attività osteoblastica ed osteoclastica mediato da uno squilibrio tra citochine e regolatori locali. Questa ipotesi, se confermata, aprirebbe nuove prospettive terapeutiche e individuierebbe nel DMD/DMB uno specifico fenotipo osseo.

Saranno necessari, dunque, ulteriori studi rivolti a chiarire il processo patogenetico alla base dell'interessamento osseo nelle distrofinopatie allo scopo di affinare le conoscenze sul contributo che fattori biochimici, genetici e iatrogeni svolgono sullo sviluppo di osteoporosi nel DMD <sup>(92)</sup> sugli indici di interessamento precoce e di prevenzione.

## Capitolo 12

### 12. Bibliografia

1. Dubowitz V. *Muscle Disorders in Childhood*. Led W.B. Saunders Company Londra 1995.
2. Kaplan, Muscle Gene Table, www. musclegenetable.org in *Neuromuscular Disorders* 21 (2011) 833-861
3. Monisha Mukherjee, L. S. Chaturvedi, Sandhya Srivastava, R. D. Mittal, and Balraj Mittal "De novo mutations in sporadic deletional Duchenne muscular dystrophy (DMD) cases. *Experimental and molecular medicine*" Vol. 35, No. 2, 113-117, April 2003
4. Martinez HR, Pignatelli R, Belmont JW, Craigen WJ, Jefferies JL. "Childhood onset of left ventricular dysfunction in a female manifesting carrier of muscular dystrophy" *Issue Am J Med Genet A*. 2011 Dec;155A(12):3025-9.
5. Yan et al 2004, Dent et al 2005, Prior & Bridgeman 2005 Takeshima Y, Yagi M, Okizuka Y, Awano H, Zhang Z, Yamauchi Y, Nishio H, Matsuo M. "Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center". *J Hum Genet*. 2010;55:379-88.
6. Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, Soltanzadeh P, Gappmaier E, Howard MT, Sampson JB, Mendell JR, Wall C, King WM, Pestronk A, Florence JM, Connolly AM, Mathews KD, Stephan CM, Laubenthal KS, Wong BL, Morehart PJ, Meyer A, Finkel RS, Bonnemann CG, Medne L, Day JW, Dalton JC, Margolis MK, Hinton VJ. "Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort". *Hum Mutat*. 2009;30:1657-66
7. Hofstra RM, Mulder IM, Vossen R, de Koning-Gans PA, Kraak M, Ginjaar IB, van der Hout AH, Bakker E, Buys CH, van Ommen GJ, van Essen AJ, den Dunnen JT. "DGGE-based whole-gene mutation scanning of the dystrophin gene in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients". *Hum Mutat*. 2004;23:57-66
8. Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, Soltanzadeh P, Gappmaier E, Howard MT, Sampson JB, Mendell JR, Wall C, King WM, Pestronk A, Florence JM, Connolly AM, Mathews KD, Stephan CM, Laubenthal KS, Wong BL, Morehart PJ, Meyer A, Finkel RS, Bonnemann CG, Medne L, Day JW, Dalton JC, Margolis MK, Hinton VJ. "Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort" *Hum Mutat*. 2009;30:1657-66.
9. Artsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT. "Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule". *Muscle Nerve*. 2006b;34:135-44.
10. Deburgrave N, Daoud F, Llense S, Barbot JC, Récan D, Peccate C, Burghes AH, Bérout C, Garcia L, Kaplan JC, Chelly J, Leturcq F "Protein- and mRNA-based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene". *Hum Mutat*. 2007 Feb;28(2):183-95.
11. Taylor PJ, Betts GA, Maroulis S, Gilissen C, Pedersen RL, Mowat DR, Johnston HM, Buckley MF. "Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy". *PLoS One*. 2010 Jan 20;5(1):e8803.
12. Ervasti JM, Campbell KP. "Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex". *Cell* 1991;66:1121-31
13. David G. Allen "Duchenne muscular dystrophy – What causes the increased membrane permeability in skeletal muscle?" *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* Vol: 43 Issue: 3, March, 2011 pp: 290-294
14. Allen D.G., Gervasio O.L., Yeung E.W., Whitehead N.P. "Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy" *J Physiol Pharmacol*, Volume: 88, (2010), pp. 83-91
15. Gorospe JR, Hoff man EP. "Duchenne muscular dystrophy". *Curr Opin Rheumatol* 1992; 4: 794-800.
16. Bushby K, Connor E. "Clinical outcome measures for trials in Duchenne muscular dystrophy: report from International Working Group meetings". *Clin Investig (Lond)*. 2011 Sep;1(9):1217-1235.
