

## **A Riccardo, Monica e Francesco**

“Ho la sensazione di essere un esperimento,  
ed è esattamente come un esperimento che mi pare di sentirmi;  
sto per giungere alla conclusione che è proprio questo ciò che sono-  
un esperimento; un semplice esperimento, nient'altro di più”

“Il diario di Eva” di Mark Twain



**Università di Pisa**

**Facoltà di Farmacia**

**Corso di Laurea Specialistica in Farmacia**

*Tesi di Laurea*

**Polimorfismi genetici del recettore estrogeno- $\alpha$ , di  
aromatasi e AKT-1 e suscettibilità all' osteonecrosi da  
acido zoledronico nei pazienti oncologici**

**Candidata**

**Elisa Paolicchi**

**Relatore**

**Chiar.mo Prof. Romano Danesi**

**Anno Accademico 2008/2009**

# Indice

Indice.....	3
Riassunto.....	4
Premessa.....	5
<b>Capitolo 1.....</b>	<b>8</b>
1.1 I Bifosfonati.....	8
1.2 Caratteristiche farmacologiche.....	13
1.2.1 La Farmacodinamica.....	13
- Non ammino BPs .....	14
- Ammino BPs .....	15
1.2.2 La Farmacocinetica.....	21
- Non ammino-BPs .....	23
- Ammino BPs .....	24
1.3 Effetti avversi dei bifosfonati.....	25
1.3.1 BPs a somministrazione orale.....	25
1.3.2 BPs ad infusione intravenosa.....	25
<b>Capitolo 2.....</b>	<b>30</b>
2.1 Fisiopatologia delle metastasi ossee.....	30
2.1.1 Formazione delle metastasi ossee.....	31
2.1.2 Osteolisine prodotte dalle cellule tumorali.....	31
- Parathyroid Hormone-Related Peptide.....	31
- Prostaglandine.....	32
- Transforming growth factor- $\alpha$ .....	32
- Catepsina D .....	32
2.1.3 Agenti osteolitici prodotti dalle cellule stromali.....	32
- Interleuchina-1 .....	32

- Fattore di necrosi tumorale e linfotossina .....	33
- Interleuchina-6 .....	33
2.1.4 Peptidi regolatori della crescita prodotti dalle cellule ossee e dalle cellule tumorali.....	33
- Fattore di crescita trasformante $\beta$ .....	33
- Fattore di crescita piastrino-derivato.....	34
- Fattore di crescita insulinico .....	34
2.2.I BPs nella terapia delle metastasi ossee.....	34
<b>Capitolo 3.....</b>	<b>39</b>
3.1.L'osteonecrosi dei mascellari.....	39
3.2.La Phossy jaw.....	40
3.3.l'osteonecrosi dei mascellari e dei BPs.....	42
3.3.1.L'epidemiologia.....	44
3.3.2. I fattori dirischio.....	46
- Fattori di rischio sistemici .....	46
- Fattori di rischio locali .....	47
3.3.3.La patogenesi.....	47
3.3.4.L'aspetto istologico.....	51
3.3.5.Gli aspetti clinici.....	54
- Piccole lesioni intra-orali .....	56
- Grandi lesioni intra-orali .....	57
- Grandi lesioni con interessamento dei tessuti extra-orali .....	59
3.3.6.La diagnostica per immagini.....	61
- Tecniche di analisi morfologica .....	61
- Tecniche di analisi metabolica .....	64
3.3.7La prevenzione dell'osteonecrosi dei mascellari.....	65
- Pazienti in attesa intraprendere terapia con BPs .....	66
- Pazienti in terapia con BPs senza evidenza di ONJ .....	67

3.3.8. La gestione e la terapia dell'osteonecrosi dei mascellari.....	68
<b>Capitolo 4.....</b>	<b>76</b>
4.1. Razionale della sperimentazione.....	76
4.2. Ipotesi di studio.....	81
4.3. Obiettivo dello studio.....	82
4.4. Materiali e Metodi.....	82
4.4.1. Disegno della sperimentazione.....	82
4.4.2. Screening.....	84
4.4.3. Criteri di inclusione.....	84
4.4.4. Criteri di esclusione.....	84
4.4.5. Protocollo Sperimentale.....	85
- Inclusione .....	85
- Estrazione del DNA .....	85
- PCR-real time .....	86
- Conservazione dei campioni di DNA .....	90
4.4.6. Analisi statistica.....	90
4.5. Risultati.....	91
4.5.1. Caratteristiche del campione.....	91
4.5.2. Frequenze alleliche.....	93
- ER- $\alpha$ : PvuII e XbaI .....	93
- Aromatasi C1531T .....	95
- Aromatasi Arg264Cys .....	95
- SNP3 di AKT-1 .....	96
- SNP4 di AKT-1 .....	97
<b>Conclusioni.....</b>	<b>101</b>

## Riassunto

L'osteonecrosi è una complicanza relativamente rara ma grave della somministrazione di acido zoledronico a pazienti neoplastici con metastasi ossee tumorali. Lo scopo di questa tesi è stato l'identificazione di correlazioni tra varianti di geni coinvolti nel trofismo osseo, tra cui l'aromatasi, il recettore estrogeno- $\alpha$  e AKT-1, e la comparsa di osteonecrosi a carico delle ossa del cavo orale. Lo studio è stato condotto su un campione di soggetti affetti da tumori maligni e suddivisi in due gruppi: il gruppo test, costituito da 30 pazienti (17 F, 13 M) che presentavano lesioni osteonecrotiche a livello del cavo orale, ed il gruppo controllo di 53 pazienti (40 F, 13 M) privi di lesioni osteonecrotiche. L'età media dei soggetti era di 70,5 anni per i pazienti appartenenti al gruppo test e di 67,3 anni per il gruppo controllo. La patologia primaria per cui i soggetti erano sottoposti a trattamento con acido zoledronico era prevalentemente il carcinoma mammario e il mieloma multiplo sia nel gruppo test che nel gruppo controllo. La durata media di trattamento con acido zoledronico è stata di 29,2 mesi per il gruppo test e di 16,7 mesi per i soggetti appartenenti al gruppo controllo. Le varianti genetiche studiate in questi pazienti sono state: 1) i polimorfismi PvuII (rs2234693, T/C) e XbaI (rs9340799, A/G) localizzati nell'introne 1 del recettore ER- $\alpha$ ; 2) i polimorfismi rs10046 (C/T) e rs700519 (A/G) dell'aromatasi, e 3) i polimorfismi rs3730358 (C/T) e rs1130233 (A/G) di AKT-1. L'analisi dei polimorfismi PvuII e XbaI del recettore ER- $\alpha$  non ha mostrato alcuna differenza significativa ( $p > 0.05$ ) tra il gruppo test ed il gruppo controllo (23.3 vs. 33.7% e 40 vs. 38.5). L'analisi del polimorfismo rs10046 di aromatasi ha evidenziato che la frequenza dell'allele omozigote TT è pari al 36,7%, significativamente più elevato rispetto al 17% rilevato all'interno della popolazione controllo. L'analisi dello SNP3 di AKT-1 (rs3730358, C/T) ha rilevato una frequenza maggiore degli alleli TC-TT nel gruppo controllo (40%) rispetto al gruppo test (8.3%) ( $p < 0.01$ ). L'analisi del *linkage disequilibrium* ha dimostrato che rs3730358 costituisce un *haplotype block* con altri polimorfismi di AKT-1, risultandone un pattern complesso il cui risultato funzionale supera quello dei singoli SNPs. In conclusione, questo studio dimostra l'importanza dell'aromatasi e degli estrogeni per la comparsa di osteonecrosi e suggerisce l'importanza della genotipizzazione per identificare i pazienti a rischio di manifestare questo grave evento avverso.

## Premessa

I Bifosfonati (BPs) rappresentano una parte integrante della terapia dei pazienti oncologici ed ematologici. Questi farmaci sono analoghi stabili del pirofosfato organico che si legano selettivamente al tessuto osseo. I BPs si sono dimostrati efficaci nel controllo delle metastasi ossee di tumori solidi, come il carcinoma mammario ed il carcinoma prostatico, il controllo dell'ipercalcemia maligna nei pazienti affetti da mieloma multiplo, dell'osteoporosi e del Morbo di Paget; possono essere somministrati per via endovenosa nel caso di metastasi ossee, mieloma multiplo e morbo di Paget. I BPs per via endovenosa comprendono il pamidronato, di seconda generazione somministrato per via endovenosa ogni 3 o 4 settimane con una dose di 90 mg e l'acido zoledronico e il pamidronato di terza generazione, somministrato per via endovenosa ogni 3 o 4 settimane con una dose di 4 mg. I BPs somministrati per via orale sono l'aledronato e il residronato, sono somministrati per il trattamento dell'osteoporosi nelle donne dopo la menopausa e per l'osteoporosi indotta da glucocorticoidi. Questi farmaci in genere sono somministrati una volta a settimana, nel caso dell'aledronato 70 mg a settimana, nel caso del risedronato 35 mg a settimana. L'ibandronato è il più recente BP per il trattamento dell'osteoporosi ed è dosato mensilmente. La terapia con BPs è generalmente ben tollerata dai pazienti, essendo nella maggior parte dei casi essa priva di effetti collaterali. Tuttavia, a partire dal 2003, in una percentuale bassa dei soggetti in trattamento con BPs, in particolare con acido zoledronico, sono stati descritti casi di osteonecrosi a carico delle ossa mascellari (ONJ). Pazienti che presentano l'osteonecrosi della mandibola, sono generalmente, pazienti oncologici con metastasi ossee. L'ONJ è una patologia necrotica sito specifica che interessa le ossa mascellari, caratterizzata da una lenta progressione e da mancata tendenza alla guarigione spontanea. L'osteonecrosi è un termine comunemente usato per descrivere la morte delle cellule ossee -osteoblasti, Lining cell, oteociti e osteoclasti- L'osteonecrosi distrugge le cellule endoteliali dell'osso ed i principali vasi sanguigni e porta ad un indebolimento del flusso sanguigno nell'osso. Quindi l'osteonecrosi, non è considerata una patologia ma il risultato finale di un flusso sanguigno interrotto, causato

da altri fattori. Questa complicazione si manifesta generalmente in quei soggetti che hanno subito un intervento chirurgico dento-alveolare. L'osteonecrosi della mandibola può rimanere asintomatico per settimane, mesi o anni e può portare a dolore ed esposizione ossea della mandibola. Queste lesioni sono molto frequenti quando intorno al tessuto inizia ad infiammarsi o ci sono evidenze cliniche di infezione. Segni e sintomi che possono manifestarsi prima dello sviluppo clinico dell'osteonecrosi includono dolore, mobilità dentale, rigonfiamento della mucosa, eritema e ulcerazione. Questi effetti possono insorgere spontaneamente o più comunemente di conseguenza ad interventi chirurgici orali. Cambiamenti radiografici, non sono evidenti fino a che non ci siano significativi coinvolgimenti ossei. Quindi una panoramica può non rivelare cambiamenti significativi nei primi stadi dell'osteonecrosi. Recenti studi clinici hanno identificato molti fattori di rischio associati con lo sviluppo di osteonecrosi. Questi includono una storia di trauma dento-alveolare, la presenza di mucosa orale sottile e friabile, la durata dell'esposizione ai BPs e il tipo di BPs. Nella maggior parte dei casi di osteonecrosi riportati, il maggior rischio è il trauma dento-alveolare. Questo sottolinea l'importanza del mantenimento di una buona salute orale che riduca il rischio di estrazioni dentarie. Anche la durata della terapia dei BPs presenta dei legami nello sviluppo di necrosi, trattamenti più lunghi sono associati ad un maggior rischio di manifestarsi dell'ONJ. Inoltre, i BPs più potenti, quelli per via endovenosa, come pamidronato e specialmente lo zoledronato, sembrano essere più problematici rispetto ai BPs per via orale. La patogenesi di questa complicazione sembra dovuta all'inibizione della funzione degli osteoclasti e quindi del rimodellamento osseo. Ipoteticamente il meccanismo dal quale i BPs possono avere questo effetto, deriva dall'inibizione degli osteoclasti e dalla loro azione sull'apoptosi. La funzione degli osteoclasti interferisce con il normale turnover osseo e il riassorbimento osseo. (Cellule trattate con BPs dimostrano una diminuzione della proliferazione, aumentano l'apoptosi e si denota un decremento della formazione di capillari.). I BPs hanno anche mostrato effetti non legati all'inibizione degli osteoclasti, infatti mostrano proprietà antiangiogeniche proprio per la loro abilità al decremento dei livelli di circolazione del potente fattore angiogenico VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Questa è una delle ragioni fondamentali per il loro uso nelle metastasi ossee, essi inibiscono la funzione delle cellule endoteliali in vivo e in vitro. Inoltre l'osso della mandibola è altamente suscettibile all'osteonecrosi, basato su molti fattori anatomici e fisiologici. Per prima cosa, i BPs tendono a concentrarsi ad alti livelli nella mandibola piuttosto che in altre parti

scheletriche a causa dell'elevata vascolarizzazione e del turnover osseo; secondo, le forze della funzione masticatoria possono facilmente indurre microfratture; terzo, la sottile mucosa orale può essere facilmente traumatizzata o rotta durante procedure chirurgiche, permettendo l'insediamento di microbi orali nell'osso necrotico.

Nonostante il grande fermento ed interesse del mondo scientifico riguardo all'ONJ oggi non sono ancora ben compresi i meccanismi patogenetici e non vi è un accordo unanime sulle strategie terapeutiche. Perciò ad oggi l'obiettivo primario deve essere la prevenzione della comparsa dell'ONJ sia nei pazienti in procinto di iniziare la terapia con BPs che in quelli già in trattamento con BPs. Gli obiettivi del progetto di ricerca di tesi sono quelli di valutare la presenza di variazioni genetiche in soggetti affetti da osteonecrosi dei mascellari attraverso analisi farmaco genetica, con il fine di ottenere una migliore comprensione della patogenesi di queste lesioni e poter prevenire l'insorgenza di questo tipo di lesione in pazienti oncologici che si accingono ad intraprendere terapia con BPs endovenosi.

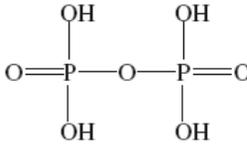
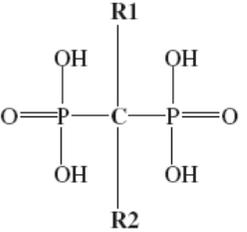
# Capitolo 1

## I bifosfonati

La scoperta e lo sviluppo dei bifosfonati (BPs) come classe di farmaci per la terapia delle patologie del tessuto osseo è una storia che si estende per oltre tre decenni. Nei primi anni sessanta, Neuman e Fleisch (1961) mentre studiavano il meccanismo di calcificazione indotto dal collagene, scoprirono che fluidi organici come il plasma e le urine contenevano degli inibitori della calcificazione. In particolare dimostrarono come il pirofosfato inorganico, presente nel siero e nelle urine, possa prevenire la calcificazione legando in nuovi cristalli di idrossiapatite in formazione. Da questi studi è emerso il ruolo chiave del pirofosfato nella prevenzione della calcificazione nei tessuti molli e nella regolazione della mineralizzazione del tessuto osseo. Patologie come la calcolosi renale possono infatti essere associate ad alterazioni del metabolismo del pirofosfato. Studi animali condotti in seguito hanno mostrato che il pirofosfato ed i polifosfati quando somministrati per via iniettiva in animali da laboratorio sono in grado di inibire efficacemente la formazione di calcificazioni ectopiche nei vasi, nella pelle e nel rene. Tuttavia, quando il pirofosfato ed i polifosfati sono somministrati per via orale, queste molecole sono inattivate dall'idrolisi operata dalle fosfatasi presenti sull'orletto a spazzola delle cellule della mucosa intestinale. È stato nella ricerca di analoghi più stabili del pirofosfato che ne conservassero le proprietà biologiche, ma fossero resistenti ai processi idrolitici che furono introdotti in ambito medico i BPs (Russell & Rogers 1999). I BPs, come il pirofosfato, hanno elevata affinità per il tessuto osseo e sono in grado di prevenire, sia in vivo che in vitro, la calcificazione, in più rispetto al pirofosfato sono efficaci anche quando somministrati per via orale infatti sono in grado di resistere all'idrolisi operata dagli enzimi intestinali (Fleisch et al. 1970). Oltre a queste proprietà biologiche i BPs mostrarono la capacità di inibire la

dissoluzione dei cristalli di idrossiapatite. Questa ha rappresentato la scoperta più importante relativa a questo ampio gruppo di molecole e ne ha permesso un utilizzo nella pratica clinica per il controllo di tutte quelle patologie dell'apparato scheletrico caratterizzate da un elevato riassorbimento osseo (Fleisch 1997). L'atomo di ossigeno idrolizzabile, che separa due gruppi fosfato nella molecola del pirofosfato, è sostituito da un atomo di carbonio. Questa modifica strutturale rende tutti i BPs resistenti alla degradazione biologica operata dalle pirofosfatasi endogene e quindi utilizzabili nella pratica clinica. Il primo BP sintetizzato, alla fine del XIX secolo, è stato l'etidronato. Questo è stato primariamente utilizzato in ambito industriale per inibire la crescita e la dissoluzione dei cristalli di calcio, solo in seguito è stato utilizzato come farmaco in grado di inibire il riassorbimento osseo. All'atomo di carbonio tetravalente oltre a due gruppi fosfato sono legate una catena corta R1 ed una lunga R2. (Figura 1.1.) La struttura base P-C-P attraverso processi di esterificazione dei gruppi fosfato ed a variazioni nelle catene laterali (R1 e R2) ha permesso di sintetizzare innumerevoli molecole. Ognuna delle quali ha mostrato di possedere in vivo delle proprie caratteristiche fisicochimiche e biologiche (Fleisch 1998). Il legame P-C-P è relativamente stabile alla temperatura, in grado di resistere a molti reagenti chimici e completamente resistente all'idrolisi enzimatica. I BPs grazie alla struttura P-C-P presentano una elevata affinità per gli ioni metallici come il calcio, il magnesio, e specialmente per il ferro (Curry & Nicholson 1972). Inoltre la struttura P-C-P conferisce un'elevata affinità per il tessuto osseo; affinità che è ulteriormente accresciuta dalla catena laterale R1 che permette un maggiore legame all'idrossiapatite. La catena laterale R1 è il sito di legame all'idrossiapatite ed è sostanzialmente simile in tutti i BPs (-OH, -Cl, -H); diversamente la catena laterale R2 caratterizza le proprietà anti-riassorbitive della molecola stessa e presenta notevoli differenze tra i diversi BPs. Quindi la catena R1 è direttamente responsabile delle proprietà farmacocinetiche, mentre la catena R2 caratterizza la potenza e la modalità di azione. (Figura 1.2.)

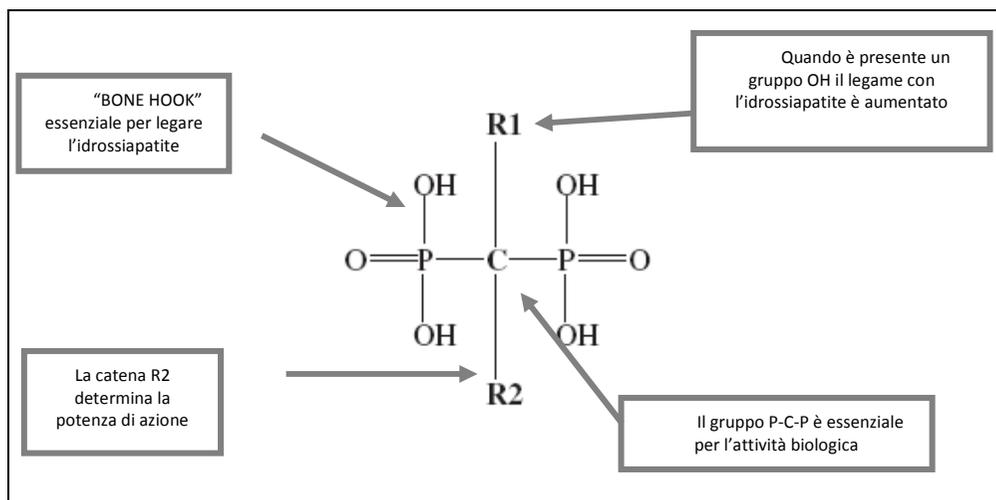
**Figura 1.1.**

<p><b>Pirofosfato organico</b></p>	
<p><b>Bifosfonato</b></p>	

**Formula stechiometrica del pirofosfato organico e di un bifosfonato generico.**

Tratta da: Catterall JB & Cawston TE Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors. *Arthritis Res Ther* 2003;5:12-24.

**Figura 1.2.**



Schema evidenziante i gruppi funzionali all'interno di una molecola di BPs.

Tratta da: Russell RGG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999;25:97-106.

Il meccanismo d'azione a livello cellulare dei BPs è condizionato dalla presenza all'interno della molecola di un gruppo amminico (N). Questa caratteristica chimica permette di suddividere i BPs in due gruppi con caratteristiche biologiche e modi di azione diversi:

molecole prive del gruppo amminico, i non ammino-BPs;

molecole contenenti un gruppo amminico, gli ammino-BPs. (Tabella 1.1.)

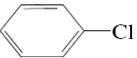
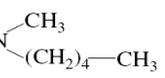
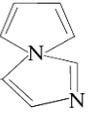
La presenza di un gruppo azoto primario all'interno della catena R2 caratterizza le proprietà farmacodinamiche dei diversi BPs e permette di incrementare significativamente la loro potenza di azione. Infatti il pamidronato e l'aledronato presentano un'attività a livello osseo da 100 fino a 1000 volte superiore rispetto alla prima generazione di BPs con un singolo metile nella catena laterale, come l'etidronato (Corrado & Cantatore 2005). Quando un atomo di azoto è combinato con un'ammina terziaria nella catena laterale in R2, come nell'ibandronato, la potenza dei BPs diviene ancora maggiore. Tuttavia, i più potenti BPs sono quelli contenenti un atomo di azoto all'interno di una struttura ciclica, come il risedronato e lo zoledronato. Queste strutture cicliche rendono queste molecole rispettivamente 2000 e 10000 volte più attive rispetto all'etidronato (Catteral & Cawston 2003). (Figura 1.3.)

**Tabella 1.1.**

Bifosfonati	
Non ammino-Bps	Ammino-Bps
<b>Etidronato *</b>	<b>Pamidronato §</b>
<b>Clodronato *</b>	<b>Neridronato §</b>
<b>Tiludronato §</b>	<b>Aledronato §</b>
	<b>Risedronato †</b>
	<b>Ibandronato †</b>
	<b>Zoledronato †</b>
* prima generazione; § seconda generazione; † terza generazione	

Tabella indicante i principali ammino e non ammino BPs utilizzati in ambito clinico.

Figura 1.3.

	<b>R1</b>	<b>R2</b>
<b>Potency 1x</b>		
Etidronate	—OH	—CH <sub>3</sub>
<b>Potency 10x</b>		
Chlodronate	—Cl	—Cl
Tiludronate	—H	—S—  —Cl
<b>Potency 100x</b>		
Pamidronate	—OH	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> —NH <sub>2</sub>
Neridronate	—OH	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> —NH <sub>2</sub>
<b>Potency &gt;100-&lt;1000x</b>		
Alendronate	—OH	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> —NH <sub>2</sub>
EB-1053	—OH	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> —N— 
Incadronate	—H	—NH— 
Olpadronate	—OH	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> — 
<b>Potency &gt;1000-&lt;10 000x</b>		
Ibandronate	—OH	—CH <sub>2</sub> —N— 
Risedronate	—OH	—CH <sub>2</sub> — 
<b>Potency &gt;10 000x</b>		
YH529	—OH	—CH <sub>2</sub> — 
Zoledronate	—OH	—CH <sub>2</sub> —N— 

Struttura della catena laterale R1 e R2 dei bifosfonati. I bifosfonati sono raggruppati in relazione alla potenza d'inibizione del riassorbimento osseo in ratti.

Tratta da: Catteral JB e Cawston TE Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors. *Arthritis Res Ther* 2003,5:12-24.

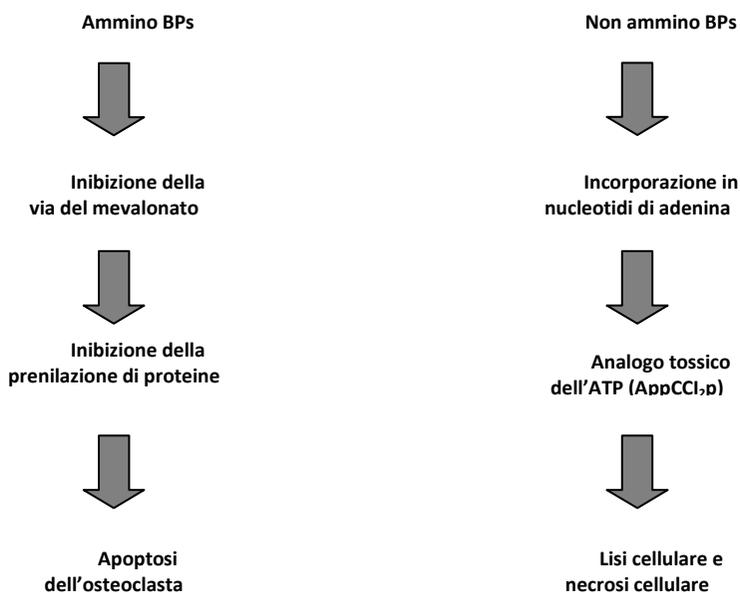
## 1.2. Caratteristiche farmacologiche

Le caratteristiche farmacologiche dei BPs, sono strettamente connesse alle caratteristiche chimiche proprie delle singole molecole ed in particolare è la associazione tra le tre possibili strutture della catena R1 e le numerose strutture della catena R2 a determinare sia le caratteristiche farmacodinamiche che farmacocinetiche.

### 1.2.1. La farmacodinamica

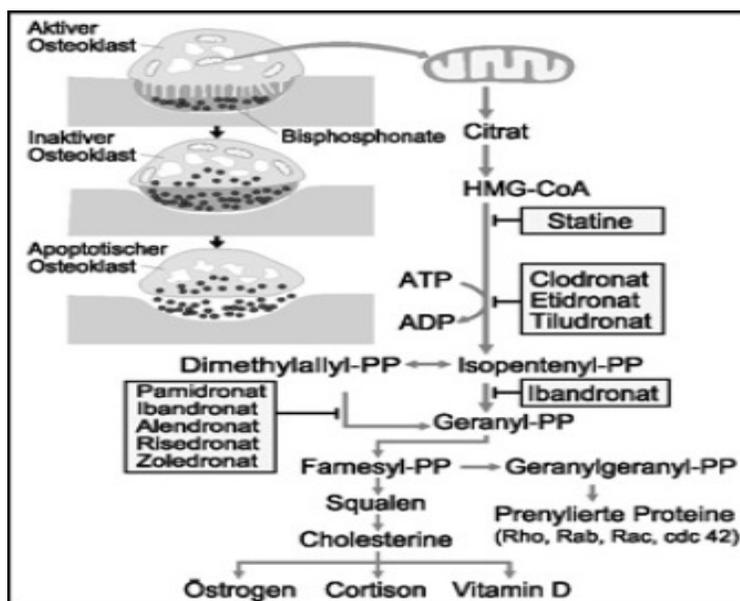
Le proprietà farmacodinamiche dei BPs sono determinate dalla presenza o meno all'interno della molecola stessa di un atomo di azoto (N). Infatti i non amino-BPs agiscono come analoghi strutturali dell'ATP e determinano un deficit energetico all'interno della cellula osteoclastica. Diversamente le molecole contenenti azoto agiscono sulla via della mevalonato sintetasi determinando così alterazioni strutturali a livello cellulare. (Figura 1.4. e 1.5.)

Figura 1.4.



La tabella evidenzia il differente meccanismo d'azione degli ammino e non ammino-BPs.

Figura 1.5.



Meccanismo d'azione dei bifosfonati nell'inibizione dell'azione osteoclastica a livello osseo

Tratta da: Diel IJ, Fogelman I, Al-Nawas B, Hoffmeister B, Migliorati C, Gligorov J, Väänänen K, Pylkkänen L, Pecherstorfer M, Aapro MS. Pathophysiology, risk factors and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Is there a diverse relationship of amino and non-aminobisphosphonates? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007 Dec;64(3):198-207.

### - Non ammino BPs -

I principali composti appartenenti a questa classe sono il clodronato, l'etidronato ed il tiludronato. Sono i BPs con struttura più simile al pirofosfato organico, sono metabolizzati, dagli osteoclasti e dalla linea cellulare da cui derivano, attraverso la via dell'enzima citoplasmatico aminoacyl-tRNA, come analoghi non idrolizzabili dell'adenosintrifosfato (ATP). Gli analoghi dell'ATP sono accumulati all'interno del citosol ed inducono morte cellulare per l'inibizione degli enzimi che utilizzano l'ATP, come l'adenina nucleotide traslocasi (ANT), alterando così la permeabilità della membrana mitocondriale. L'inibizione dell'ANT da parte del metabolita AppCCI2p (adenosin5 5'-[beta,gamma-diclorometilene] trifosfato) causa iperpolarizzazione della membrana mitocondriale interna, la quale può portare all'alterazione del potenziale di membrana mitocondriale, rilascio del citocromo C ed induzione dell'apoptosi. L'elevata affinità dei BPs per la componente minerale del tessuto osseo e la successiva assimilazione da parte degli osteoclasti attivati durante il riassorbimento osseo, fa sì che una concentrazione citotossica di questi metaboliti sia accumulata unicamente all'interno degli osteoclasti attivi.

Inoltre recenti studi hanno individuato un altro meccanismo d'azione risultato dell'inibizione della farnesilpirofosfato sintetasi (FPP sintetasi), che determina l'accumulo di isopentenilpirofosfato (IPP) si collega con l'adenosina monofosfato (AMP) nel processo di formazione dell'ATP anche questo metabolita contribuisce ad determinare un'inibizione dell'ANT mitocondriale ed induce apoptosi (Coxon et al. 2006).

### - Ammino BPs -

Sulla scia del successo clinico dell'etidronato e del clodronato, agli inizi degli anni ottanta la ricerca ha portato allo sviluppo di molecole con maggiore potenza anti-riassorbitiva che differivano per le caratteristiche chimiche della catena laterale R2, ma mantenevano inalterata la struttura della catena R1 (responsabile dell'affinità per l'idrossiapatite). I primi ammino-BPs prodotti sono stati il pamidronato e l'aledronato, hanno mostrato da subito potenza anti-riassorbitiva di ben 10-100 volte maggiore rispetto all'etidronato ed al clodronato. Successivamente sono stati poi sintetizzati l'ibandronato e l'olpadronato che possiedono una efficacia circa 1000 volte superiore rispetto al pamidronato nell'inibizione del riassorbimento osseo. Nella ricerca di ottimizzare l'effetto anti-riassorbitivo sono stati sintetizzati BPs, contenenti l'atomo di N racchiuso all'interno di un anello eterociclico, come lo zoledronato ed il risedronato. Questi, in modelli sperimentali, hanno mostrato di possedere una potenza di azione 10000 volte superiore rispetto all'etidronato. Per ottenere un'elevata potenza di azione, l'atomo di azoto all'interno della catena R2 deve essere posto ad una distanza critica dal gruppo P-C-P ed in una specifica configurazione spaziale. Sebbene la struttura della catena laterale R2 rappresenti il maggior determinante del potenziale anti-riassorbitivo, entrambi i gruppi fosfato sono necessari per rendere la molecola farmacologicamente attiva. Infatti alterazioni di uno o entrambi i gruppi fosfato riduce l'affinità per la componente minerale del tessuto osseo ed è per questa ragione che molecole analoghe ai BPs, come i fosfonofosfinati ed i fosfonocarbossilati, sono meno attive (Russell & Rogers 1999 e Conte & Guarnieri 2004). Gli ammino-BPs sono caratterizzati da un differente meccanismo d'azione rispetto ai BPs di prima generazione. Questi, agiscono sulla via del mevalonato inibendo in modo selettivo l'enzima farnesilpirofosfato sintetasi responsabile della sintesi dei due gruppi isoprenilici, farnesildifosfato (FPP) e geranilgeranilpirofosfato (GGPP). Ciò comporta l'inibizione della prenilazione di piccole proteine GTP-binding protein quali Ras, Rho, Rac; un processo essenziale per la localizzazione di queste GTP-asi sulle membrane cellulari e, quindi, per il corretto funzionamento delle cellule osteoclastiche (Figura 1.6.). Queste piccole GTP-asi sono fondamentali per il controllo ed il mantenimento del ciclo vitale cellulare. Sono implicate, infatti, nell'arrangiamento del citoscheletro, nella formazione dell'orletto a spazzola (necessario per attivare il processo di riassorbimento del tessuto osseo), nella trasduzione dei segnali e nel traffico delle vescicole. L'alterazione ed il blocco di questi processi può determinare l'apoptosi

ed in particolare, la mancata prenilazione delle proteine Rho, Rac, Cdc42 comporta la rottura degli anelli di F-actina, struttura essenziale per l'architettura citoscheletrica delle cellule osteoclastiche.

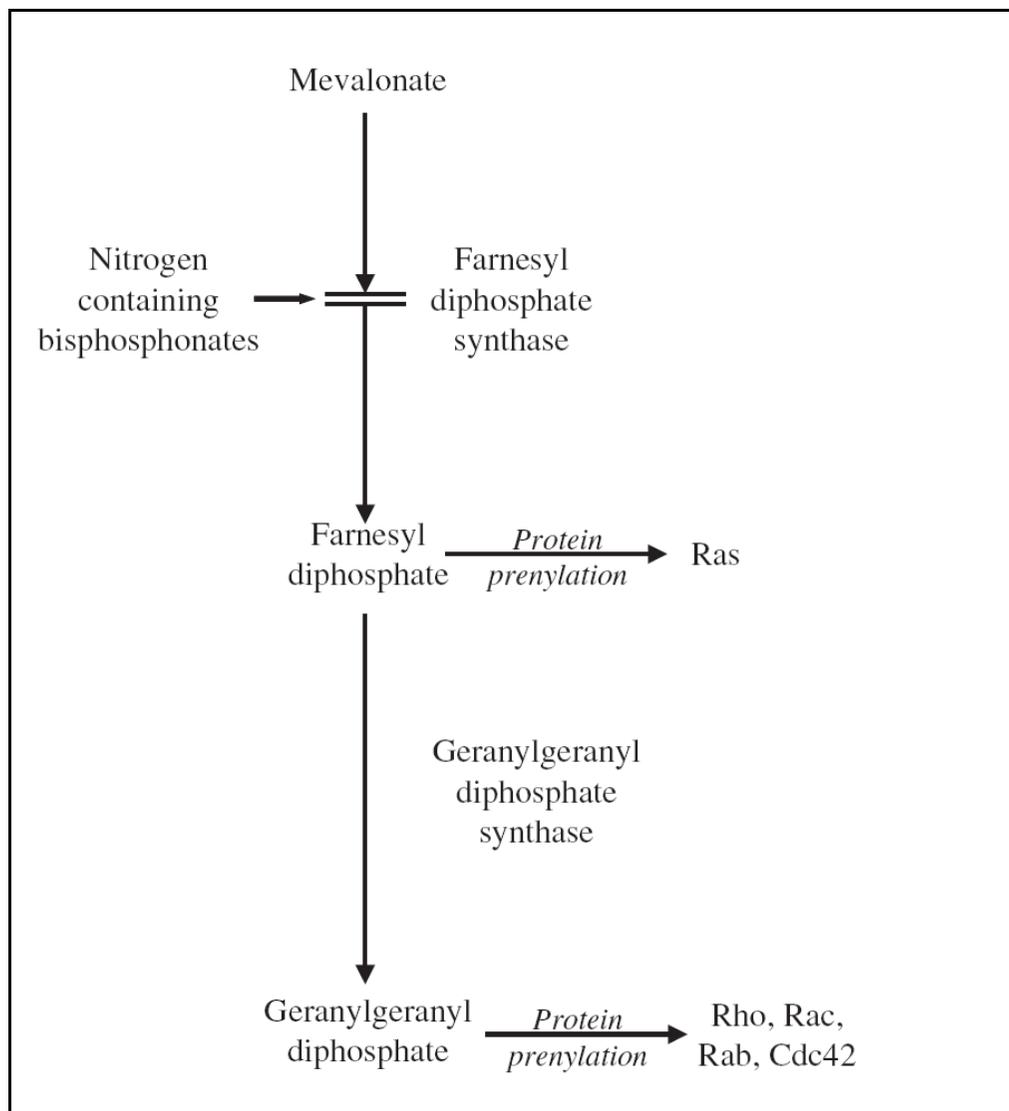


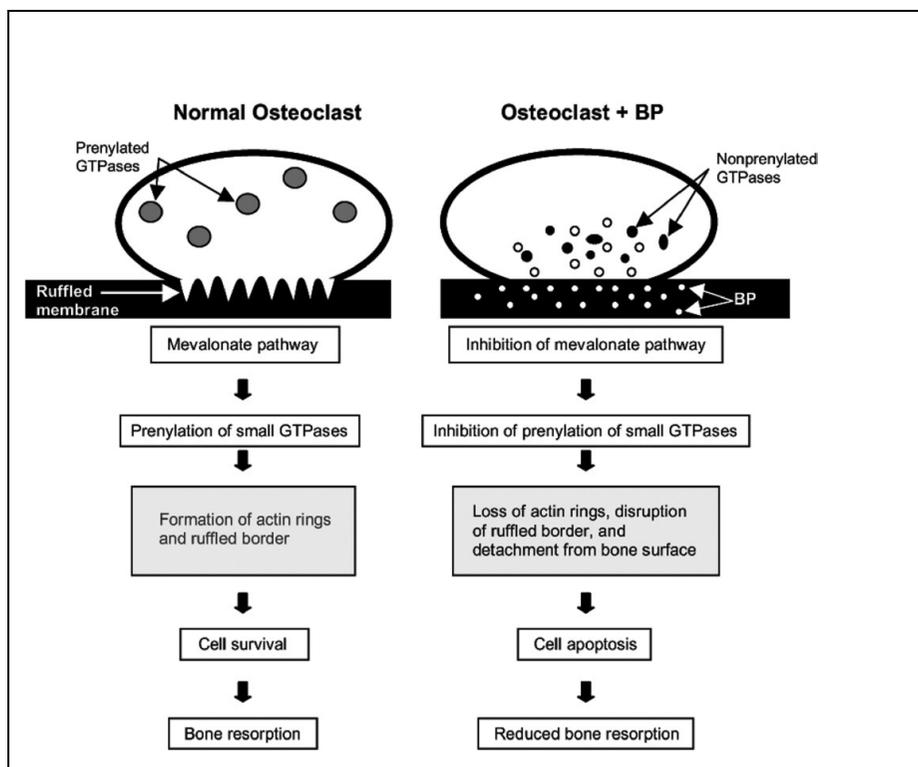
Figura 1.6.

Dimostrazione schematica della via del mevalonato. I bifosfonati contenenti azoto esplicano la loro azione sulla via del mevalonato. L'inibizione dell'enzima farnesil difosfato sintetasi impedisce la produzione della farnesil difosfato necessaria per la prenilazione delle proteine.

Tratta da: Catterall JB e Cawston TE Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors. *Arthritis Res Ther* 2003,5:12-24.

L'inibizione della prenilazione della proteina Rab determina delle alterazioni della membrana citoplasmatica che impediscono così la formazione dell'orletto a spazzola, che è essenziale per attivare il processo di riassorbimento della matrice extracellulare. Studi in vivo sull'aledronato hanno mostrato come effetto finale dell'inibizione di queste proteine sia l'apoptosi delle cellule osteoclastiche stesse (Coxon et al. 2006). (Figura. 1.7.) La potenza anti-riassorbitrice degli ammino-BPs è ritenuta eccezionale se valutiamo la ridotta quantità di principio attivo che penetra all'interno del citosol. Analizzando specificatamente la farmacodinamica dello zoledronato, anche questa molecola determina l'inibizione del riassorbimento del tessuto osseo mediante un effetto diretto pro-apoptotico sulla cellula osteoclastica. Inoltre, è stata osservata un'azione diretta sugli osteoblasti, infatti l'acido zoledronico ne inibisce il reclutamento e la differenziazione (Chaplet et al. 2004). Recenti studi in vitro, hanno evidenziato che questo ammino-BPs abbia la capacità di inibire il legame RANKL-RANK sia riducendo la produzione del RANK-L solubile e l'espressione del RANK-L di membrana, che aumentando la produzione di osteoprotegerina (OPG).

Figura 1.7.

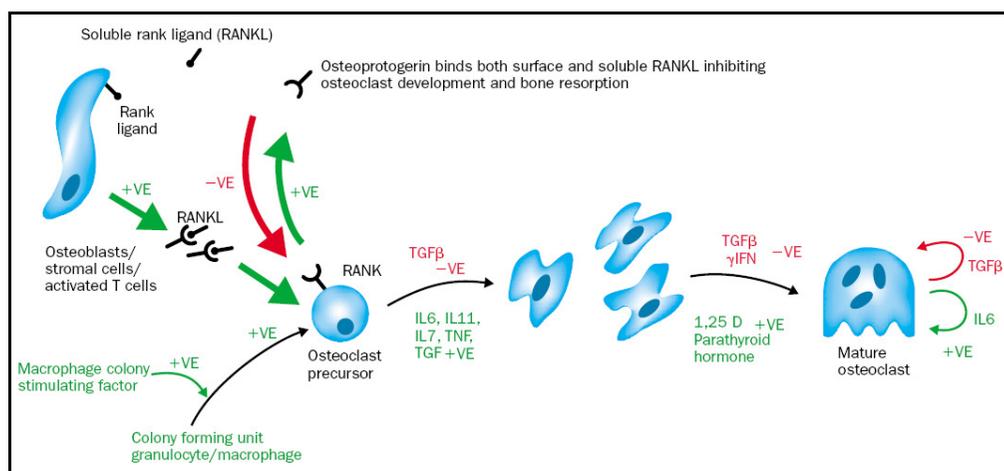


Schematizzazione del funzionamento della cellula osteoclastica, a sinistra. A destra, il meccanismo d'azione che determina la riduzione del riassorbimento osseo.

Tratta da: Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates *Curr Opin Pharmacol.* 2006 Jun;6(3):307-12.