17. Hermans MC, Pinto YM, Merkies IS, de Die-Smulders CE, Crijns HJ, Faber CG. "Hereditary muscular dystrophies and the heart". *Neuromuscul Disord*. 2010;20:479-92.

18. Wicksell RK, Kihlgren M, Melin L, Eeg-Olofsson O. "Specific cognitive deficits are common in children with Duchenne muscular dystrophy". *Dev Med Child Neurol.* 2004;46:154–9
19. Hendriksen JG, Vles JS. "Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder". *J Child Neurol.* 2008;23:477–81.
20. Katharine Bushby, Richard Finkel, David J Birnkrant, Laura E Case, Paula R Clemens, Linda Cripe, Ajay Kaul, Kathi Kinnett, Craig McDonald, Shree Pandya, James Poysky, Frederic Shapiro, Jean Tomezsko, Carolyn Constantin, for the DMD Care Considerations Working Group. "Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management" [www.thelancet.com/neurology](http://www.thelancet.com/neurology) Published online November 30, 2009
21. Yazaki M, Yoshida K, Nakamura A, Koyama J, Nanba T, Ohori N, Ikeda S. "Clinical characteristics of aged Becker muscular dystrophy patients with onset after 30 years". *Eur Neurol.* 1999;42:145–9
22. Melacini P, Fanin M, Danieli GA, Villanova C, Martinello F, Miorin M, Freda MP, Miorelli M, Mostacciuolo ML, Fasoli G, Angelini C, Dalla Volta S. "Myocardial involvement is very frequent among patients affected with subclinical Becker's muscular dystrophy". *Circulation.* 1996;94:3168–75.
23. Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. "Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy". *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 1: CD003725,
24. Moxley RT 3rd, Ashwal S, Pandya S, et al. "Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society". *Neurology* 2005; 64: 13–20.
25. Angelini C. "The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal". *Muscle Nerve* 2007; 36: 424–35.
26. Houde S, Filiatrault M, Fournier A, et al. "Deflazacort use in Duchenne muscular dystrophy: an 8-year follow-up". *Pediatr Neurol* 2008; 38: 200–06
27. King WM, Ruttencutter R, Nagaraja HN, et al. "Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy". *Neurology* 2007; 68: 1607–13. 62
28. Biggar WD, Harris VA, Eliasoph L, Alman B. "Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade". *Neuromuscul Disord* 2006; 16: 249–55
29. Markham LW, Kinnett K, Wong BL, Woodrow Benson D, Cripe LH. "Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy". *Neuromuscul Disord.* 2008 May;18(5):365-70. Epub 2008 Apr 23.
30. Moxley RT 3rd, Ashwal S, Pandya S, Connolly A, Florence J, Mathews K, Baumbach L, McDonald C, Sussman M, Wade C; "Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology; Practice Committee of the Child Neurology Society."Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society". *Neurology.* 2005 Jan 11;64(1):13-20.
31. Bonifati MD, Ruzza G, Bonometto P, Berardinelli A, Gorni K, Orcesi S, Lanzi G, Angelini C. "A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne Muscular dystrophy". *Muscle Nerve.* 2000 Sep;23(9):1344-7.
32. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C. "DMD Care Considerations Working Group; Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management". *Lancet Neurol.* 2010a;9:77–93.
33. Kinali M et al. "Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study". *Lancet Neurol.* (2009)
34. Arechavala-Gomez V, Anthony K, Morgan J, Muntoni F. "Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping for duchenne muscular dystrophy: progress and challenges". *Curr Gene Ther.* 2012 Jun 1;12(3):152-60.
35. Beytia Mde L, Vry J, Kirschner J. "Drug treatment of Duchenne muscular dystrophy: available evidence and perspectives". *Acta Myol.* 2012 May;31(1):4-8.

36. Meregalli M, Farini A, Colleoni F, Cassinelli L, Torrente Y. "The role of stem cells in muscular dystrophies". *Curr Gene Ther*. 2012 Jun 1;12(3):192-205.
37. Mercuri E, Mayhew A, Muntoni F, Messina S, Straub V, Van Ommen GJ, Voit T, Bertini E, Bushby K; TREAT-NMD Neuromuscular Network. "Towards harmonisation of outcome measures for DMD and SMA within TREAT-NMD; report of three expert workshops: TREAT-NMD/ENMC workshop on outcome measures, 12th--13th May 2007, Naarden, The Netherlands; TREAT-NMD workshop on outcome measures in experimental trials for DMD, 30th June--1st July 2007, Naarden, The Netherlands; conjoint Institute of Myology TREAT-NMD meeting on physical activity monitoring in neuromuscular disorders, 11th July 2007, Paris, France." *Neuromuscul Disord*. 2008 Nov;18(11):894-903.