Il RANK-L (Receptor Activator Nuclear factor Kb-Ligand) è una proteina espressa sulle membrane degli osteoblasti, dei linfociti T attivati, in forma solubile nel midollo osseo ed in altri tessuti. Questo polipeptide si lega con elevata affinità al suo recettore specifico, il RANK, che è un polipeptide espresso sui precursori emopoietici osteoclastici nel midollo osseo e sulla membrana delle cellule osteoclastiche. Il legame RANK-L/RANK comporta l'attivazione di trasduttori (NF-kb e AKT-1) del segnale intracellulare. I trasduttori così attivati determinano la differenziazione delle cellule osteoclastiche e l'attivazione degli osteoclasti maturi, stimolandoli a riassorbire il tessuto osseo, inoltre determinano un prolungamento della sopravvivenza di queste cellule (Pan et al. 2004). (Figura 1.8.) Diversamente, l'OPG è una proteina prodotta in numerosi tipi cellulari tra cui le cellule del sistema immunitario e le cellule stromali-osteoblastiche, che agisce come inibitore biologico solubile del RANK-L. Infatti, l'OPG compete con il RANK per il recettore specifico RANK-L. Il legame tra OPG e RANK-L, impedisce l'attivazione di trasduttori (NF-kb e AKT-1) del segnale intracellulare e quindi contrasta gli effetti osteoclastogenici, pro-riassorbimento e anti-apoptotici sull'osteoclasta maturo (Hofbauer et al. 2000).

Figura 1.8.



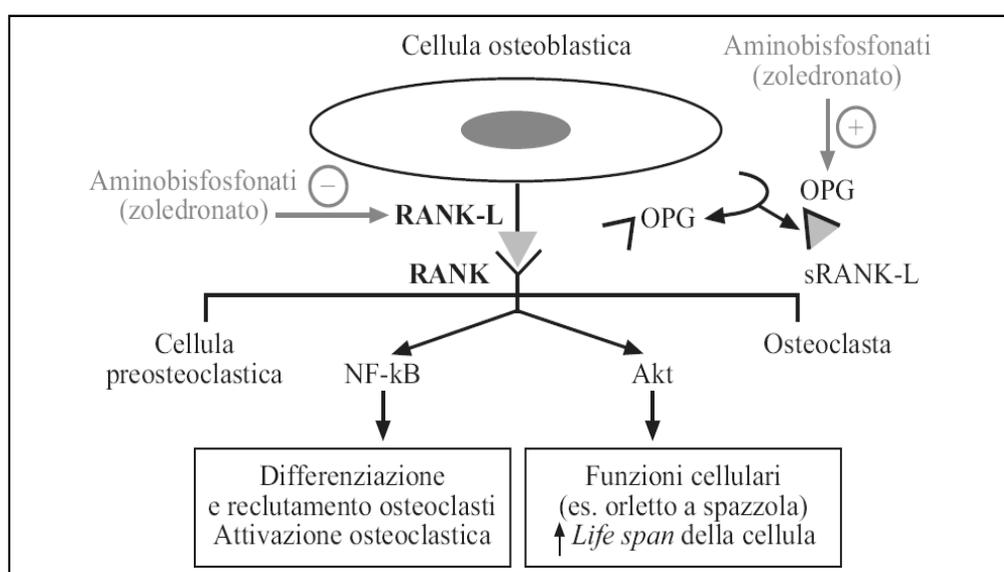
Interazione RANK/RANKL/osteoprogesterina nella differenziazione osteoclastica

Tratta da: Ashcroft AJ, Davies FE, Morgan GJ. Aetiology of bone disease and the role of bisphosphonates in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2003; 4:284-292.

Quindi, in ultima analisi, l'inibizione dell'esposizione del RANK-L sulla membrana osteoblastica e l'aumentata produzione dell'OPG indotte dallo zoledronato determinano l'inibizione dell'attivazione delle suddette vie endocellulari e, in ultima analisi, la riduzione del riassorbimento osseo (Ashcroft et al. 2003, Boyle et al. 2003). (Figura 1.9.)

Gli ammino-BPs, ed in particolare lo zoledronato, dimostrano anche effetti extra-scheletrici (per esempio, sulle cellule tumorali o sulle cellule del sistema immunitario) che rivelano meccanismi d'azione più complessi e ricerche future dovranno confermare il loro potenziale utilizzo clinico. Più precisamente sono emerse azioni dirette su altri fenotipi cellulari, indipendentemente dai loro effetti anti-osteoclastici, a dimostrazione che il microambiente osseo in fase di riassorbimento non è necessariamente richiesto per una captazione cellulare dei BPs (Bukowski et al. 2005).

Figura 1.9.



Meccanismo di azione degli ammino-BPs: inibizione del riassorbimento osteoclastico mediante un effetto diretto sulla cellula osteoclastica.

Tratta da: Girasole Bifosfonati: meccanismo d'azione. Up to date 2006

Numerosi studi riportano effetti dei BPs anche sulle cellule osteo-formatrici. Infatti, gli ammino-BPs stimolano la proliferazione delle cellule osteoblastiche e sembrano esercitare un meccanismo anti-apoptotico sugli osteociti. L'aledronato ha mostrato la proprietà di stimolare la formazione di precursori osteoblastici e di noduli mineralizzati nel tessuto osseo (Giuliani et al. 1998). Il neridronato aumenta nelle cellule mature osteoblastiche la proliferazione, la produzione di fosfatasi alcalina e la mineralizzazione del tessuto osseo. Il processo mediante il quale i BPs promuovono la differenziazione dei precursori osteoblastici verso cellule mature ad attività osteosintetica non è stato ancora pienamente compreso. Tali effetti sarebbero il risultato di un'attivazione (fosforilazione) di chinasi intra-

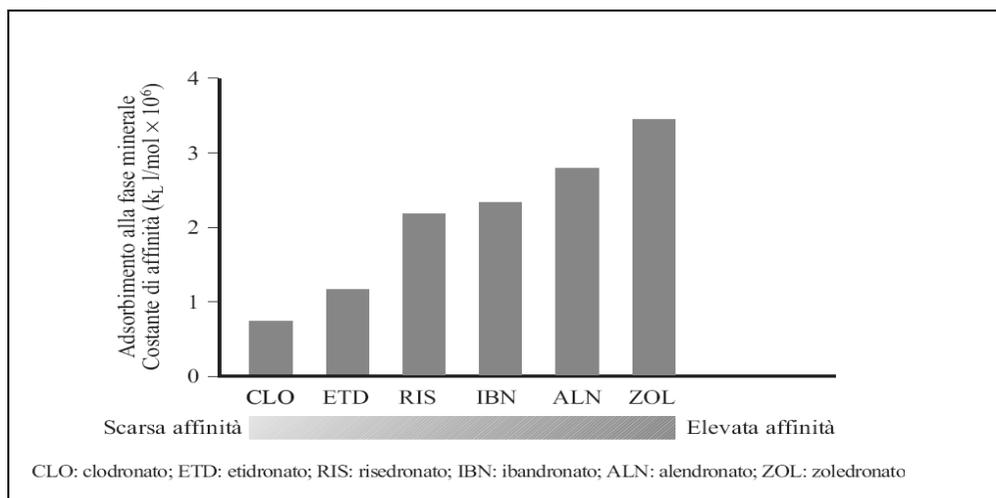
citoplasmatiche (ERK 1 e 2) capaci di inibire l'apoptosi cellulare prolungando la vita e le funzioni delle cellule di fenotipo osteoblastico (Frediani et al. 2004). In particolar modo l'aledronato si è mostrato capace di bloccare l'effetto pro-apoptotico del prednisolone sugli osteoblasti e sugli osteociti mediante l'attivazione di queste chinasi. Tutti questi risultati potrebbero, in parte, giustificare gli incrementi di massa ossea mostrati dagli ammino-BPs e la loro efficacia nella terapia dell'osteoporosi indotta da cortisone, dove la riduzione della mineralizzazione della matrice ossea e l'aumentato rischio di frattura sarebbero il risultato di una riduzione della neoformazione ossea e del numero degli osteociti (Plotkin et al. 2005). Inoltre, studi presenti in letteratura indicano, che i BPs sono capaci di inibire l'angiogenesi in diversi modelli di neoplasia (cancro della prostata, della mammella, tumori epiteliali, ecc.). Questo effetto avverrebbe attraverso l'inibizione selettiva di metalloproteinasi prodotte da macrofagi attivati in sede tumorale, la mancata attivazione di un fattore ad elevata attività antiangiogenetica, il vascular endothelial growth factor (VEGF) e l'inibizione della proliferazione, dell'adesione e migrazione delle cellule endoteliali (Fournier et al. 2002 e Santini et al. 2002). Queste azioni, associate ad una riduzione del turnover osseo ed ad un impoverimento dei fattori di crescita presenti nella matrice ossea, potrebbero contribuire a limitare la diffusione delle metastasi ossee (Coxon et al. 1998 e Caraglia et al. 2004). Recenti evidenze indicano, inoltre, che gli ammino-BPs determinano un'espansione clonale ed un'attivazione di linfociti T gamma/delta. Queste cellule rappresentano la prima linea di difesa contro batteri, virus e tumori linfoidi. L'effetto sarebbe dovuto ad un accumulo di isopentenil-pirofosfato (aumentato dopo l'inibizione della via del mevalonato da parte dei BPs) in grado di attivare i recettori gamma-delta dei linfociti T. Il risultato finale comporterebbe un'aumentata proliferazione ed attivazione cellulare associata a produzione di citochine come l'IL-2. I BPs sarebbero in grado di sensibilizzare cellule tumorali (come nel mieloma multiplo) o le cellule osteoclastiche all'attività citotossica dei linfociti. Due importanti scoperte avvalorano queste ipotesi:

in pazienti con mieloma multiplo refrattario, in terapia con ammino-BPs, la risposta anti-tumorale è associata ad una significativa proliferazione dei linfociti T gamma-delta; osteoclasti umani esposti ad un amino-BPs vanno incontro ad una lisi mediata dalle cellule T di un'entità 10 volte superiore rispetto a quella ottenuta con la presenza dei soli linfociti negli osteoclasti di controllo (Kunzmann et al. 1999, Kunzmann et al. 2000 e Bukowski et al. 2005).

## 1.2.2. La farmacocinetica dei bifosfonati

I BPs sono dei composti di sintesi non presenti nel mondo animale e nessun enzima è in grado di scindere il legame P-C-P presente all'interno della molecola. Durante la fase di assorbimento, diffusione a livello tissutale ed escrezione le molecole di BPs conservano inalterata la loro struttura molecolare. La maggior parte degli studi sulla farmacocinetica dei BPs è stata condotta principalmente sull'etidronato e sul clodronato. Da questi primi studi è emerso come solamente una porzione compresa tra l'1% ed il 10% del principio attivo sia assorbito a livello intestinale, inoltre questa percentuale sembra essere maggiore nei soggetti giovani ed estremamente variabile tra le diverse specie animali. Nell'uomo è assorbito 1-9% dell'etidronato e l'1-2% del clodronato somministrato per os (Fogelman et al. 1986 e Yakatan et al. 1982). Nel modello murino, l'assorbimento avviene a livello dell'intestino tenue ed è diminuito dalla presenza di calcio. Per questa ragione i BPs, nell'uomo, sono somministrati prima dei pasti e mai unitamente a latticini. L'assorbimento è inoltre fortemente condizionato dalle dimensioni molecolari del principio attivo, il che rende alcuni BPs non assorbibili a livello intestinale e quindi necessaria una loro somministrazione per via parenterale (Martodam et al. 1983). Una volta somministrato tra il 20% ed il 50% dell'etidronato assorbito si localizza a livello osseo e la rimanente parte è escreta nell'urine, questa parte risulta essere maggiore per il clodronato (Conrad & Lee 1981). Infatti la clearance renale sia dell'etidronato che del clodronato è superiore a quella dell'inulina. Un accumulo di BPs è stato descritto anche in altri organi, come il fegato, ciò è determinato da rapide infusioni endovenose infatti; in questi casi, il farmaco viene fagocitato dal sistema del reticolo endoteliale (Fleisch 1998). Una volta assorbiti all'interno della matrice ossea i BPs, infatti, si legano elettivamente ai cristalli d'idrossiapatite nelle aree di intenso turnover osseo. Recenti scoperte indicano che i diversi BPs mostrano una differente capacità di legame per i cristalli d'idrossiapatite. Infatti, valutando la costante di affinità (misura della capacità adsorbitiva alla superficie minerale a una temperatura di 37°C) di 6 diversi BPs è emerso come lo zoledronato e l'aledronato hanno un'affinità notevolmente superiore ai non ammino-BPs di prima generazione come l'etidronato ed il clodronato. (Figura 1.10.)

Figura 1.10.

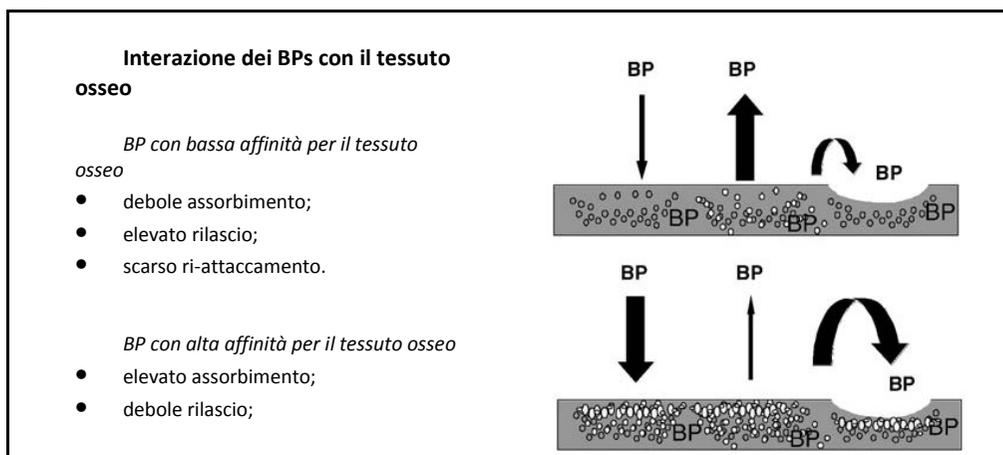


Diversa affinità di legame per i cristalli di idrossiapatite.

Tratta da: Girasole Bifosfonati: meccanismo d'azione. Up to date 2006

Questa diversa capacità di legame al tessuto osseo può spiegare le differenze tra i vari BPs in termini di reversibilità e persistenza degli effetti, e potrebbe giustificare, in parte, la differente potenza anti-riassorbitiva. Inoltre, la diversa affinità dei BPs per il tessuto osseo caratterizza l'emivita del farmaco. Infatti, dal momento che i BPs sono incorporati nella matrice ossea, la permanenza nel tessuto osseo è molto lunga, e può durare alcuni anni (Nancollas et al. 2006). Perciò, l'effetto anti-riassorbitivo è mantenuto nel tempo anche dopo la sospensione della terapia, a seguito del fisiologico processo di riassorbimento della matrice minerale ossea che libera nuove molecole di BPs. (Figura 1.11.) Il farmaco nuovamente liberato dalla matrice minerale ossea può penetrare per endocitosi all'interno degli osteoclasti ed inibirne l'attività determinando il loro distacco dalle superfici di riassorbimento (Catterall & Cawston 2003). Il mancato riassorbimento della matrice minerale ossea da parte degli osteoclasti, impedisce il rilascio delle proteine morfogenetiche del tessuto osseo e dei fattori di crescita come l'insulin-like growth factor (IGF), che inducono la produzione di nuovi osteoblasti dalle cellule staminali. Quindi, gli osteoni diventano acellulari ed infine necrotici.

Figura 1.11.



Interazione dei BPs con la matrice minerale ossea.

Tratta da: Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RG, Ebetino FH. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*. 2006 May;38(5):617-27.

Gli ammino-BPs differiscono dai non ammino-BPs oltre che per la farmacodinamica anche per la farmacocinetica, perciò la precedente distinzione utilizzata per descrivere le caratteristiche farmacodinamiche può essere applicata anche per quelle farmacocinetiche.

- Non ammino-BPs -

Per i BPs di prima generazione, come il clodronato e l'etidronato, è prevista una somministrazione orale ad alte dosi per ottenere gli effetti terapeutici. Le alte dosi sono necessarie poiché i BPs somministrati oralmente hanno un ridotto assorbimento a livello gastro-intestinale, con conseguente scarsa biodisponibilità (generalmente <5%) e tollerabilità. Quando sono somministrati per via parenterale si ha un'elevata biodisponibilità, perciò la loro infusione deve avvenire lentamente al fine di evitare la comparsa di un danno a livello renale. Questi effetti avversi possono perciò essere provocati sia dalle dosi che dalla velocità di infusione. Altri effetti collaterali descritti in letteratura, associati in particolar modo al sovraddosaggio di etidronato, sono l'alterazione della mineralizzazione ossea e l'osteomalacia (Conte & Guarnieri 2004).

---

- Ammino BPs -

La nuova classe di BPs contenenti azoto inibisce il riassorbimento osseo a concentrazioni micromolari, perciò una minor dose di principio attivo è richiesta per ottenere lo stesso risultato dei non ammino-BPs. Gli ammino-BPs possono essere somministrati sia per os, che per infusione endo-venosa. In particolare i BPs utilizzati in campo oncologico sono solitamente somministrati per mezzo di un'infusione intra-venosa in modo relativamente veloce. Ciò consente una minor frequenza di dosaggio (una volta al mese) e permette ai BPs somministrati di essere generalmente ben tollerati a medio e lungo termine. Queste proprietà hanno permesso all'acido zoledronico di essere il farmaco più utilizzato nel trattamento di pazienti con metastasi ossee (Conte & Guarnieri 2004). Analizzando specificatamente la farmacocinetica dell'acido zoledronico dopo un'infusione endo-venosa, solo il 22% del farmaco si lega alle proteine plasmatiche, diminuisce rapidamente, in modo multifasico, al di sotto dell'1% dopo 24 ore dalla prima infusione. Tuttavia, invece di azzerarsi, rimane bassa per molto tempo a causa del lento rilascio del farmaco dal tessuto osseo durante le fasi di riassorbimento osseo. Anche dopo ripetute infusioni il farmaco non presenta un processo di accumulo a livello plasmatico. Dopo 24 ore, la somministrazione di una dose di acido zoledronico, più del 41% della dose è escreta nell'urina. Ciò indica che il rene è l'organo principale nell'eliminazione del farmaco e che lo stato della funzione renale è fondamentale nello stabilire la corretta dose da somministrare. Tuttavia, la somministrazione di elevati dosaggi di farmaco associati ad una elevata velocità di infusione determinano una tossicità renale che impedisce il mantenimento dei livelli plasmatici consigliati (Skerjanec et al. 2003). Infatti, la Drug and Food Administration sostiene che la somministrazione di acido zoledronico determina un progressivo deterioramento della funzionalità renale fino all'insufficienza renale. Dati confermati da un recente studio che ha evidenziato come il 21% dei pazienti trattati con zoledronato presentino alterazioni e disturbi della funzionalità renale (Aguilar Bujanda et al. 2007). Diversamente l'ibandronato, che presenta proprietà farmacodinamiche e cinetiche diverse rispetto allo zoledronato, non presenta effetti collaterali a livello renale. Infatti dimostra una sicurezza renale comparabile alla sicurezza del placebo (Body et al. 2003, Lyubimova et al. 2003 e Pecherstorfer et al. 2006).

### 1.3. Effetti avversi dei bifosfonati

Sia i BPs somministrati per via intra-venosa che quelli somministrati per os sono associati ad effetti avversi di tipo sistemico. L'infusione intravenosa presenta un quadro clinico caratterizzato da moderati segni e sintomi, più frequenti a seguito della prima infusione; mentre i BPs somministrati oralmente sono associati prevalentemente ad eventi avversi di tipo gastrointestinale.

#### 1.3.1. BPs a somministrazione orale

L'ibandronato ed il clodronato, somministrati per os, sono scarsamente utilizzati a causa del ridotto assorbimento nel tratto gastro-intestinale. La scarsa biodisponibilità obbliga il medico alla somministrazione di elevati dosaggi; specialmente per il clodronato, e ciò favorisce la comparsa di effetti collaterali. Tutti i BPs somministrati per os presentano come effetti collaterali a livello gastrointestinale: esofagite, mucosite, nausea, vomito e diarrea.

Inoltre recenti studi hanno evidenziato la possibilità da parte dei BPs, somministrati per os, di esacerbare gli effetti collaterali della terapia antitumorale. Questi effetti avversi contribuiscono a condizionare negativamente la qualità della vita dei pazienti rendendo più difficile la collaborazione con il medico curante e, al tempo stesso, l'efficacia della terapia (Ezra & Golomb 2000, Atula et al. 2003 e Powles et al. 2002).

#### 1.3.2. BPs ad infusione intravenosa

La somministrazione intravenosa può provocare effetti collaterali sulla funzionalità renale, a differenza dei BPs somministrati per os. Tuttavia, se i BPs sono somministrati secondo la velocità di infusione ed il dosaggio raccomandati, gli effetti tossici sulla funzionalità renale sono rari e limitati (Conte & Guarnieri 2004).

In generale, la somministrazione intravenosa è ben tollerata ed è associata ad effetti predicibili e ben gestibili. Gli effetti avversi che si osservano includono reazioni acute, variabilità dei livelli ionici sierici (calcio, magnesio e fosforo), un occasionale incremento della creatinina sierica ed una leggera forma di anemia.

L'incidenza di questi effetti negativi è stimata essere presente in circa un terzo dei pazienti in trattamento.