38. Beenakker EA, Maurits NM, Fock JM, Brouwer OF, van der Hoeven JH. "Functional ability and muscle force in healthy children and ambulant Duchenne muscular dystrophy patients." *Eur J Paediatr Neurol* 2005; 9: 387-93.
39. Scott OM, Hyde SA, Goddard C, Dubowitz V. "Quantitation of muscle function in children: a prospective study in Duchenne muscular dystrophy". *Muscle Nerve*. 1982;5:291-301
40. Scott E, Eagle M, Mayhew A, Freeman J, Main M, Sheehan J, Manzur A, Muntoni F; The North Star Clinical Network for Paediatric Neuromuscular Disease "Development of a Functional Assessment Scale for Ambulatory Boys with Duchenne Muscular Dystrophy" *Neuromuscul Disord*. 2009 Jul;19(7):458-61.
41. Mazzone ES, Messina S, Vasco G, Main M, Eagle M, D'Amico A, Doglio L, Politano L, Cavallaro F, Frosini S, Bello L, Magri F, Corlatti A, Zucchini E, Brancalion B, Rossi F, Ferretti M, Motta MG, Cecio MR, Berardinelli A, Alfieri P, Mongini T, Pini A, Astrea G, Battini R, Comi G, Pegoraro E, Morandi L, Pane M, Angelini C, Bruno C, Villanova M, Vita G, Donati MA, Bertini E, Mercuri E. "Reliability of the North Star Ambulatory Assessment in a multicentric setting" *Neuromuscul Disord*. 2009 Jul;19(7):458-61.
42. McDonald CM, Henricson EK, Han JJ, Abresch RT, Nicorici A, Elfring GL, Atkinson L, Reha A, Hirawat S, Miller LL *Neuromuscul Disord*. "The 6-minute walk test as a new outcome measure in Duchenne muscular dystrophy". *Muscle Nerve*. 2010 Apr;41(4):500-10.
43. Mazzone E, Martinelli D, Berardinelli A, Messina S, D'Amico A, Vasco G, Main M, Doglio L, Politano L, Cavallaro F, Frosini S, Bello L, Carlesi A, Bonetti AM, Zucchini E, De Sanctis R, Scutifero M, Bianco F, Rossi F, Motta MC, Sacco A, Donati MA, Mongini T, Pini A, Battini R, Pegoraro E, Pane M, Pasquini E, Bruno C, Vita G, de Waure C, Bertini E, Mercuri E. "North Star Ambulatory Assessment, 6-minute walk test and timed items in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy" *Neuromuscul Disord*. 2010 Nov;20(11):712-6.
44. Mazzone ES, Vasco G, Palermo C, Bianco F, Galluccio C, Ricotti V, Castronovo AD, Mauro MS, Pane M, Mayhew A, Mercuri E. "A critical review of functional assessment tools for upper limbs in Duchenne muscular dystrophy" *Dev Med Child Neurol*. 2012 Jun 19.
45. Einhorn TA. "The bone organ system: form and function". San Diego, CA: Academic Press; 1996.
46. Rauch F, Travers R, Glorieux FH "Cellular activity on the seven surfaces of iliac bone: a histomorphometric study in children and adolescents". *J Bone Miner Res* (2006) 21:513-519
47. Rizzoli R, Bianchi ML, Garabedian M, McKay HA, Moreno LA "Maximizing bone mineral mass gain during growth for the prevention of fractures in the adolescents and the elderly." *Bone* 46:294-305 (2010)
48. Bonjour JP, Theintz G, Law F, Slosman D, Rizzoli R. "Peak bone mass". *Osteoporos Int* 1994;4 (Suppl 1):7-13.12.
49. Montagnani A, Gonnelli S, Cepollaro C, Mangeri M, Monaco R, Bruni D, Gennari C. "Quantitative ultrasound at the phalanges in healthy Italian men". *Osteoporos Int*. 2000;11(6):499-504
50. Ferrari S "Human genetics of osteoporosis". *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22:723-735 (2008)
51. Bailey D A, Mc Kay HA , Mirwald RL , Crocker PR , Faulkner RA ." A six- year longitudinal study of the relationship of physical activity to bone mineral accrual in growing children: the university of Saskatchewan bone mineral accrual study". *J Bone Miner Res* 1999;14:1672 -9
52. Baim S, Binkley N, Bilezikian JP, Kendler DL, Hans DB, Lewiecki EM, Silverman S (2008) "Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Position Development Conference". *J Clin Densitom* 11:75-9
53. Baroncelli GI, Bertelloni S, Sodini F, Saggese G.; "Osteoporosis in children and adolescents: etiology and management". *Paediatr Drugs*. 2005;7(5):295-323.