Inoltre sono descritte interazioni tra i BPs e gli agenti anti-cancerogeni. Questi effetti si manifestano indipendentemente dal BP intravenoso utilizzato e comprendono reazioni di ipersensibilità: orticaria, angioedema, rash cutaneo, eritema; febbre, debolezza, nausea, vomito, dolorabilità addominale, diarrea, anoressia, artralgia o mialgia e dolorabilità ossea. L'ibandronato presenta effetti avversi di maggior gravità: astenia, edema polmonare e linfocitosi.

Particolare attenzione deve essere posta al controllo della funzionalità renale. Infatti, tutti i BPs a somministrazione intravenosa sono potenzialmente nefrotossici se somministrati a dose e velocità di infusione elevati rispetto ai parametri consigliati. In letteratura, l'incidenza di sviluppare questa complicanza è molto bassa, ma è sempre raccomandato il monitoraggio della creatinina sierica durante il trattamento a lungo termine con BPs intravenosi (Zojer et al. 1999, Rosenet al. 2001, Saad et al. 2002, Zometa [package insert] 2003 e Body et al. 2004).

## Bibliografia.

1. Fleisch H, Neuman WF. Mechanisms of calcification: role of collagen, polyphosphates, and phosphates. *Am J Physiol* 1961;200:1296-1300.
2. Russell RGG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999;25:97-106.
3. Fleisch H, Russell RGG, Bisaz S, Muhlbauer RC, Williams DA. The inhibitory effects of phosphonates on the formation of calcium phosphates crystal in vitro and aortic a kidney calcification in vivo. *Eur j Clin Invest* 1970;1:12-18.
4. Fleisch H. bisphosphonates in bone disease. From the laboratory to the patient, Third Edition. The Parthenon Publishing Group 1997. New York.
5. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Esecuzione Endocr Rev* 1998;19(1):80-100
6. Curry JD, Nicholson DA. Oligophosphonates. In: Griffith J, Grayson M (eds) *Topics in phosphorous chemistry*. Wiley, New York, 1972;vol 7:37
7. Corrado A, Cantatore FP. I Bifosfonati: caratteristiche chimiche, effetti biologici scheletrici ed effetti extra-scheletrici. *Reumatismo* 2005;57(3):142-153.
8. Catterall JB, Cawston TE. Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors. *Arthritis Res Ther* 2003;5:12-24
9. Diel IJ, Fogelman I, Al-Nawas B, Hoffmeister B, Migliorati C, Gligorov J, Väänänen K, Pylkkänen L, Pecherstorfer M, Aapro MS. Pathophysiology, risk factors and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Is there a diverse relationship of amino and non-aminobisphosphonates? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007 Dec;64(3):198-207.
10. Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Jun;6(3):307-12.
11. Conte P, Guarneri V. Safety of intravenous and oral bisphosphonates and compliance with dosing regimens. *Oncologist*. 2004;9 Suppl 4:28-37.
12. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K, Zannettino AC. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res*. 2004 Jan;19(1):147-54.
13. Chaplet M, Detry C, Deroanne C, Fisher LW, Castronovo V, Bellahcène A. Zoledronic acid up-regulates bone sialoprotein expression in osteoblastic cells through Rho GTPase inhibition. *Biochem J*. 2004 Dec 15;384(Pt 3):591-8.
14. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2000 Jan;15(1):2-12.
15. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337-42

16. Ashcroft AJ, Davies FE, Morgan GJ. Aetiology of bone disease and the role of bisphosphonates in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2003; 4:284-292
17. Bukowski JF, Dascher CC, Das H. Alternative bisphosphonate targets and mechanisms of action. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Mar 18;328(3):746-50.
18. Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone*. 1998 May;22(5):455-61.
19. Frediani B, Spreafico A, Capperucci C, Chellini F, Gambera D, Ferrata P, Baldi F, Falsetti P, Santucci A, Bocchi L, Marcolongo R. Long-term effects of neridronate on human osteoblastic cell cultures. *Bone*. 2004 Oct;35(4):859-69.
20. Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Biol Chem*. 2005 Feb 25;280(8):7317-25.
21. Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, Clézardin P. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22):6538-44.
22. Santini D, Vincenzi B, Avvisati G, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, Salerno A, Denaro V, Tonini G. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenetic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2002 May;8(5):1080-4.
23. Coxon FP, Benford HL, Russell RG, Rogers MJ. Protein synthesis is required for caspase activation and induction of apoptosis by bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol*. 1998 Oct;54(4):631-8.
24. Caraglia M, D'Alessandro AM, Marra M, Giuberti G, Vitale G, Viscomi C, Colao A, Prete SD, Tagliaferri P, Tassone P, Budillon A, Venuta S, Abbruzzese A. The farnesyl transferase inhibitor R115777 (Zarnestra) synergistically enhances growth inhibition and apoptosis induced on epidermoid cancer cells by Zoledronic acid (Zometa) and Pamidronate. *Oncogene*. 2004 Sep 9;23(41):6900-13
25. Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M. Gamma/delta t-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med* 1999;340(9):737-738.
26. Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weissinger F, Tony HP, Wilhelm M. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood*. 2000 Jul 15;96(2):384-92
27. Fogelman I, Smith L, Mazess R, Wilson MA, Bevan JA. Absorption of oral disphosphonates in normal subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1986 Jan;24(1):57-62.
28. Yakatan GJ, Poynor WJ, Talbert RL, Floyd BF, Slough CL, Ampulski RS, Benedict JJ. Clodronate kinetics and bioavailability. *Clin Pharmacol Ther*. 1982 Mar;31(3):402-10.
29. Martodam RR, Thornton KS, Sica DA, D'Souza SM, Flora L, Mundy GR. The effects of dichloromethylene diphosphonate on hypercalcemia and other parameters of the humoral hypercalcemia of malignancy in the rat Leydig cell tumor. *Calcif Tissue Int*. 1983 Jul;35(4-5):512-9.
30. Conrad KA, Lee SM. Clodronate kinetics and dynamics. *Clin Pharmacol Ther*. 1981;30:114-120.

31. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RG, Ebetino FH. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*. 2006 May;38(5):617-27.
32. Skerjanec A, Berenson J, Hsu C, Major P, Miller WH Jr, Ravera C, Schran H, Seaman J, Waldmeier F. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with varying degrees of renal function. *J Clin Pharmacol*. 2003 Feb;43(2):154-62.
33. Aguiar Bujanda D, Bohn Sarmiento U, Cabrera Suárez MA, Aguiar Morales J. Assessment of renal toxicity and osteonecrosis of the jaws in patients receiving zoledronic acid for bone metastasis. *Ann Oncol*. 2007 Mar;18(3):556-60.
34. Body JJ, Diel IJ, Lichinitser MR, Kreuser ED, Dornoff W, Gorbunova VA, Budde M, Bergström B. Intravenous ibandronate reduces the incidence of skeletal complications in patients with breast cancer and bone metastases. *Ann Oncol*. 2003 Sep;14(9):1399-405.
35. Pecherstorfer M, Rivkin S, Body JJ, Diel I, Bergström B. Long-term safety of intravenous ibandronic acid for up to 4 years in metastatic breast cancer: an open-label trial. *Clin Drug Investig*. 2006;26:315-22.
36. Lyubimova NV, Kushlinsky NE, Lichinitser MR, Schlosser K. Renal safety of intravenous ibandronic Acid in breast cancer patients with metastatic bone disease. *Clin Drug Investig*. 2003;23(11):707-16.
37. Ezra A, Golomb G. Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000 Aug 31;42(3):175-95.
38. Atula S, Powles T, Paterson A, McCloskey E, Nevalainen J, Kanis J. Extended safety profile of oral clodronate after long-term use in primary breast cancer patients. *Drug Saf*. 2003;26(9):661-71.
39. Powles T, Paterson S, Kanis JA, McCloskey E, Ashley S, Tidy A, Rosenqvist K, Smith I, Ottestad L, Legault S, Pajunen M, Nevantaus A, Männistö E, Suovuori A, Atula S, Nevalainen J, Pyllkkänen L. Randomized, placebo-controlled trial of clodronate in patients with primary operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Aug 1;20(15):3219-24.
40. Zojer N, Keck AV, Pecherstorfer M. Comparative tolerability of drug therapies for hypercalcaemia of malignancy. *Drug Saf*. 1999 Nov;21(5):389-406.
41. Zometa [package insert]. Zoledronic acid prescribing information. East Hanover, NJ: Novartis Pharmaceutical Corporation, 2003
42. Rosen LS, Gordon D, Kaminski M, Howell A, Belch A, Mackey J, Appfelstaedt J, Hussein M, Coleman RE, Reitsma DJ, Seaman JJ, Chen BL, Ambros Y. Zoledronic acid versus pamidronate in the treatment of skeletal metastases in patients with breast cancer or osteolytic lesions of multiple myeloma: a phase III, double-blind, comparative trial. *Cancer J*. 2001 Sep-Oct;7(5):377-87.
43. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA, Chen B; Zoledronic Acid Prostate Cancer Study Group. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Oct 2;94(19):1458-68.

# Capitolo 2

## 2.1. Fisiopatologia delle metastasi ossee

Le metastasi ossee sono un problema clinico comune nei pazienti con cancro e responsabili di una considerevole morbidità a causa dell'elevata dolorabilità e dell'alterazione della mobilità, soprattutto quando hanno luogo fenomeni di compressione nervosa e fratture patologiche, secondarie a collasso vertebrale. I pazienti con metastasi ossee possono anche sviluppare ipercalcemia e, nonostante convivano con patologie incurabili, possono sopravvivere per mesi o addirittura anni. Le metastasi ossee possono essere determinate da tumori originati da vari siti, tuttavia l'80% delle metastasi ossee deriva da tre tumori: cancro della mammella, cancro alla prostata e cancro del polmone. Inoltre lesioni ossee di tipo osteolitico sono caratteristiche comuni di altre patologie come il mieloma.

### 2.1.1. Formazione delle metastasi ossee

La formazione delle metastasi si ha quando le cellule tumorali lasciano il sito primario e migrano attraverso il torrente ematico verso il sito delle metastasi. La capacità di alcuni tumori di sviluppare metastasi ossee, chiamata "osteotropismo", dipende sia dal tipo di cellule tumorali, ma anche dalla presenza di un microambiente adatto alla crescita delle cellule metastatiche. Le caratteristiche del tumore primario condizionano notevolmente la capacità di una neoplasia di dar luogo a lesioni secondarie, ciò è stato ben dimostrato per il cancro della mammella, dove le metastasi sono più comuni nei tumori positivi ai recettori per gli estrogeni ed in quelli ben differenziati (Platet et al. 2004). È interessante come tumori ormono-sensibili come il cancro della mammella ed il

cancro alla prostata, siano spesso complicati da metastasi ossee ed inoltre, come i prodotti del riassorbimento osseo rappresentino fattori chemiotattici per alcune cellule tumorali. Il primo argomento da affrontare è come avviene la distruzione ossea. Questa è un effetto diretto del tumore sul tessuto osseo o è mediata dalle cellule osteoclastiche? Il risultato degli studi istologici in modelli sperimentali in cui cellule tumorali erano state iniettate all'interno ed intorno a tessuto osseo, suggeriscono che l'attivazione osteoclastica sia importante nella formazione delle metastasi ossee (Kozlow & Guise 2005). Infatti nel tessuto osseo normale è presente un continuo processo di riassorbimento ed apposizione ossea mediato rispettivamente da osteoclasti ed osteoblasti, un processo chiamato nel suo insieme rimodellamento. Nelle metastasi ossee questo equilibrio è perso ed è presente un eccessivo riassorbimento osseo osteoclastico-mediato. Al fine di studiare il processo, sono stati sviluppati modelli per lo studio in vitro del riassorbimento osseo. Il processo di reclutamento e di attivazione osteoclastica osseo è stato valutato in vitro mediante il rilascio di calcio-45, precedentemente marcato nel mezzo di sospensione. I risultati di questi studi hanno evidenziato l'importanza oltre che degli osteoclasti, anche degli osteoblasti nel processo di riassorbimento osseo. Inoltre molti degli agenti che stimolano l'osteolisi nei modelli sperimentali sono attivati solo se sono presenti anche gli osteoblasti nel mezzo di cultura (Iveson 1994). Usando preparazioni con osso sano, sono stati dimostrati molti agenti osteolitici, tuttavia il loro possibile ruolo nella formazione delle metastasi ossee è tuttora in corso di studio.

### 2.1.2. Osteolisine prodotte dalle cellule tumorali

#### - Parathyroid Hormone-Related Peptide -

Studi condotti su differenti linee cellulari isolate da cancro della mammella, del rene e del polmone, hanno permesso la caratterizzazione di tre differenti tipi di parathyroid hormone-related peptide (PTHrP). Il PTHrP è un peptide codificato dal cromosoma 12 ed ha dimostrato analogie con il paratormone (PTH) per quanto riguarda i gruppi amminici terminali, infatti 8 dei 13 gruppi sono identici. Come il PTH, la sua attività biologica sembra risiedere nei primi 34 aminoacidi. PTHrP agisce sui recettori per il PTH, stimolando il riassorbimento osseo, ed in larga parte, se non in tutta, risulta essere responsabile dell'ipercalcemia maligna (Iveson 1994).

---

- Prostaglandine -

Le prostaglandine, specialmente la PGE<sub>2</sub>, stimolano il diretto riassorbimento osseo osteoclastico in colture organiche (Chambers 1985).

- Transforming growth factor- $\alpha$  -

Il fattore di crescita- $\alpha$  trasformante, un polipeptide mitogenetico, è anche un potente stimolatore del riassorbimento osseo osteoclastico (Kingsley et al. 2007).

- Catepsina D -

La catepsina D è una proteasi lisosomiale acida capace di degradare la matrice extracellulare e può essere coinvolta nei processi metastatici. Il precursore enzimatico inattivo (Procatepsina D) è stato dimostrato che stimoli il riassorbimento osseo nelle preparazioni osteoclastiche isolate e nelle analisi sulle ossa lunghe dei feti di ratto (Harris et al. 2007).

### 2.1.3. Agenti osteolitici prodotti dalle cellule stromali

Una reazione stromale viene riscontrata spesso nei siti dove sono presenti metastasi ossee, pertanto gli agenti osteolitici prodotti da tali cellule, possono essere importanti nella patogenesi delle metastasi ossee.

- Interleuchina-1 -

L'interleuchina-1 (IL-1) è una citochina multifunzionale coinvolta nelle risposte infiammatorie ed è sintetizzata dai monociti attivati e dai macrofagi attivati. L'IL-1 la possiamo trovare in due forme, IL-1 $\alpha$  ed IL-1 $\beta$ , le quali risultano essere tra i più potenti peptidi responsabili del riassorbimento osseo attualmente conosciuti. L'IL-1 è in grado di stimolare l'osteolisi nella calvaria di topolini appena nati in concentrazioni molto inferiori a 1pM (Gowen & Mundy 1986).

- Fattore di necrosi tumorale e linfotossina -

Il fattore di necrosi tumorale (TNF) e la linfotossina (LT) sono citochine infiammatorie, prodotte rispettivamente da macrofagi e linfociti attivati. Entrambi contribuiscono a stimolare e regolare il processo di riassorbimento osseo (Kwan Tat et al. 2004).

- Interleuchina-6 -

L'interleuchina-6 (IL-6) è una citochina multifunzionale prodotta dalle cellule del sistema immunitario, come monociti e macrofagi. È un importante stimolatore dell'osteolisi come evidenziato nei modelli in vitro di riassorbimento osseo. Inoltre l'IL-6 si è dimostrata capace di potenziare l'attività osteolitica di altri agenti osteolitici come l'IL-1, il TNF e la LT. Gli anticorpi monoclonali contro l'IL-6 possono si sono dimostrati in grado di bloccare il riassorbimento osseo indotto dall'IL-1 (Kwan Tat et al. 2004).

#### 2.1.4. Peptidi regolatori della crescita prodotti dalle cellule ossee e dalle cellule tumorali

- Fattore di crescita trasformante  $\beta$  -

Il fattore di crescita trasformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) è una superfamiglia di fattori di crescita e differenziazione cellulare, di cui fanno parte anche le proteine morfogenetiche (BMP), l'attvine, l'inibine e la sostanza mülleriana (Mumford et al. 2001). È sintetizzato dagli osteoblasti ed incamerato nella matrice ossea. Sono stati descritti due diversi recettori per il TGF- $\beta$ , a cui è associata un'attività serina-treonina chinasi, definiti di tipo I e di tipo II. Entrambi i recettori sono necessari per la trasmissione del segnale. Il recettore di tipo II lega il ligando (TGF- $\beta$ ) ed attiva mediante una fosforilazione il recettore di tipo I (Hollinger et al. 1999). Il TGF- $\beta$  svolge una funzione di controllo dei processi di crescita cellulare, di stimolazione nella produzione di matrice cellulare e di inibizione del sistema immunitario. Il suo contenuto nella compagine ossea può essere aumentato da vari agenti tra cui il fattore di crescita insulino-simile. Nelle culture osteoblastiche è stato dimostrato un importante ruolo nella chemiotassi, nella proliferazione, nella differenziazione e nella regolazione della produzione delle proteine della matrice ossea. Nei confronti dell'attività osteoclastica, il TGF- $\beta$  mostra un effetto inibitorio, che si realizza grazie alla sua capacità di contrastare gli effetti mitogenici di altri fattori di crescita come il

Platelet-Derived Epidermal Growth Factor (PDEGF) ed il Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) (Guise & Chirgwin 2003).

- Fattore di crescita piastrino-derivato-

Il Platelet-Derived Growth Factor (fattore di crescita di derivazione piastrinica) è una glicoproteina con un peso molecolare che oscilla dai 27 ai 30 Kd. Sebbene sia il principale fattore di crescita contenuto nelle piastrine, esso è presente anche nei monociti, nei macrofagi, nelle cellule muscolari lisce, nelle cellule endoteliali e nei fibroblasti. Gli effetti del PDGF sono mediati da due distinti recettori di membrana ad alta affinità, presenti sulle cellule bersaglio e chiamati  $\alpha$  e  $\beta$ ; a questi recettori è legata un'attività tirosin-chinasica. Una volta attivati, questi recettori presenti sulla membrana cellulare, danno inizio, tramite un processo di trasduzione, all'espressione di geni di sequenze codificanti proteine coinvolte nella regolazione di processi cellulari, quali mitosi, angiogenesi e attivazione macrofagica. I recettori  $\alpha$  stimolano l'attività mitotica, mentre il recettore  $\beta$  stimola la chemiotassi, soprattutto dei precursori delle cellule osteoblastiche. Inoltre, si ha la stimolazione della mitogenesi e della differenziazione dei fibroblasti a livello dei tessuti molli. Il PDGF ha un ruolo complesso sia nello sviluppo che nel processo di riparazione dei tessuti. Lo sviluppo di neoplasie, l'aterosclerosi ed altri disordini come la fibrosi potrebbero essere dovuti ad un'alterazione nella secrezione autocrina o paracrina del PDGF (Lev et al. 2005).

- Fattore di crescita insulinico -

Sia il fattore di crescita insulinico-I che il fattore di crescita insulinico-II (IGF-I e IGF-II) sono potenti agenti mitogeni, presenti nella matrice ossea, ed hanno anche effetti anabolici sul tessuto scheletrico. Nei ratti l'IGF-I incrementa la formazione di osso in vivo e l'IGF-II ha dimostrato di stimolare la produzione di collagene dalle cellule osteoblastiche umane in vitro (Giles & Singh 2003).