54. Bianchi ML "Osteoporosis in children and adolescents". *Bone*. 2007 Oct;41(4):486-95.

55. Giampiero I. Baroncelli, Francesco Vierucci, Silvano Bertelloni "Gestione clinica del bambino con ridotta massa ossea". ©2011, Editrice Kurtis
56. Baroncelli GI. "Quantitative ultrasound methods to assess bone mineral status in children: technical characteristics, performance, and clinical application". *Pediatr Res* 2008; 63: 220-228
57. G.I. Baroncelli, S. Bertelloni, F. Vierucci. "Ultrasuonografia ossea falangea. La valutazione dello stato minerale osseo in pediatria" *Il Pediatra* Nov.2009.
58. Baroncelli GI, Federico G, Bertelloni S, et al. "Assessment of bone quality by quantitative ultrasound of proximal phalanges of the hand and fracture rate in children and adolescents with bone and mineral disorders". *Pediatr Res* 2003; 54: 125-136
59. Baroncelli GI, Bertelloni S, Vierucci F. "Misurazione della massa ossea in pediatria. In: *Osteoporosi e malattie metaboliche dell'osso. Clinica e diagnostica*", 2° Edizione. C.V. Albanese, R. Passariello ed., Springer Italia, 2009, pp. 429-436
60. Njeh CF, Shaw N, Gardner-Medwin JM, et al. "Use of quantitative ultrasound to assess bone status in children with juvenile idiopathic arthritis". *J Clin Densitom* 2000;3:251-60.
61. Bianchi ML. "How to manage osteoporosis in children". *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005;19:991-1005.
62. Holick MF. "Resurrection of vitamin D deficiency and rickets". *J Clin Invest*. 2006; 116 (8):2062-7
63. Russel RG Espina B, Hulley P. "Bone biology and the pathogenesis of osteoporosis." *Curr Opin Rheumatol*. 2006; 18 Suppl 1:S3-10
64. Wagner CL, Greer FR; "American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. *Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents*". *Pediatrics* 2008; 122: 1142-1152
65. Holick MF 2006, "High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health". *Mayo Clin Proc* 81: 245-254
66. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. "Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes". *Am J Clin Nutr* 2006;84:18-28
67. Pornpoj Pramy othin, Michael F. Holick. "Vitamin D supplementation: guidelines and evidence for subclinical deficiency" *Curr Opin Gastroenterol* 2012, 28:13 9 – 15 0
68. Clark EM, Ness AR, Bishop NJ, Tobias JH. "Association between bone mass and fractures in children: a prospective cohort study". *J Bone Miner Res* 2006;21:1489-95
69. Van Staa TP, Leufkens HG, Cooper C. "The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis". *Osteoporos Int* 2002;13(10):777-87
70. Larson CM, Henderson RC "Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy". *J Pediatr Orthop* 20:71-74 (2000)
71. Aparicio LF, Jurkovic M, DeLullo J "Decreased bone density in ambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy". *J Pediatr Orthop* 22:179-181(2002)
72. Bianchi ML, Mazzanti A, Galbiati E, Saraifoger S, Dubini A, Cornelio F, et al. "Bone mineral density and bone metabolism in Duchenne muscular dystrophy". *Osteoporos Int* 2003; 14: 761-7.
73. Crabtree NJ, Roper H, McMurchie H, Shaw NJ "Regional changes in bone area and bone mineral content in boys with duchenne muscular dystrophy receiving corticosteroid therapy". *J Pediatr*. 2010 Mar;156(3):450-5.