## 2.2. I bifosfonati nella terapia delle metastasi ossee

L'interessamento del tessuto osseo rappresenta una complicanza frequente nei tumori metastatici (15-40% nei tumori del polmone, rene e colon) che raggiunge percentuali molto elevate (70-80%) nei tumori della mammella e della prostata. In questo secondo gruppo di neoplasie la prognosi di vita del paziente risulta essere più lunga, infatti la sopravvivenza mediana, dalla diagnosi di metastasi ossee, è di circa 2,5 anni per il tumore mammario e di

circa 3 anni per il carcinoma prostatico. Diversamente la sopravvivenza mediana scende fino a 6 mesi per le neoplasie polmonari. La presenza di metastasi scheletriche condiziona fortemente la qualità di vita dei pazienti ed è frequentemente associata ad una severa morbidità. Il sintomo più frequente e precoce è rappresentato dal dolore osseo, che interessa quasi il 70% dei pazienti, e richiede l'instaurazione di una terapia antalgica e radioterapia. Altri eventi ossei possibili che possono interessare questi pazienti sono fratture patologiche, compressioni midollari ed ipercalcemia. Si stima che circa il 70% dei pazienti con metastasi ossee sviluppi nell'arco di 2 anni almeno un evento scheletrico e circa il 50% di questi soggetti presenta un frattura patologica (Coleman 2004). Le metastasi ossee sono tipicamente classificate in base al loro aspetto radiologico in litiche, addensanti o miste. Nel carcinoma mammario si possono avere tutte e tre queste varianti radiologiche, tuttavia si ha la prevalenza di lesioni dall'aspetto litico. Diversamente nel carcinoma prostatico prevalgono le forme addensanti. Il trattamento standard delle metastasi ossee può essere sia chemioterapico che ormonale, in base alle caratteristiche del tumore primitivo. Frequentemente a queste terapie si affiancano terapie analgesiche, terapie radianti e radiometaboliche, in relazione ai sintomi ed alle complicanze associate alle metastasi stesse. Talvolta può rendersi necessario il ricorso a terapie chirurgiche per ridurre fratture e decomprimere il midollo (Salvagni & Ardizzoni 2007). Negli ultimi anni i BPs hanno dimostrato di essere un trattamento farmacologico efficace nel controllo di degli eventi scheletrici sopra citati. Il pamidronato è stato il primo ammino-BPs a mostrarsi efficace nel trattamento delle metastasi ossee. Infatti la somministrazione endovenosa di 90 mg di pamidronato, ogni 3-4 settimane, è efficace nel ridurre del 30% la skeletal morbidity rate (SMR: numero di eventi/anno) e determina un incremento del 50% del tempo al primo evento scheletrico. Buoni risultati nel controllo delle complicanze legate alle metastasi ossee sono stati ottenuti anche con l'ibandronato, farmaco disponibile sia per somministrazione endovenosa (6 mg, ogni 3-4 settimane) che per os (50 mg/die). I pazienti trattati per via parenterale hanno mostrato nei due anni di follow-up una riduzione del 20% dello skeletal morbidity rate period (SMRP: numero di eventi occorsi in un determinato periodo di tempo) ed un significativo incremento del tempo al primo evento. L'ibandronato si mostrato ugualmente efficace nel ridurre lo SMRP quando somministrato per os mentre non si è mostrato significativamente efficace nell'incrementare il tempo al primo evento. I risultati migliori nel controllo delle complicanze ossee di natura oncologica sono stati ottenuti con lo zoledronato (4 mg, somministrato per via endovenosa, ogni 3-4 settimane) il più potente tra tutti i BPs utilizzati in ambito clinico. Infatti lo zoledronato riduce del 41% il rischio di eventi scheletrici e prolunga significativamente il tempo al primo evento. Inoltre è l'unico BPs che si è dimostrato efficace nel controllo delle metastasi ossee di carcinoma prostatico e nell'offrire un'adeguata paliazione del dolore. Inoltre l'acido zoledronico si è mostrato efficace anche nel controllo delle metastasi ossee di altri tumori solidi come il carcinoma polmonare e renale (Salvagni & Ardizzoni 2007). Utilità clinica dei BPs nel controllo delle metastasi ossee è ben descritta

e documentata in letteratura, tuttavia la durata del trattamento ed i criteri di sospensione sono diversi da quelli utilizzati per gli altri antineoplastici e non è supportata da studi scientifici adeguati. Il trattamento con BPs viene protratto anche di fronte ad una progressione della malattia a livello osseo. Oggigiorno la presenza di marcatori biochimici del riassorbimento osseo potrebbe individuare i pazienti che potrebbero trarre beneficio dalla prosecuzione della terapia con BPs. I valori urinari basali di N-telopeptide (NTX) e durante la terapia con BPs sono correlati con il numero di eventi scheletrici ed elevati valori di NTX possono indicare una scarsa risposta al trattamento. Infatti elevati livelli basali di NTX rappresentano un fattore prognostico negativo in termini di eventi ossei, di progressione della malattia tumorale ed in termini di prognosi di vita, come mostrato recentemente in uno studio in pazienti affetti da metastasi di tumori solidi (Brown et al. 2005). L'utilizzo di questi marcatori non è tuttavia riconosciuto come uno strumento valido per il monitoraggio della malattia. La massa ossea è fortemente influenzata dalle terapie ormonali adiuvanti, in particolare nel carcinoma mammario ed in quello prostatico ormono-dipendenti. Nel caso del tumore della prostata la deprivazione androgenica può determinare una riduzione della BMD fino al 3.9% annui al livello dell'anca e fino al 7% annui a livello lombare. Infatti i pazienti che sopravvivono oltre 5 anni dopo la diagnosi di carcinoma prostatico, in assenza di metastasi ossee, presentano una percentuale di fratture che varia dal 19.4% al 12.6% per i tratti precedentemente analizzati (Eastham 2007). Anche la terapia ormonale adiuvante nei tumori della mammella influenza fortemente la BMD, in particolare il trattamento con inibitori delle aromatasi in post-menopausa ed in associazione con LH-RH agonisti in pre-menopausa. Recenti studi hanno evidenziato come gli effetti sulla BMD da parte degli inibitori dell'aromatasi e degli LH-RH agonisti possano essere efficacemente evitati dalla concomitante terapia con acido zoledronico (Gnant et al. 2007).

## Bibliografia.

1. Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 Jul;51(1):55-67.
2. Mundy GR, DeMartino S, Rowe DW. Collagen and collagen-derived fragments are chemotactic for tumor cells. *J Clin Invest*. 1981 Oct;68(4):1102-5.
3. Kozlow W, Guise TA. Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005 Apr;10(2):169-80.
4. Iveson TJ. Pathophysiology of bone metastases. In *Biphosphonates and metastatic bone disease*. 1994 Parthenon Publishing Group Inc. New York USA.
5. Chambers TJ. The pathobiology of the osteoclast. *J Clin Pathol*. 1985 Mar;38(3):241-52. Review.
6. Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA. Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther*. 2007 Oct;6(10):2609-17.
7. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5287-312.
8. Gowen M, Mundy GR. Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon-gamma on bone resorption in vitro. *J Immunol*. 1986 Apr 1;136(7):2478-82.
9. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Feb;15(1):49-60.
10. Mumford JH, Carnes DL, Cochran DL, Oates TW. The effects of platelet-derived growth factor-BB on periodontal cells in an in vitro wound model. *J Periodontol*. 2001 Mar;72(3):331-40.
11. Hollinger JO, Buck DC, Bruder SP. Biology of bone healing: its impact on clinical therapy. In: Lynch S.E., Genco R.J., Marx R.E. (eds) *Tissue engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999:17-53.
12. Guise TA, Chirgwin JM. Transforming growth factor-beta in osteolytic breast cancer bone metastases. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 Oct;(415 Suppl):S32-8.
13. Lev DC, Kim SJ, Onn A, Stone V, Nam DH, Yazici S, Fidler IJ, Price JE. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor signaling restricts the growth of human breast cancer in the bone of nude mice. *Clin Cancer Res*. 2005 Jan 1;11(1):306-14.
14. Giles ED, Singh G. Role of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in breast cancer proliferation and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(6):481-7.
15. Coleman RE. Bisphosphonates: clinical experience. *Oncologist*. 2004;9 Suppl 4:14-27.
16. Salvagni S, Ardizzoni A. BF e metastasi ossee. In: Vescovi P. *Osteonecrosi mascellari e bisfosfonati: prevenzione, diagnosi e terapia*. Parma 2007;47-60.

17. Brown JE, Cook RJ, Major P, Lipton A, Saad F, Smith M, Lee KA, Zheng M, Hei YJ, Coleman RE. Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer, and other solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jan 5;97(1):59-69.
18. Eastham 2007. Bone health in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Urol.* 2007 Jan;177(1):17-24.
19. Gnant MF, Mlineritsch B, Luschin-Ebengreuth G, Grampp S, Kaessmann H, Schmid M, Menzel C, Piswanger-Soelkner JC, Galid A, Mittlboeck M, Hausmaninger H, Jakesz R; Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Zoledronic acid prevents cancer treatment-induced bone loss in premenopausal women receiving adjuvant endocrine therapy for hormone-responsive breast cancer: a report from the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 2007 Mar 1;25(7):820-8.

# Capitolo 3

## 3.1. L'osteonecrosi dei mascellari

L'osteonecrosi dei mascellari (ONJ) è una patologia specifica del tessuto osseo delle ossa mascellari caratterizzata da una lenta progressione e da una mancata tendenza alla guarigione spontanea (Graziani et al. 2006). Può essere determinata da fattori di natura fisica (radiazioni ionizzanti), chimica (arsenico, piombo, fosforo) che favoriscono l'instaurarsi di un processo infettivo che tende progressivamente a cronicizzare.

Il fattore di rischio più comunemente descritto per lo sviluppo di lesioni osteonecrotiche a carico dei mascellari è rappresentato dalla radioterapia della testa e del collo (Reuther et al. 2003 e Thiel et al. 1989). L'incidenza di questo quadro morboso si è notevolmente ridotta grazie ai progressi ottenuti oggi nell'ambito della radioterapia.

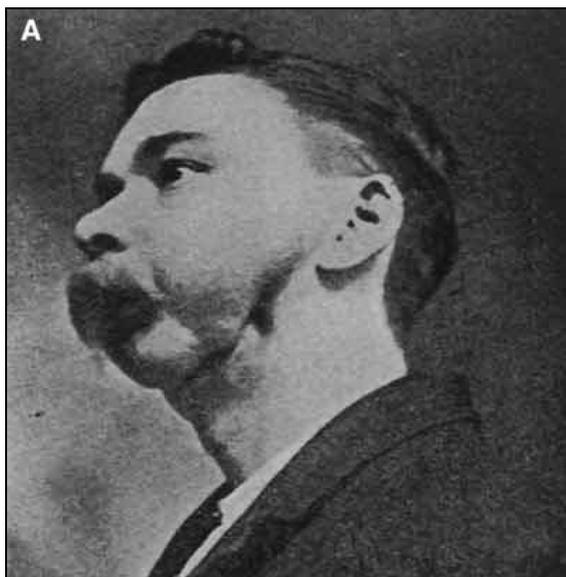
Tuttavia, negli ultimi anni si è assistito ad un progressivo aumento di lesioni osteonecrotiche in soggetti sottoposti a terapia cronica con BPs somministrati per via endovenosa (Marx 2003 e Ruggiero et al. 2004). I quadri clinici presentano una estrema variabilità, da piccole lesioni endodontico-parodontali ad estese aree interessanti l'intero corpo mandibolare e/o l'osso mascellare (Marx et al. 2005).

### 3.2. La Phossy jaw

Quadri clinici simili all'ONJ sono descritti in letteratura a partire dalla prima metà XIX secolo ed interessava i lavoratori adibiti alla lavorazione del fosforo bianco nelle fabbriche di fiammiferi londinesi. L'attività di queste fabbriche iniziò nel 1833 e coincise con incremento dell'incidenza di gravi patologie flogistiche, interessanti la bocca e le ossa mascellari, negli operai a diretto contatto con i fumi tossici di fosforo bianco o giallo. Nel 1845 Lorinser descrisse 22 casi simili nelle fabbriche austriache a Vienna. Le complicanze a carico dei mascellari erano sviluppate da circa l'11% degli operai esposti a vapori di fosforo bianco, i quali erano costretti a lavorare in ambienti piccoli, affollati e scarsamente ventilati. L'incidenza di questa patologia ebbe anche dei risvolti sociali. Nel giugno del 1888 Annie Besant, attivista socialista, con il supporto di Herbert Burrows, promosse il "London matchgirls strike", uno sciopero per denunciare le cattive condizioni igienico sanitarie in cui lavoravano le giovani donne ed adolescenti nelle fabbriche di fiammiferi londinesi di Bow. Per descrivere questa grave situazione sociale fu utilizzato il termine di "schiaffismo bianco". Solamente dopo tre settimane di sciopero, i padroni delle fabbriche decisero di venire incontro alle richieste degli operai ed iniziarono ad utilizzare il fosforo rosso il quale presenta una minor tossicità. L'aspetto clinico di queste lesioni era molto simile all'ONJ, infatti erano presenti aree di esposizione ossea, associata a dolore intenso, gonfiore e deformità facciale. A ciò si associava un elevato tasso di mortalità, per le complicanze settiche che frequentemente interessavano anche l'encefalo, il tutto aggravato dalla mancanza di terapie antibiotiche. L'esordio si presentava pauci-sintomatico con arrossamento e tumefazione gengivale in corrispondenza di foci settici dentari. Le condizioni socio-economiche degli operai impedivano loro di accedere a cure odontoiatriche perciò la cura degli elementi dentari era spesso rappresentata dall'avulsione dell'elementi dentari stessi. Purtroppo ciò non permetteva una risoluzione del processo infettivo ma spesso determinava un aggravamento del quadro clinico e la progressiva evoluzione verso la necrosi ossea con interessamento delle basi ossee e la formazione di fistole orali e cutanee. Il periodo medio di esposizione ai vapori di fosforo bianco era di circa 5 anni ed interessavano nel 60% dei casi la mandibola (Donoghue 2005). (Figura 3.1.) All'inizio del XX secolo numerosi casi sono stati descritti da John Andrews sempre nei lavoratori di fosforo nelle fabbriche di fiammiferi negli Stati Uniti. Sempre nel XIX e XX secolo casi di necrosi ossee sono stati descritte nei lavoratori delle industrie belliche, fuochi pirotecnici e manifatture del bronzo. Nel 1935 Donald Hunter, decano britannico di medicina del lavoro, definì così la "phossy jaw": "It was the most distressing of all the occupational diseases because it was very painful and was accompanied by a foul fetid discharge that

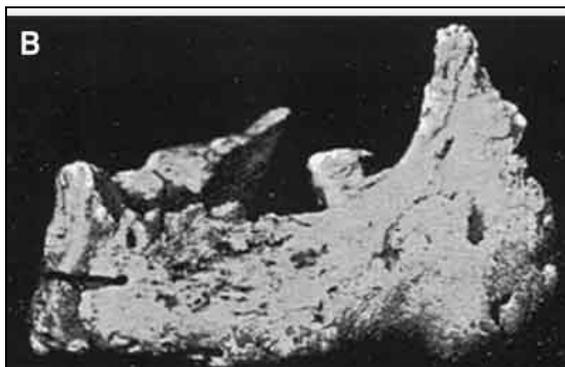
made its victims almost unendurable to others. It was obstinate and chronic, the treatment was agonising and the final result was a distressing disfigurement. It was this disfiguring effect plain to every observer that made phosphorus poisoning so notorious and led to determined efforts for its abolition in every civilised land.” (Era la più sconvolgente di tutte le malattie occupazionali perché molto dolorosa ed accompagnata da uno scolo fetido e maleodorante che rendeva i pazienti affetti intollerabili presso gli altri. Era costante e cronica, il trattamento agonizzante ed il risultato finale era sconvolgente e sfigurante. L’effetto sfigurante era chiaro ad ogni osservatore tale così da rendere l’avvelenamento da fosforo noto e tale da determinare sforzi per la sua abolizione in ogni terra civile). L’abbandono dell’utilizzo del fosforo bianco nelle preparazioni industriali ha rappresentato lo strumento vincente per contrastare ed eradicare questa malattia altamente invalidante.

**Figura 3.1.**



Defomità risultante dall’escissione della mandibola in un caso di necrosi da fosforo.

(Case of Dr John P. Andrews, *The Occupational Diseases*, Gilman Thompson W, Appleton D & Co, New York, 1914).



Necrosi da fosforo interessante l'intera mandibola escissa da Mr McCarthy nel 1884 (London Hospital Medical College Museum).

Tratta da: Donoghue AM. Bisphosphonates and osteonecrosis: analogy to phossy jaw. Med J Aust. 2005 Aug 1;183(3):163-4.

### 3.3. L'osteonecrosi dei mascellari ed i bifosfonati

Le prime descrizioni letteratura di una possibile associazione tra l'utilizzo clinico dei BPs e l'ONJ risale al settembre del 2003, quando sul Journal of Oral maxillofacial Surgery, Wang ed i suoi collaboratori descrissero necrosi ossee in tre pazienti affette da carcinoma mammario con metastasi ossee in terapia antitumorale con taxoidi, desametasone e pamidronato. La necrosi ossea interessava in un caso la mandibola ed in due il mascellare superiore con presenza di fistole oro-sinusal e erano insorte dopo avulsioni dentarie. I casi furono trattati con terapia chirurgica più o meno aggressiva, ma gli autori non riportano l'esito del trattamento ed il relativo follow-up. L'analisi istologica e strumentale non evidenziava nella sede la presenza di metastasi, era altresì rilevata un'infezione massiva da parte di microorganismi orali. L'ipotesi diagnostica formulata dagli autori fu di osteonecrosi correlata a terapia medica. Nello stesso periodo Robert Marx con una lettera al Journal of Oral Maxillofacial Surgery, segnalava 36 casi con tessuto osseo esposto necrotico avascolare, dolorante, non rispondenti al trattamento medico e chirurgico. Le necrosi in 28 pazienti (77,7%) erano seguenti ad interventi iatrogeni da parte dell'odontoiatra mentre nei rimanenti 8 casi risultavano essere di natura spontanea. L'autore è il primo ad identificare come fattore responsabile della

patogenesi dell'ONJ il trattamento con BPs, in particolare con zoledronato e pamidronato. Questa pubblicazione è la prima ad identificare come possibili responsabili delle necrosi i BPs; precedentemente solamente il una perdita osteointegrazione era stata imputata al trattamento con BPs (Starck & Epker 1995). Tuttavia questo articolo non descriveva l'osteonecrosi, e non si può stabilire una diretta relazione causa-effetto tra l'uso dei BPs e la perdita di osteointegrazione in relazione a un singolo case report. Nei mesi successivi sono pubblicati altri tre lavori che sottolineano anch'essi il rischio di necrosi ossee avascolari nei pazienti oncologici con metastasi ossee o affetti da mieloma multiplo (Tarassoff & Csermak 2003, Migliorati 2003, Carter & Goss 2003). Nel 2004 continuano le segnalazioni di nuovi casi di ONJ e nel mese di maggio lo stesso Ruggiero con i suoi collaboratori descrive, sempre sul Journal of Oral Maxillofacial Surgery, ben 63 casi. Nello studio retrospettivo sono descritti i casi osservati tra il febbraio 2001 ed il novembre 2003, oltre al numero significativo di casi questo lavoro prende in esame le possibili concause ed i presunti fattori di rischio. Inoltre pone attenzione sulla difficoltà della gestione terapeutica di queste necrosi e su la loro mancata risposta alle terapie mediche e chirurgiche. È descritta per la prima volta anche l'associazione tra ONJ e BPs assunti per os e per patologia non neoplastica. Il 2005 rappresenta l'anno del "boom" delle pubblicazioni, oltre 50 lavori sono pubblicati in tutto il mondo e si soffermano soprattutto sui fattori eziopatogenetici e sulla prevenzione. Compaiono le prime indicazioni per l'odontoiatri e viene completato il primo Expert Panel Recommendations for Prevention, Diagnosis and Treatment of Osteonecrosis of the Jaws, al quale prendono parte i maggiori esperti mondiali ed hanno analizzato il problema sia per gli aspetti medico-oncologici che chirurgico-stomatologici (Damato et al. 2005). Tuttavia le prime linee guida risultano essere carenti per quanto concerne la terapia delle lesioni stesse, infatti si tratta di indicazioni generiche e non applicabili nella totalità dei pazienti. Inoltre non sono prese in considerazioni le variabili mediche generali dei pazienti (malattia di base, condizioni di salute sistemica e prognosi di vita) e il tipo di farmaco assunto. Risulta essere lacunosa anche la raccolta di dati relativa all'area di necrosi (localizzazione, estensione, quadro radiografico, quadro scintigrafico, sintomatologia correlata). Nel corso di tutto il 2005 in tutto il mondo i casi di ONJ segnalati superano i 200 e tra la fine di quest'anno ed i primi mesi del 2006 compaiono le prime reviews (Markiewicz et al 2005 e Woo et al. 2006). I vari autori incominciano ad interrogarsi su cosa possa determinare, a parità di condizioni di salute orale e patologia di base, la comparsa delle lesioni osteonecrotiche. Viene analizzato quale sia il ruolo effettivo degli interventi iatrogeni a carico della ossa mascellari, rispetto ai soggetti che presentano lesioni "spontanee", inoltre viene discusso il ruolo dei traumi esercitati sulle mucose da parte degli elementi dentari e dei manufatti protesici (Vescovi 2007). I vari motori di ricerca nel 2006 identificano oltre 200 pubblicazioni, sono soprattutto presentati studi osservazionali su letteratura medica-oncologica ed ematologica. Sono presentati i fattori di rischio con le relative percentuali nelle diverse categorie di pazienti, ma l'attenzione del mondo scientifico si è posta soprattutto sulla gestione clinica dell'ONJ e delle

complicanze. Sono proposti nuovi approcci diagnostici, come la tomografia assiale computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (MRI), utili nel definire l'estensione di margini delle lesioni. Inoltre, con l'obiettivo individuare le lesioni nelle loro fasi iniziali, viene proposto l'utilizzo dell'analisi scintigrafica (Chiandussi et al. 2006). Le linee guida per il trattamento continuano a contrapporre trattamenti conservativi, che prevedono il mantenimento ad libitum della terapia medica ed interventi limitati sul tessuto osseo interessato dalla necrosi, ad interventi invasivi che prevedono ampie resezioni. L'ossigeno terapia iperbarica viene considerata, con parere unanime, inefficace mentre sono viste con interesse tutte quelle terapie volte a ridurre la componente flogistica delle lesioni (Vescovi et al. 2006). Non essendo possibile dimostrare, mediante analisi istologica, il raggiungimento di una guarigione, si tende a definire il "successo clinico" delle suddette terapie in termini di riduzione o scomparsa dei segni e sintomi della patologia ed il mantenimento dei risultati ottenuti per un ragionevole periodo di tempo (Vescovi 2007). Sempre a questo anno sono da ascrivere i primi convegni nazionali ed internazionali sull'ONJ, con l'obiettivo di informare la classe medica riguardo a questo potenziale evento avverso del trattamento con BPs. In questo stesso anno Zavras & Zhu, nell'intento di giustificare l'incidenza relativamente bassa dell'ONJ, propongono come probabile fattore di rischio le caratteristiche genotipiche dei pazienti. Negli ultimi due anni il numero di pubblicazioni è andato progressivamente aumentando ed ad oggi sono presenti su motori di ricerca indicizzati alla voce "Bisphosphonates AND Osteonecrosis" oltre 750 lavori di cui ben oltre 130 reviews. Nonostante la ricca letteratura presente ed il grande interesse suscitato in ambito medico da parte dell'ONJ, le conoscenze attuali risultano essere ancora limitate, infatti sebbene i fattori di rischio siano stati identificati non è ancora stato pienamente compreso il meccanismo patogenetico.

### 3.3.1. L'epidemiologia

Oltre 2 milioni di persone al mondo sono trattati con BPs per il controllo delle metastasi ossee o per la cura del mieloma. Il numero di soggetti, in trattamento con BPs, accresce ulteriormente se si considerano i milioni di persone affette da osteoporosi. Sulla base di questi dati il numero di ONJ segnalate in letteratura potrebbe apparire esiguo e quindi rappresentare un fenomeno trascurabile. La stima epidemiologica dell'ONJ è calcolata sulla base di dati incompleti e non è in grado di fornire un dato univoco riguardo all'incidenza, infatti questa varia dall'0.01% dei pazienti in trattamento con BPs per os ad oltre il 10% in alcuni studi retrospettivi su pazienti oncologici (Woo et al. 2006). La prevalenza esatta nei pazienti oncologici rimane incerta. Da una stima condotta recentemente in Australia, nel 2004 e nel 2005, la prevalenza di ONJ varia tra 0.88% e 1.15% nei pazienti oncologici, tra 0.26% e 1.8% per i pazienti affetti dal morbo di Paget e

tra 0.01% e 0.04% per i pazienti osteoporotici (Mavrokokki et al.2007). Le marcate differenze nell'incidenza dell'ONJ tra i pazienti oncologici e quelli che utilizzano i BPs per la terapia di altre patologie è imputabile ai diversi principi attivi utilizzati ed al diverso dosaggio degli stessi. Inoltre nei pazienti oncologici possono concorrere altri fattori di rischio rappresentati dalle concomitanti chemioterapie e da una aumentata suscettibilità all'infezioni. I pazienti con metastasi ossee sono comunemente trattati con zoledronato o sono passati dal trattamento con pamidronato a quello con zoledronato. Lo zoledronato è somministrato 4mg/mese nei pazienti oncologici, mentre nei pazienti osteoporotici è somministrato 4mg/anno. Questo giustifica la bassa incidenza annua di ONJ (1/100000) nei pazienti osteoporotici in terapia con BPs (Bertoldo et al. 2007). Ad oggi l'unico dato sicuro è che il rischio di sviluppare ONJ è sicuramente superiore per i pazienti in trattamento con BPs per via endovenosa. Riguardo al principio attivo, il rischio cumulativo di sviluppare ONJ è statisticamente più elevato nei pazienti in trattamento con zoledronato rispetto a quelli che hanno ricevuto trattamenti sequenziali o combinati con altri BPs, come il pamidronato e l'ibandronato. Nei pazienti affetti da mieloma multiplo il rischio aumenta di 9.5 volte nei pazienti in terapia con il solo zoledronato rispetto al pamidronato ( $p=0.042$ ) e di 4.5 volte rispetto al trattamento sequenziale con pamidronato e zoledronato ( $p=0.018$ ). Il rischio incrementa ulteriormente di 2.4 volte se il trattamento con zoledronato è combinato con la talidomide ( $p=0.043$ ) (Zervas et al. 2006). Un'altra variabile ampiamente analizzata in letteratura è stata la durata del trattamento con BPs e la dose cumulativa di farmaco assunto. Il rischio di sviluppare ONJ aumenta progressivamente con il numero di dosi assunte e ciò è determinato dalla lunga emivita del farmaco stesso. Sono descritte lesioni dopo soli 4 mesi di trattamento con zoledronato; la mediana oscilla dai 22 ai 39 mesi e la media dai 9 ai 14 mesi. Il rischio cumulativo è pari all'1% nel primo anno e sale al 21% dopo 3 anni per i pazienti trattati con zoledronato. Diversamente il rischio cumulativo nei pazienti trattati con pamidronato è 0% nel primo anno e 4% dopo 3 anni (Bertoldo et al. 2007). L'analisi delle variabili anagrafiche, età e sesso, sono dipendenti dalla diversa incidenza della patologia di base per cui si rende necessario il trattamento con BPs. Ciò giustifica una frequenza maggiore dell'ONJ (3:2) nelle donne rispetto agli uomini, poiché il carcinoma mammario e l'osteoporosi sono sicuramente più frequenti nel sesso femminile. L'età è variabile dai 37 agli 85 anni con una frequenza maggiore nei soggetti over 65 anni. Su questo dato è condizionato da co-morbidità correlate all'avanzamento dell'età, sia sistemiche che del cavo orale (Vescovi 2007). L'ONJ presenta anche incidenza diversa in relazione alla patologia di base del paziente. Questa è inoltre fortemente condizionata dalle diverse prognosi di vita di ogni singola patologia che porta alcuni pazienti ad essere esposti a maggiori dosi cumulative di farmaco. Per questa ragione analizzando i soggetti affetti da ONJ si ha una frequenza maggiore (50.1%) nel mieloma seguita da carcinoma mammario (42%), carcinoma prostatico (3.4%) e l'osteoporosi (2.5%) (Marx et al. 2005). Le lesioni interessano prevalentemente la mandibola (65%), il mascellare superiore è interessato nel 26% dei casi ed in alcuni casi sono descritte lesioni

interessanti entrambi i mascellari. Lesioni multifocali o bilaterali sono più frequenti nel mascellare superiore rispetto alla mandibola (Woo et al. 2006). La zona posteriore della mandibola è interessata più frequentemente dalle lesioni (65.5%) seguita dalla zona molare mascellare (22.7%). Le lesioni si presentano asintomatiche nel 31.1% dei casi, e la diagnosi risulta essere un reperto occasionale nel corso di visite odontoiatriche di routine. Nel 68.9% dei casi le lesioni sono associate ad esposizione ossea ed a dolore. Le lesioni possono essere complicate da motilità degli elementi dentari (23.5%), e fistole mucose o cutanee (17.6%). L'analisi radiografica è positiva nel 73.1% dei casi (Marx et al. 2005). L'86% dei pazienti affetti da ONJ riferisce di essere stata sottoposta a procedure iatrogene odontoiatriche nella sede della lesione (Ruggiero et al. 2006). Tuttavia secondo altri studi sono descritte lesioni spontanee in nel 39% dei casi (Marx et al. 2005).

### 3.3.2. I fattori di rischio

I potenziali fattori di rischio per lo sviluppo di ONJ sono molteplici e possono essere suddivisi in sistemici e locali.

#### - Fattori di rischio sistemici -

Nei pazienti oncologici i principali fattori sistemici sono rappresentati principalmente dalle concomitanti chemioterapie antitumorali, dalla terapia corticosteroidica e dalla terapia con farmaci ad attività anti-neoangiogenica (Ruggiero et al. 2006). Le terapie antitumorali determinano spesso una leucopenia a cui segue un aumento della suscettibilità alle infezioni ed il cavo orale dei pazienti sottoposti a queste terapie frequentemente è interessato da mucositi batteriche o micotiche (O'Brien et al. 2003). A questi fattori correlati alla patologia neoplastica, si aggiungono fattori propri del soggetto come età, malnutrizione, immunodepressione, disordini vascolari, diabete, abuso di alcool, tabagismo ed obesità. Tutti questi fattori sono in grado di compromettere la salute del cavo orale incrementando il rischio di sviluppare processi infettivi. Il fumo di sigaretta ha effetti sistemici sull'intero organismo umano ed in particolare a livello del cavo orale gli agenti carcinogeni determinano un ritardo nel processo di guarigione delle ferite delle mucose. Inoltre la nicotina incrementa la vasocostrizione a livello osseo che è coinvolta nel meccanismo patogenetico. L'obesità riscontrata nei pazienti affetti da ONJ, è un fattore al momento discusso poiché, le prolungate terapie con corticosteroidi portano ad un aumento ponderale dei pazienti ed inoltre i

pazienti oncologici obesi presentano una miglior prognosi di vita, quindi assumono nel corso della loro vita dosi cumulative maggiori di steroidi e chemioterapici (Wessel et al. 2008).

#### - Fattori di rischio locali -

I fattori locali come si è potuto evincere dall'analisi epidemiologica sono rappresentati da tutti i processi infettivi del cavo orale come: mucositi, gengiviti, parodontiti. Queste sono patologie facilmente riscontrabili nei pazienti oncologici, poiché i chemioterapici risultano tossici per la mucosa orale ed alterano la microflora del cavo orale (Sonis 1998). Frequentemente i pazienti oncologici presentano colonizzazione sub gengivale da parte di patogeni parodontali responsabili della malattia parodontale. In particolare la progressione della malattia parodontale è stata associata a specifici batteri parodontali patogeni come: *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* ed alcune forme di spirochete (Horz & Conrads 2007). Numerosi sono anche i batteri presenti durante le infezioni endodontiche dove possono comparire anche alcune specie di miceti (Gomes et al. 2004). Dalle ONJ i batteri più frequentemente isolati sono rappresentati dagli Actinomyces.

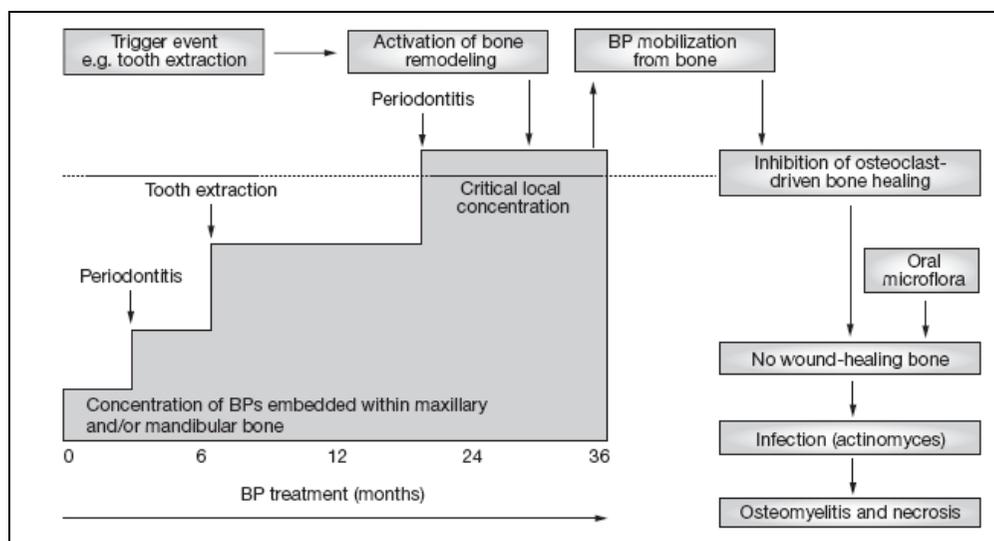
#### 3.3.3. La patogenesi

La caratteristica peculiare delle ONJ associate al trattamento con BPs è l'esclusiva localizzazione delle lesioni necrotiche a livello della mandibola e del mascellare superiore. In letteratura non sono descritte lesioni a carico di altri distretti anatomici e l'unica altra patologia che presenta aspetti morfologici simili all'ONJ indotta da BPs è l'osteoradionecrosi (Thiel 1989). Perciò, nell'analisi della patogenesi dell'ONJ, il primo quesito è: perché il trattamento con BPs è associato esclusivamente alla comparsa di lesioni osteonecrotiche a carico dei mascellari? La risposta a questa domanda è da ricercare nelle caratteristiche peculiari delle ossa mascellari e nelle proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche dei BPs. Il tessuto osseo dei mascellari, in particolare l'osso alveolare ed il periodonto sono dei siti scheletrici caratterizzati da un elevato turnover. Il mantenimento di un elevato grado di rimodellamento osseo, durante tutta la vita, è espressione della risposta dell'organismo ai continui stress meccanici, determinati dal movimento degli elementi dentari o dalla perdita degli stessi (Rody et al. 2001). In risposta alle forze meccaniche, gli osteociti e gli osteoblasti, all'interno del tessuto osseo

alveolare, attivano il rimodellamento osseo, liberando varie citochine che inducono la formazione e la maturazione di nuovi osteoclasti (Terai et al. 1999). Anche le cellule del legamento parodontale ed i fibroblasti gengivali presenti nel tessuto parodontale hanno un ruolo nell'osteoclastogenesi attraverso l'espressione del RANK-L (Receptor Activator Nuclear factor Kb-Ligand). In condizioni di stress meccanico è stato dimostrato che l'espressione di RANK-L, da parte delle cellule del legamento parodontale umano, aumenta (Kanzaki et al. 2002). Per la formazione degli osteoclasti da parte delle cellule mononucleate è necessaria l'interazione tra il recettore RANK, espresso dai precursori delle cellule osteoclastiche, ed il ligando RANK-L. Inoltre le cellule del legamento parodontale ed i fibroblasti gengivali secernono una certa quantità di osteoprotegerina, che è in grado di legare RANK-L, e quindi inibire l'osteoclastogenesi. Perciò le cellule del legamento parodontale ed i fibroblasti gengivali hanno un ruolo attivo nel mantenimento dell'equilibrio del turnover osseo a livello parodontale (Bertoldo et al. 2007). La livello dei mascellari il rimodellamento osseo aumenta al crescere dell'età, a causa dei processi flogistici, della malattia parodontale e di tutte quelle patologie sistemiche caratterizzate da un elevato turnover osseo (Tezal et al. 2005). La maggior parte della popolazione generale adulta è affetta da malattia parodontale di grado moderato e circa un quinto della stessa presenta un livello grave di malattia (Burt 2005). I pazienti oncologici a causa delle terapie sistemiche e delle condizioni psico-fisiche presentano numerosi foci infettivi a livello del cavo orale ed hanno un'incidenza ancor maggiore di malattia parodontale (López-Galindo et al. 2006). I BPs grazie alla struttura chimica, che li rende analoghi sintetici del pirofosfato inorganico, hanno una elevata affinità per il tessuto osseo e si legano preferenzialmente ai siti di attivo rimodellamento osseo. Dopo l'assorbimento da parte della superficie ossea, le molecole di BPs sono incorporata nella matrice ossea in formazione, e qui rimangono "dormienti" per un lungo periodo, senza interferire con il turnover osseo. Le molecole di BPs sono così immagazzinate nella matrice minerale ossea fino a quando il processo di rimodellamento osseo interesserà nuovamente questa area. È il pH acido creato dall'attività osteoclastica, all'interno delle lacune di riassorbimento, a determinare la nuova liberazione di molecole di BPs dalla superficie ossea e la loro endocitosi da parte degli osteoclasti stessi. Ciò spiega il mantenimento nel tempo degli effetti della terapia con BPs (Fleish 1998). Queste proprietà farmacologiche unite alle caratteristiche biologiche del tessuto osseo alveolare fanno sì che a livello dei mascellari si assorbano e si accumulino elevate quantità di BPs. Perciò l'elevate concentrazioni di principio attivo raggiunte a livello dei mascellari non sono unicamente il risultato delle elevate dosi e delle prolungate terapie con BPs. L'analisi epidemiologica dell'ONJ ha permesso di evidenziare come nella maggior parte dei casi le lesioni necrotiche insorgano a seguito di interventi iatrogeni o foci infetti dento-parodontale ( Marx et al. 2005 e Woo et al. 2006). In condizioni fisiologiche dopo un'avulsione di un elemento dentario od ogni altro intervento iatrogeno odontostomatologico, si crea una ferita ossea che nonostante la presenza di una ricca flora batterica solitamente guarisce spontaneamente senza complicanze

infettive. L'intervento iatrogeno determina nell'organismo una risposta infiammatoria iniziale che attiva il processo di rimodellamento osseo. Il processo di rimodellamento interessa la porzione superficiale del tessuto osseo ed è seguito da una fase di neoapposizione ossea da parte delle cellule osteoblastiche (Altundal & Güvener 2004). L'attività degli osteoclasti è essenziale per la guarigione del tessuto osseo ed è coinvolta nella regolazione dell'attività osteoblastica mediante la produzione di citochine e fattori di crescita. È ipotizzabile perciò che l'accumulo di BPs nel tessuto osseo alveolare, determinando l'apoptosi degli osteoclasti, rallenti il processo di guarigione ossea favorendo così l'instaurazione di un processo infettivo che porta prima ad una osteomielite e successivamente all'osteonecrosi (Bertoldo et al. 2007). (Figura 3.2.) Le lesioni osteonecrotiche indotte da terapia con BPs presentano aspetti e comportamento clinico simile all'osteoradionecrosi. Nell'osteoradionecrosi la patogenesi delle lesioni è determinata dall'ipossia, ipovascolarità e dall'ipocellularità. Alterazioni nel flusso ematico intraosseo sono stati proposti per la patogenesi di entrambe queste forme di necrosi. Questa ipotesi patogenetica è stata formulata esclusivamente sulla base dell'analisi dei campioni istologici di tessuto necrotico prelevata da pazienti in trattamento con BPs. Il flusso ematico a livello mandibolare e mascellare sarebbe alterato per l'effetto inibitorio che i BPs hanno nella neoangiogenesi intraossea (Migliorati et al. 2005, Bamias et al. 2005 e Woo et al.2006). Nonostante l'iniziale interesse che ha suscitato questa ipotesi patogenetica attualmente questa non risulta essere più supportata da un'adeguata letteratura. L'analisi istopatologica mostra come la necrosi non sia limitata unicamente alle aree che hanno subito un danno ischemico ma sia apprezzabile già nelle fasi di osteomielite dove invece la rete vascolare non risulta notevolmente alterata (Bertoldo et al. 2007). Inoltre la presenza di tessuto osseo vascolarizzato è stata rilevata a livello dei margini di resezione nei pazienti affetti da ONJ (Ruggiero et al.2004). Oltre a ciò, sempre l'analisi istologica di numerosi casi di ONJ, ha evidenziato come i canali vascolari risultino integri nonostante la presenza di infiltrato infiammatorio e crescita batterica. Gli autori riferiscono che i frammenti di tessuto osseo non vitale presentavano una evidente riduzione dell'azione osteoclastica ma non erano presenti alterazioni vascolari (Hellisten & Marek 2005).

Figura 3.2.



Meccanismo di accumulo progressivo dei BPs a livello delle ossa mascellari e ipotetico ruolo nella patogenesi dell'ONJ.

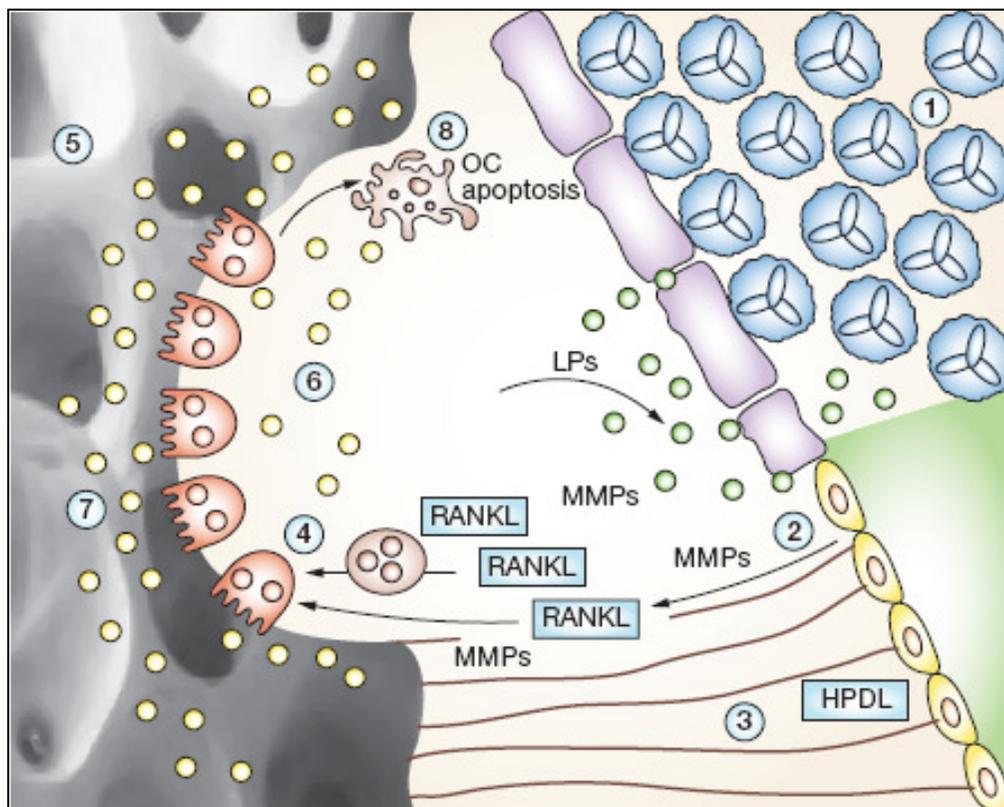
Tratta da: Bertoldo F, Santini D, Lo Cascio V. Bisphosphonates and osteomyelitis of the jaw: a pathogenic puzzle. *Nature Clinical practice Oncology* 2007;12(4):711-721.

Gli effetti antiangiogenetici dei BPs sono stati attualmente evidenziati unicamente in studi in vitro e su modello animale ma unicamente in tessuti patologici (Wood et al. 2002). In pazienti oncologici, il pamidronato e lo zoledronato hanno mostrato di ridurre i livelli circolanti di VEGF (Vasal Endothelial Grow Factor) (Fournier et al. 2002). Gli effetti antiangiogenetici dei BPs interessano principalmente i tessuti molli e non è stato dimostrato un loro effetto nell'inibizione della neoangiogenesi nel tessuto osseo assiale. Inoltre in tutti questi casi si trattava di tessuto patologico (Santini et al. 2002).