74. R.Quinlivan, H.Roper, "Report of a Muscular Dystrophy Campaign funded workshop Birmingham, UK, January 16th 2004. *Osteoporosis in Duchenne muscular dystrophy; its prevalence, treatment and prevention*" *Neuromuscular Disorders* Volume 15, Issue 1 , Pages 72-79, January 2005
- 75 M.Davie, N.J.Shaw, J.McDonagh, K.Bushby; McDonald DG, Kinali M, Gallagher AC, et al. "Fracture prevalence in Duchenne muscular dystrophy". *Dev Med Child Neurol*. 2002;44(10):695-698
76. Söderpalm, Magnusson, Åhlander, Jón Karlsson, Krokmark, Tulinius "Bone mass development in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophies: a 4-year clinical follow-up". *Acta Paediatrica* Volume 101, Issue 4, pages 424-432, April 2012

77. Nakagaki WR, Bertran CA, Matsumura CY, Santo-Neto H, Camilli JA. "Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of mdx mice". *Bone*. 2011 Feb;48(2):372-9.
78. Anna Rufo, Andrea Del Fattore, Mattia Capulli, Francesco Carvello, Loredana De Pasquale, Serge Ferrari, Dominique Pierroz, Lucia Morandi, Michele De Simone, Nadia Rucci, Enrico Bertini, Maria Luisa Bianchi, Fabrizio De Benedetti, and Anna Teti "Mechanisms Inducing Low Bone Density in Duchenne Muscular Dystrophy in Mice and Humans". *J Bone Miner Res*. 2011 August; 26(8): 1891–1903. "
79. D.G. Leung, E.L. Germain-Lee, B.E. Denger f, K.R. "Wagner Report on the Second Endocrine Aspects of Duchenne Muscular Dystrophy Conference December 1–2, 2010, Baltimore, Maryland, USA" *Neuromuscular Disorders* 21 (2011) 594–601
- 80 R. Quinlivan, N. Shaw, K. Bushby "170th ENMC International Workshop: Bone protection for corticosteroid treated Duchenne muscular dystrophy. 27–29 November 2009, Naarden, The Netherlands" *Neuromuscular Disorders* 20 (2010) 761–769,
81. Baroncelli GI, Federico G, Vignolo M, Valerio G, del Puente A, Maghnie M, Baserga M, Farello G, Saggese G; Phalangeal Quantitative Ultrasound Group "Cross-sectional reference data for phalangeal quantitative ultrasound from early childhood to young-adulthood according to gender, age, skeletal growth, and pubertal development". *Bone*. 2006 Jul;39(1):159-73.
82. Njeh CF, Boivin CM, Langton CM 1997 "The role of ultrasound in the assessment of osteoporosis: a review". *Osteoporos Int* 7:7–22
83. [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_1171](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1171)
84. Kroger H, Kotaniemi A, Vainio P, Alhava E "Bone densitometry of the spine and femur in children by dual-energy x-ray absorptiometry". *Bone Miner* 17:75–85 1992
85. Baroncelli GI, Saggese G 2000 "Critical ages and stages of puberty in the accumulation of spinal and femoral bone mass: the validity of bone mass measurements". *Horm Res* 51(suppl 1):2–8)
- 86 Kroger H, Vainio P, Nieminen J, Kotaniemi A "Comparison of different models for interpreting bone mineral density measurements using DXA and MRI technology". *Bone* 17:157–159, 1995.
87. Boot AM, De Ridder MAJ, Pols HAP, Krenning EP, De Muinck Keizer-Schrama SMPF 1997 Keizer-Schrama SMPF "Bone mineral density in children and adolescents: relation to puberty, calcium intake, and physical activity". *J Clin Endocrinol Metab* 82:57–62; 1997
88. Söderpalm AC, Magnusson P, Åhlander AC, Karlsson J, Kroksmark AK, Tulinius M, Swolin-Eide D.. "Bone mass development in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophies: a 4-year clinical follow-up". *Acta Paediatr*. 2012 Apr;101(4):424-32
89. Saggese G, Baroncelli GI, Bertelloni S, Webb S, Holic k MF. "Effetto delle stagioni sulla sintesi della vitamina D3 a 43° latitudine Nord". *Riv Ital Pediatr* 1992; 18: 30-36.
90. Holick MF. "Vitamin D deficiency". *N Engl J Med* 2007; 357: 266-281
91. Baroncelli GI, Battini R, Bertelloni S, Brunori E, de Terlizzi F, Vierucci F, Cipriani P, Cioni G, Saggese G. "Analysis of quantitative ultrasound graphic trace and derived variables assessed at proximal phalanges of the hand in healthy subjects and in patients with cerebral palsy or juvenile idiopathic arthritis. A pilot study". *Bone*. 2010 Jan;46(1):182-9. ù
92. Bachrach LK "Taking steps towards reducing osteoporosis in Duchenne muscular dystrophy" *Neuromuscul Disord*. 2005 Jan;15(1):86-7.