Ad oggi, la patogenesi delle ONJ, associate al trattamento con BPs, non è stata ancora completamente compresa, numerose sono le difficoltà che si incontrano nello studio di questa patologia, primo tra tutti la mancanza di un modello animale in cui poter valutare ed avvalorare le ipotesi sovra esposte. Sicuramente le nuove ricerche in campo della biologia molecolare e della farmacologia potranno riuscire a chiarire molti dei problemi relativi alla patogenesi che al momento risultano irrisolti. Tuttavia alla luce delle conoscenze attuali la prima delle ipotesi patogenetiche proposte è quella che riscontra il maggior consenso della letteratura ed è l'unica ad analizzare sia le

specifiche caratteristiche farmacologiche dei BPs che il ruolo scatenante è determinato dai processi infettivi o interventi iatrogeni. (Figura 3.3.)

Figura 3.3.



Rappresentazione schematica dell'interazione tra parodontite, BPs e tessuto osseo alveolare.

I batteri parodontopatogeni (1) liberano LPs e inducono le cellule del legamento parodontale (2) ad esprimere un gran numero di MMPs, che attivano la distruzione del legamento parodontale (3) e il RANK-L, che attiva gli osteoclasti (4), determinando così il riassorbimento osseo alveolare (5). I BPs (6) sono liberati dalla matrice ossea nella fase di rimodellamento (7) ed inibiscono l'azione degli osteoclasti e inducono l'apoptosi (8).

Modificata tratta da: Bertoldo F, Santini D, Lo Cascio V. Bisphosphonates and osteomyelitis of the jaw: a pathogenic puzzle. *Nature Clinical practice Oncology* 2007;12(4):711-721.

### 3.3.4. L'aspetto istologico

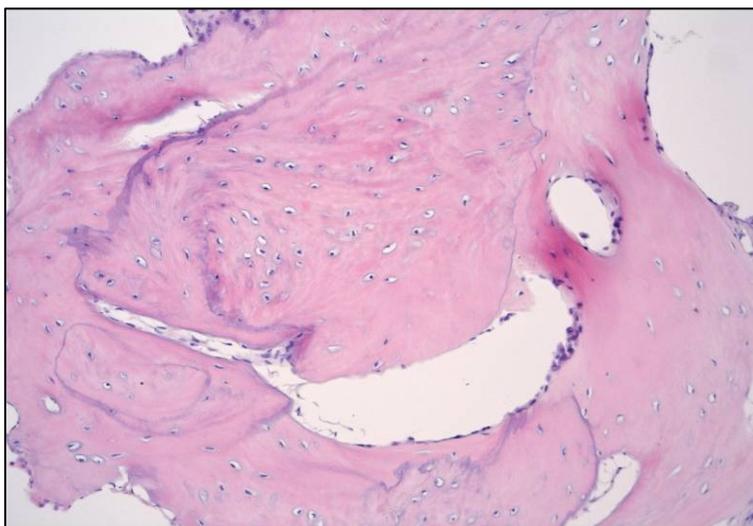
Le caratteristiche istopatologiche delle ONJ non sono ancora state definite esattamente. Ciò dipende fondamentalmente da due ragioni:

il prelievo biotico viene eseguito solitamente nelle fasi avanzate di malattia, cioè quando il processo infettivo ha già interessato le aree di tessuto osseo in necrosi;

il materiale prelevato è insufficiente, prevalentemente costituito da tessuto necrotico aspecifico e con scarso materiale proveniente dalle aree circostanti (Corradi et al. 2007).

L'analisi istologica di tessuto osseo sano, prelevato a livello dei mascellari, mostra un tessuto costituito da un insieme di lamelle ossee, al cui interno sono apprezzabili lacune ossee occupate da osteociti, inoltre è ben evidenziabile il periostio e l'endostio. In relazione alla sede di provenienza del campione di tessuto, il rapporto tra corticale e midollare varia, risultando essere generalmente maggiore per i campioni prelevati in sede mandibolare. (Figura 3.4.)

### Figura 3.4

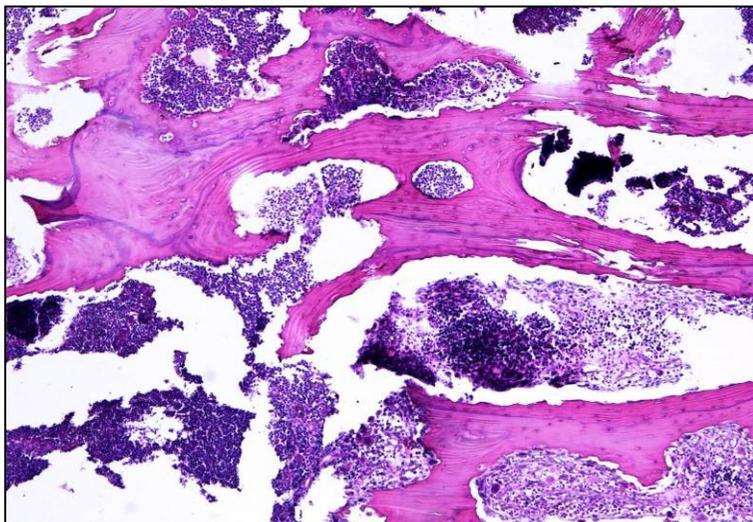


**Immagine istologica ematossilina-eosina 10X:** il tessuto osseo è ricco di lacune osteocitarie con all'interno osteociti, è ben evidenziata anche la componente endosteale attorno alle lamelle ossee. (Immagine: Prof.ssa Fontanini G. Anatomia Patologia III, Università di Pisa)

L'analisi di campioni di tessuto provenienti da aree di necrosi si presentano come multiple aree di osso necrotico che racchiudono nidi di tessuto osseo vitale. Questa è una caratteristica delle lesioni indotte da BPs, infatti nell'osteoradionecrosi il tessuto osseo necrotico appare omogeneo (Hansen et al. 2006). A maggiore ingrandimento sono apprezzabili numerose lacune osteocitarie vuote e la componente endostale e periostale non sono evidenziabili. Le aree di necrosi sono circondate da un ricco infiltrato infiammatorio, costituito prevalentemente da granulociti neutrofili e spesso sono presenti anche linfociti e plasmacellule. A questo infiltrato infiammatorio

si affianca una fibrosi degli spazi midollari (Markiewicz et al. 2005 e Dannemann et al. 2006). (Figura 3.5.-3.6.)

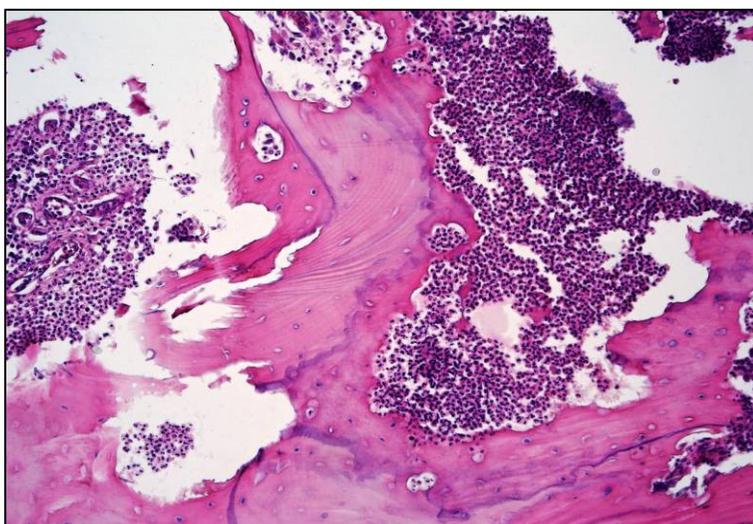
**Figura 3.5.**



**Immagine istologica ematossilina-eosina 5X:** nel tessuto osseo è presente un ricco infiltrato di polimorfonucleati che evidenzia lo stato di osteomielite, tipico delle prime fasi dell'osteonecrosi.

(Immagine: Prof.ssa Fontanini G. Anatomia Patologia III, Università di Pisa)

**Figura 3.6.**

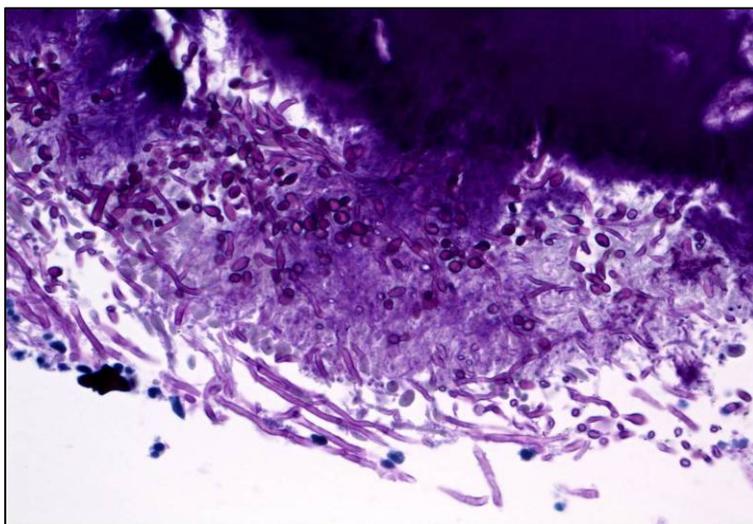


**Immagine istologica ematossilina-eosina 10X:** il maggiore ingrandimento mostra lacune osteocita rievuote e negli spazi inter-lamellari è presente un ricco infiltrato infiammatorio.

(Immagine: Prof.ssa Fontanini G. Anatomia Patologia III, Università di Pisa)

Numerosi studi hanno rilevato la presenza di colonie di *Actinomyces* all'interno dei campioni di tessuto necrotico. Queste colonie batteriche formano, in cultura, tipici granuli giallo sulfureo e nei tessuti biologici sono ben evidenziabili con la colorazione di Grocott o con la reazione PAS (Hansen et al. 2006). Le colonie sono più facilmente identificabili nei frammenti ossei necrotici che presentano forti segni di erosione. In questi campioni con ricca contaminazione batterica, il tessuto osseo non è facilmente demarcabile ed i suoi contorni appaiono fortemente irregolari. Talvolta i filamenti batterici si presentano frammisti ad un ricco infiltrato infiammatorio costituito principalmente da granulociti neutrofili (Woo et al. 2006). (Figura 3.7.)

### Figura 3.7.



**Immagine istologica con reazione PAS 40X:** a forte ingrandimento sono ben evidenziabili le colonie di *Actinomyces*. Presentano la tipica forma filamentosa a sezione circolare.

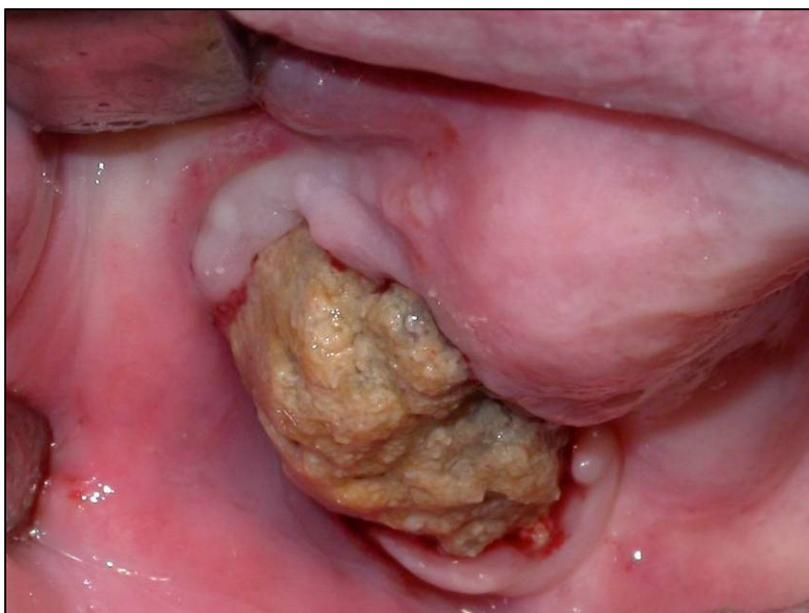
(Immagine: Prof.ssa Fontanini G. Anatomia Patologia III, Università di Pisa)

#### 3.3.5. Gli aspetti clinici

Le ONJ indotte da BPs si presentano tipicamente come aree di esposizione tessuto osseo di colorito giallo bruno, ricoperte da una patina muco-purulenta,

circondate da una mucosa dall'aspetto iperemico (Graziani et al .2006). (Figura 3.8.)

**Figura 3.8.**



**Tipico aspetto clinico delle ONJ indotte da BPs**

Tratta da: Graziani F, Cei S, La Ferla F, Cerri E, Itró A, Gabriele M. Association between osteonecrosis of the jaws and chronic high dosage intravenous bisphosphonates therapy: a case series. *J Craniofac Surg.* 2006 Sep;17(5):876-879.

I quadri clinici sono estremamente variabili, da piccole lesioni endodontico-parodontali ad estese aree interessanti l'intero corpo mandibolare e/o l'osso mascellare (Marx et al. 2005). Queste lesioni diventano sintomatiche quando il processo infettivo si diffonde a tessuti molli circostanti. Segni e sintomi precoci dello sviluppo di una lesione osteonecrotica sono, dolore, mobilità dentale, tumefazione delle mucose, eritema ed ulcerazioni (Ruggiero et al. 2006). Le lesioni possono interessare entrambi i mascellari, tuttavia la mandibola è interessata con frequenza maggiore rispetto al mascellare superiore. In alcuni casi si può avere l'interessamento contemporaneo di entrambi i mascellari o la presenza di lesioni multifocali.

Clinicamente le lesioni possono essere classificate in:

piccole lesioni intra-orali;

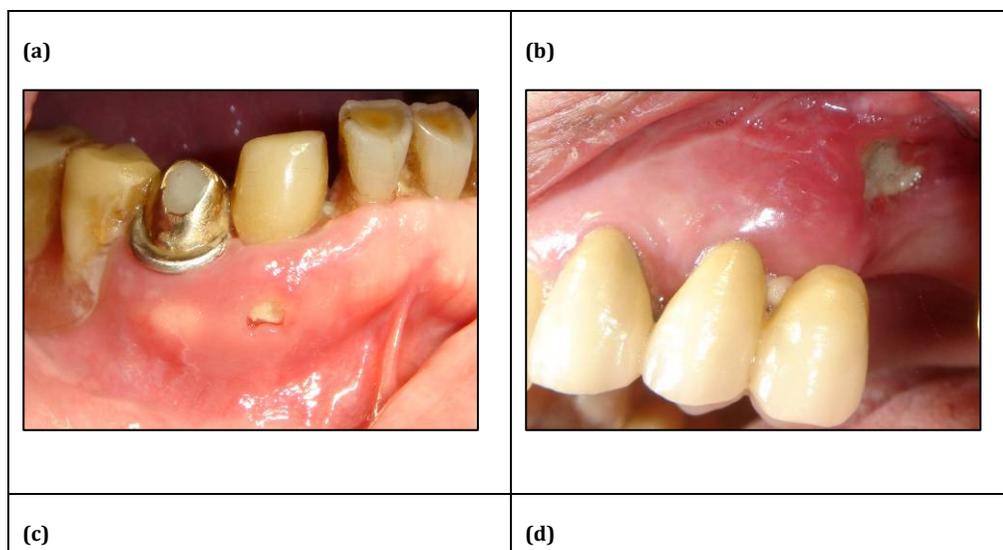
grandi lesioni intra-orali;

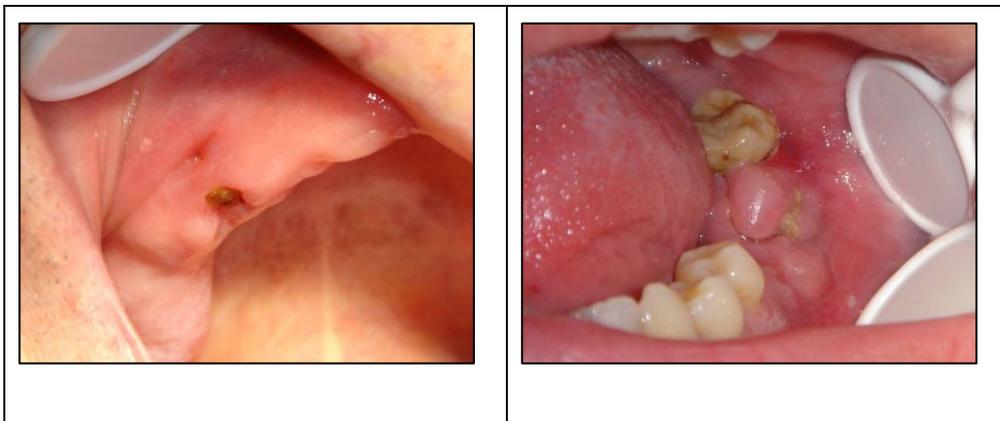
grandi lesioni, con interessamento dei tessuti extra-orali.

- Piccole lesioni intra-orali -

Sono generalmente associate a scarsa sintomatologia algica e possono rimanere asintomatiche per lunghi periodi di tempo (settimane, mesi). Frequentemente questo tipo di lesioni rappresentano un reperto casuale nel corso di una visita odontostomatologica, talvolta il paziente può avvertirne la presenza unicamente percependo una certa ruvidità o irregolarità in aree mucose dei processi alveolari. Le lesioni diventano sintomatiche quando il processo flogistico aumenta ed interessa i tessuti molli vicini e la mucosa adiacente all'area di necrosi appare edematosa circondata da un orletto eritematoso (Graziani et al. 2006). (Figura 3.9.) In alcuni casi la sintomatologia precedere la manifestazione clinica e radiografica delle lesioni. I disturbi possono così essere facilmente confusi con banali odontopatie e come tali erroneamente trattati dall'odontoiatra. Al persistere della sintomatologia, nonostante le cure conservative effettuate, è quando lo specialista procede ad effettuare l'avulsione dell'elemento dentario interessato che la necrosi si palesa come mancata guarigione del sito estrattivo (Manfredi & Vescovi 2007).

**Figura 3.9.**



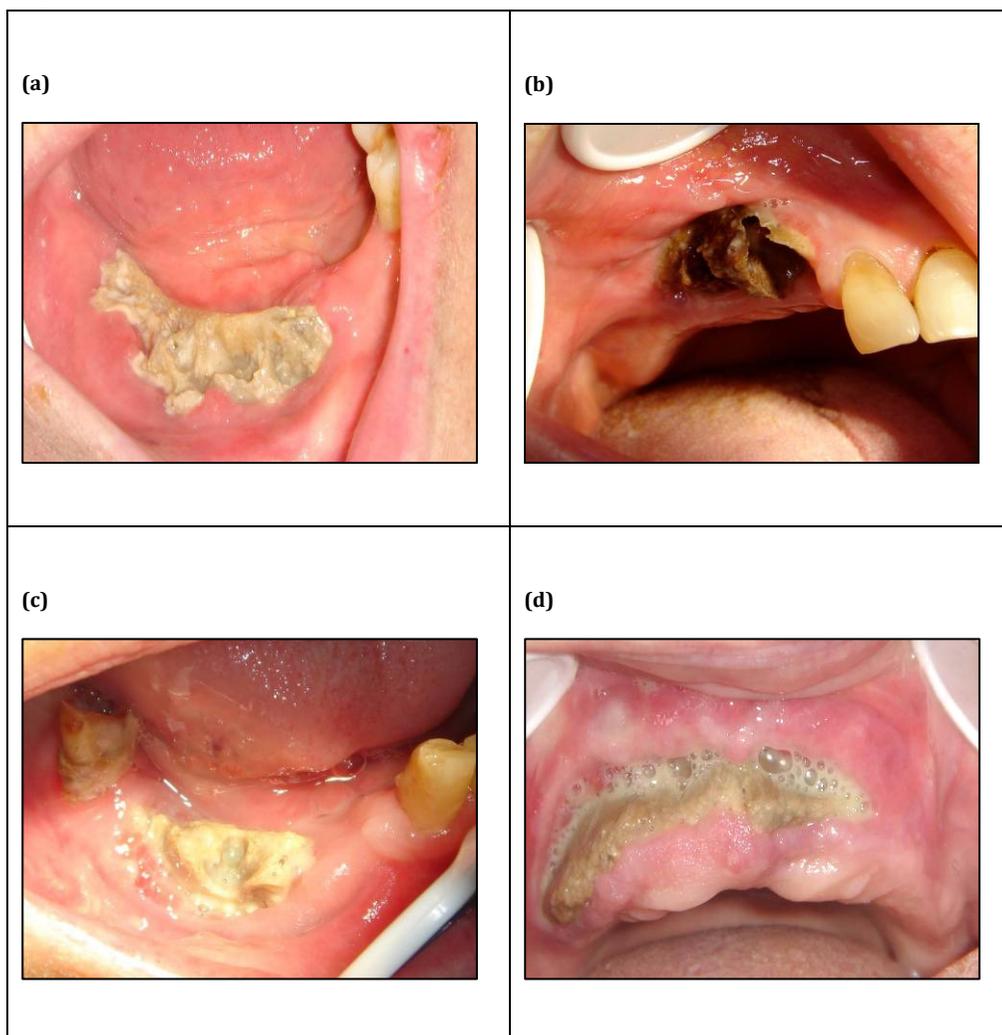


**Immagini cliniche di piccole lesioni osteonecrotiche:** (a-b) aree di esposizione ossea localizzata in sede vestibolare in pazienti parzialmente edentuli; (c) limitata area di esposizione ossea con associata fistola mucosa, in paziente edentulo; (d) necrosi ossea posta estrattiva.

(Immagine: Prof. Gabriele M. Dip. Chirurgia, Cattedra di Chirurgia Odontostomatologica, Università di Pisa)

#### - Grandi lesioni intra-orali -

Fanno parte di questo gruppo le lesioni che interessano ampie porzioni della cresta alveolare e del tessuto osseo basale. Sono generalmente associate ad una franca sintomatologia e raramente sono un reperto casuale nel corso di visite odontostomatologiche. La superficie ossea si presenta irregolare e spesso con margini taglienti che facilmente traumatizzano i tessuti molli linguali creando delle ulcerazioni mucose estremamente dolorose. Ciò può compromettere notevolmente la capacità fonatoria e di alimentarsi di questi pazienti, compromettendo ulteriormente la loro qualità di vita. Inoltre a queste lesioni si associa molto frequentemente fetor ex-ore, che porta all'emarginazione di questi pazienti sia nelle strutture sanitarie che all'interno della famiglia stessa. L'evidenza del quadro clinico rende la diagnosi di queste lesioni semplice (Graziani et al. 2006 e Woo et al. 2006). (Figura 3.10.)

**Figura 3.10.**

**Immagini cliniche di grandi lesioni osteonecrotiche:** **(a)** ampia area di esposizione interessante la sinfisi mandibolare e parte del corpo mandibolare di destra; **(b)** lesione post-estrattiva in zona 13-14, notare il tipico aspetto bruno delle lesioni dovuto alla contaminazione micotica **(c)** lesione localizzata in sede post-estrattiva di 43; **(d)** estesa area di necrosi ossea interessante il mascellare superiore di paziente edentula.

(Immagini: Prof. Gabriele M. Dip. Chirurgia, Cattedra di Chirurgia Odontostomatologica, Università di Pisa)

Il processo di necrosi tende ad estendersi interessando gli elementi dentari vicini, determinandone un aumento della motilità e la necessità di successive avulsioni. La progressione può portare alla formazione di sequestri ossei o a quadri flogistici di osteomielite con formazione di raccolte ascessuali e fistole mucose.

Quando le lesioni localizzate a livello mandibolare comprendono porzioni dell'osso basale si può avere l'interessamento del canale mandibolare con la comparsa di parestesia o anestesia dell'emilabbro corrispondente (Max et al. 2005, Ruggiero et al. 2004 e Manfredi & Vescovi 2007).

- Grandi lesioni con interessamento dei tessuti extra-orali -

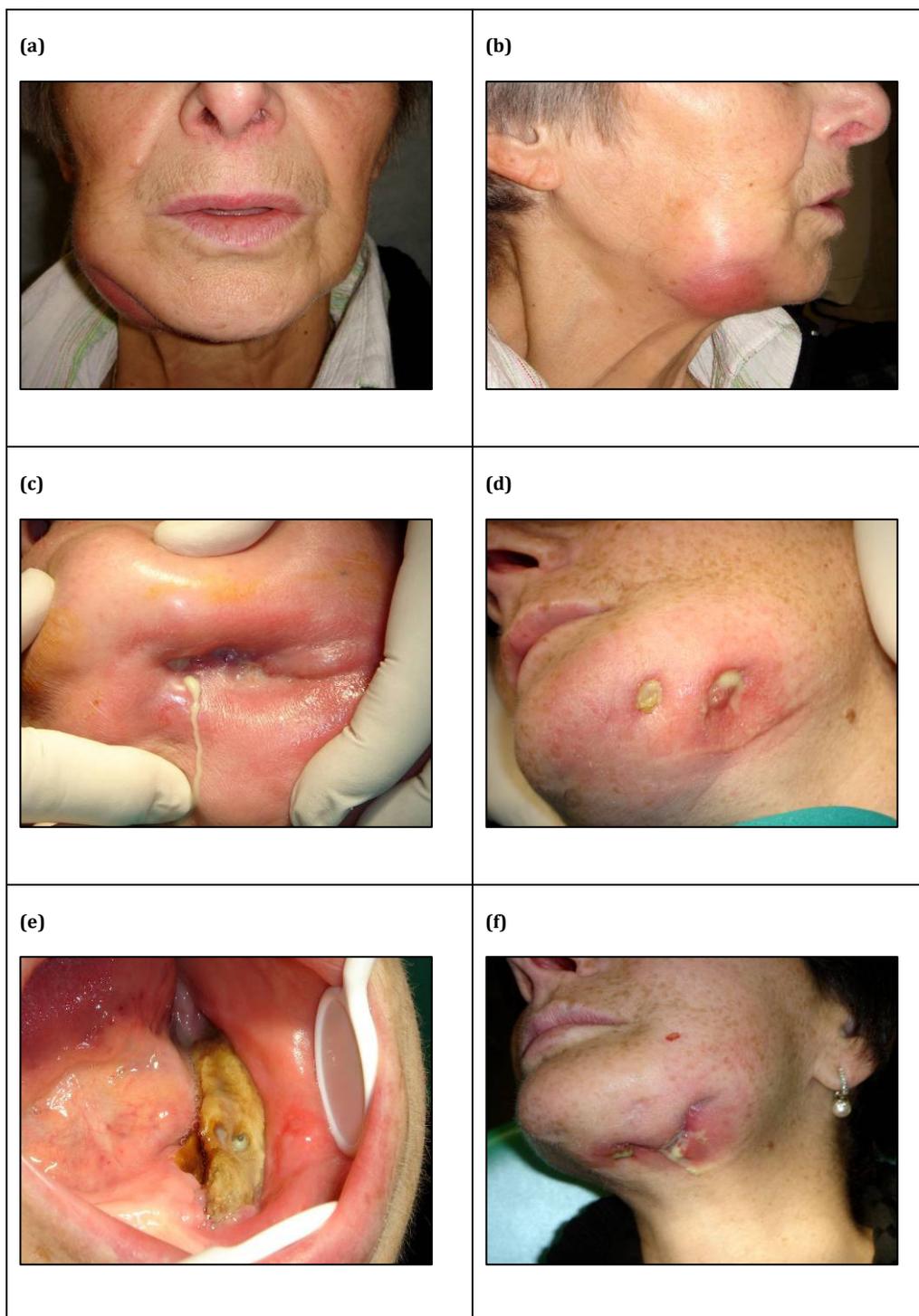
Quando le lesioni sono riconosciute tardivamente o quando si ha un compromissione della salute generale del paziente si può avere l'interessamento di strutture anatomiche e tessuti extra-orali. Il progressivo estendersi dell'area di necrosi e la diffusione dell'infezione possono determinare ascessi o flemmoni, sinusiti mascellari, fistole cutanee o mucose e fratture patologiche (Markiewicz et al. 2005). Queste lesioni sono caratterizzate da una marcata sintomatologia, i pazienti possono presentare difficoltà nella deglutizione e nella fonazione, malessere e febbre. Il dolore è difficilmente gestibile con i comuni antidolorifici e talvolta rende necessario l'instaurazione di una terapia antalgica con farmaci ad azione centrale sul sistema nervoso. Un sintomo frequente nelle lesioni inveterate che interessano la mandibola è rappresentato dalla perdita di sensibilità dell'emilabbro a causa dell'interessamento del canale alveolare e dalla frattura spontanea. Questa rappresenta una temibile complicanza che si può verificare a seguito dei microtraumi masticatori o a seguito di interventi iatrogeni per rimuovere il tessuto necrotico (Manfredi & Vescovi 2007).(Figura 3.11.-3.12.)

**Figura 3.11.**



**L'immagine radiografica (OPT) evidenzia la frattura interessante il corpo mandibolare di destra.**  
(Immagini: Prof. Gabriele M. Dip. Chirurgia, Cattedra di Chirurgia Odontostomatologica, Università di Pisa)

**Figura 3.12.**



**Immagini cliniche di lesioni necrotiche con interessamento dei tessuti extra-orali: (a-b) raccolta ascessuale localizzata in latero-mandibolare di destra secondaria a lesione osteonecrotica in sede 35-33; (c)**

grande fistola sottomandibolare, secondaria a lesione interessante l'intero emi-corpo mandibolare di sinistra, la spremitura determina la fuoriuscita di materiale purulento; **(d)** fistole localizzate in sede sottomandibolare sinistra; **(e)** quadro clinico intra-orale di **(d)**, ampia area di esposizione ossea con evidente l'interessamento del canale mandibolare; **(f)** evoluzione a 360 giorni del caso **(d-e)**, si è creato un terzo traffitto fistoloso ed è presente abbondante essudato purulento.

(Immagine: Prof. Gabriele M. Dip. Chirurgia, Cattedra di Chirurgia Odontostomatologica, Università di Pisa)

### 3.3.6. La diagnostica per immagini

L'attuale sviluppo raggiunto dalle tecniche di diagnostica per immagini permette di analizzare sia gli aspetti morfologici che funzionali delle lesioni. Tuttavia la diagnosi di ONJ è puramente clinica e l'analisi radiologica dovrebbe essere utilizzata per confermare il sospetto diagnostico. Le tecniche da utilizzare come screening iniziale sono l'ortopantomografia (OPT) e la scintigrafia mentre la tomografia assiale computerizzata (TC) o la risonanza magnetica nucleare (RM) dovrebbero essere impiegate per approcci avanzati in casi che richiedono ulteriori diagnosi differenziali. Le tecniche di analisi morfologica comprendono OPT, TC e RM, quelle di analisi metabolica la scintigrafia e la tomografia ad emissione di positroni.

#### - Tecniche di analisi morfologica -

Tra le tecniche di analisi morfologica la più utilizzata nella pratica clinica odontostomatologica è l'OPT. È una tecnica di indagine diffusa, rapida che permette di analizzare l'intera cavità orale in un singolo tempo. La radiologia non permette di distinguere una lesione necrotica da una metastatica tuttavia è utile per analizzare gli aspetti osteolitici od osteosclerotici delle lesioni. L'OPT permette di analizzare la struttura trabecolare della midollare ossea e la presenza di aree di fibrosi midollare caratterizzate da un incremento di densità ossea. Tipicamente, le lesioni necrotiche possono apparire come sequestri localizzati all'interno della struttura midollare. Inoltre l'OPT è estremamente utile nella fase prevenzione permettendo l'individuazione dei foci infettivi ossei. (Figura 3.13.)

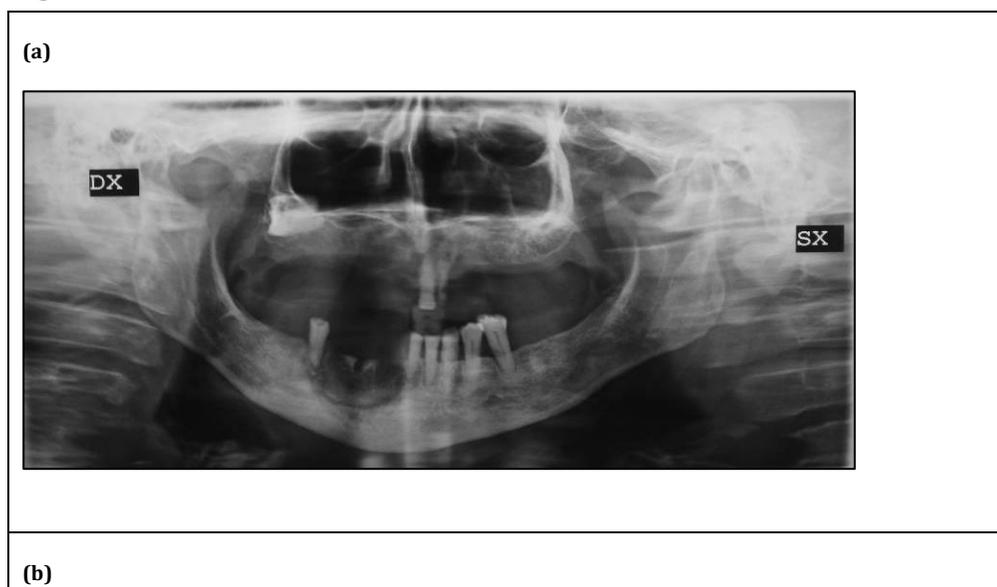
Il più grosso limite dell'OPT è rappresentato dalla bidimensionalità dell'immagine che rende difficile individuare i margini tra tessuto necrotico e osso sano. Nonostante ciò il mondo scientifico internazionale è unanime nell'affermare che l'OPT rappresenta l'indagine strumentale di prima linea di estrema utilità diagnostica (Rizzoli et al. 2008).

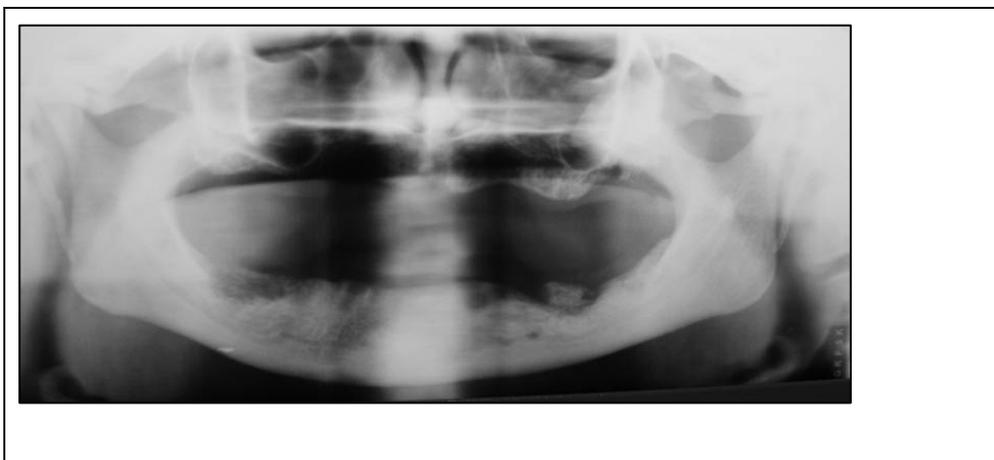
Tra le tecniche di indagine morfologica avanzata un ruolo importante è oggi svolta dalla TC. Questa tecnica permette di identificare con cura le alterazioni presenti all'interno del tessuto osseo dei mascellari e di identificare una

risposta periosteale o dei tessuti molli. La TC permette di superare i limiti dell'OPT ed è in grado di fornire eccellenti immagini anatomico-topografiche delle strutture degli organi e dei margini ed estensione delle lesioni. Le lesioni osteonecrotiche possono apparire come aree di osteolisi o di osteosclerosi in relazione allo stadio della malattia. Le aree di tessuto osseo ad alta densità caratterizzano le aree di necrosi mentre le aree di lisi sono caratteristiche dell'area infetta con raccolte purulente ed edema. Inoltre oggi i nuovi programmi di rielaborazione tridimensionale dell'immagine permettono di effettuare un accurato planning pre-operatorio e risultano estremamente utili per il chirurgo. (Figura 3.14.) Tuttavia la diagnosi differenziale tra osteolisi benigna o secondaria a metastasi è difficile da condurre con l'utilizzo della TC.

La RM è stata utilizzata in ambito odontostomatologico prevalentemente per lo studio dell'articolazione temporo-mandibolare. Le moderne tecniche sono in grado di fornire immagini della midollare ossea mandibolare e mascellare, della polpa dentaria e del canale mandibolare. I sequestri ossei appaiono come aree scure a contorni ben definiti. I maggiori vantaggi della RM sono la possibilità di analizzare i tessuti limitrofi e la possibilità di diagnosticare l'osteomielite iniziale, infatti le tecniche ad elevata risoluzione di contrasto nell'immagini pesate T1 sono significativamente più sensibili e più specifiche della scintigrafia nella diagnosi di osteomielite (Chiandussi et al. 2006 e Rizzoli et al. 2008).

**Figura 3.13.**

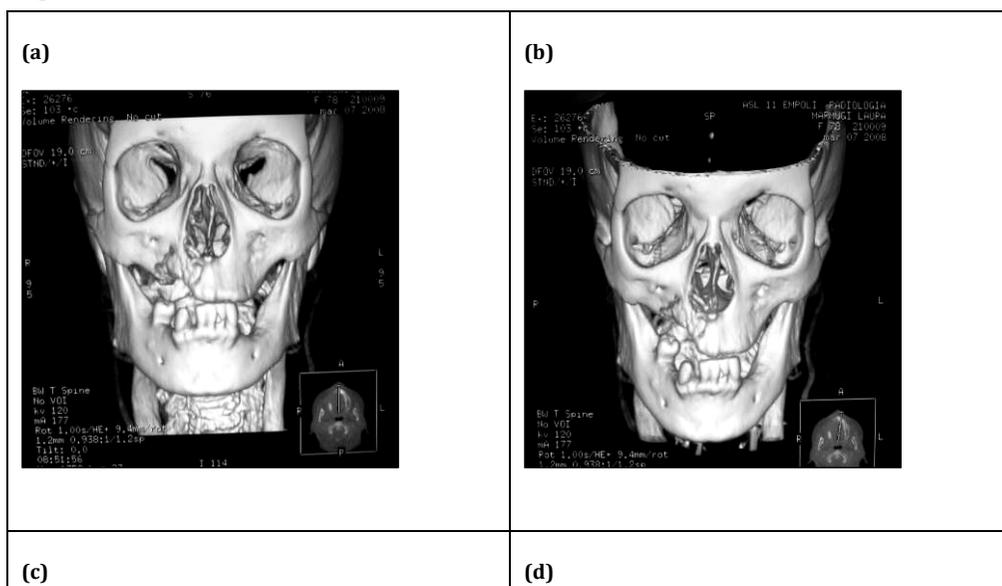


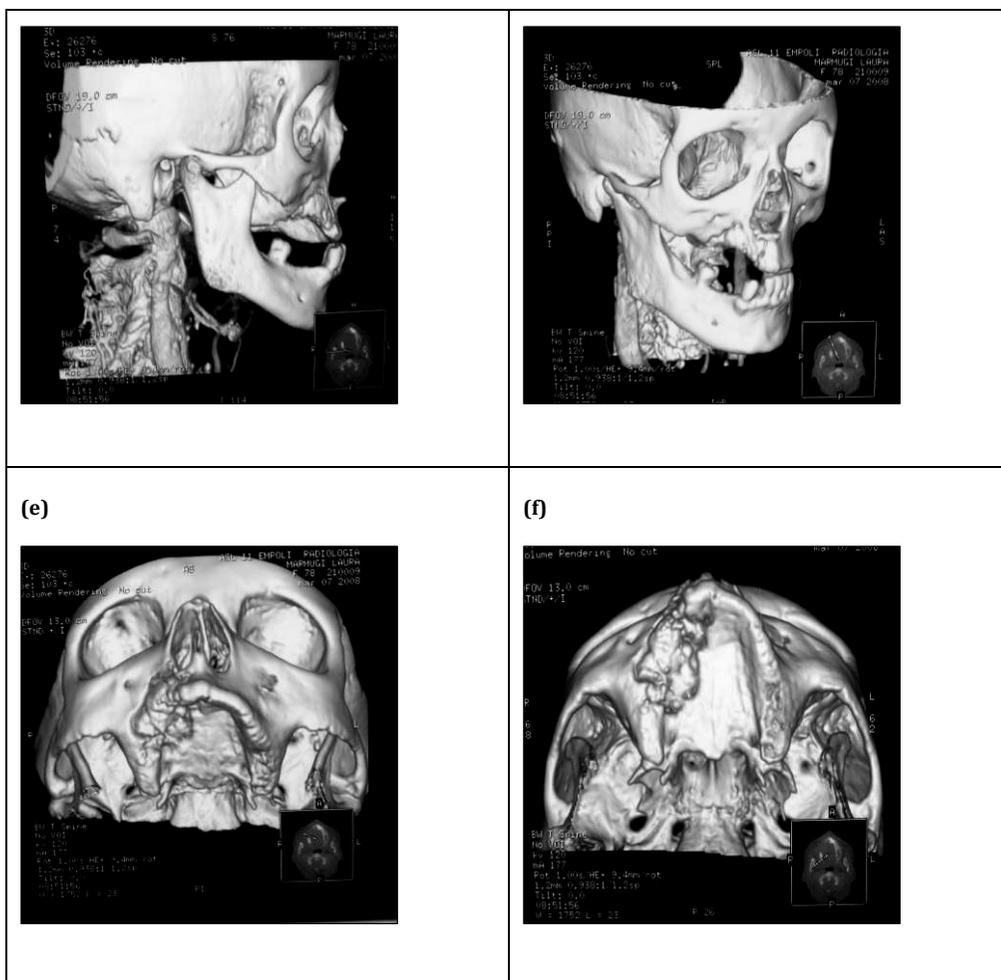


**Immagini radiografiche di lesioni osteonecrotiche:** (a) l'OPT mette in evidenza una estesa area di necrosi localizzata in sede post-estrattiva di 42 e 43, è ben evidente un orletto radiotrasparente che demarca i confini della lesione; (b) paziente totalmente edentula prese tenta all'OPT un sequestro osseo localizzato in sede mandibolare sinistra, notare come il margine superiore del corpo mandibolare risulti fortemente rimaneggiato con alternanza di aree sclerosi e di lisi.

(Immagini: Prof. Gabriele M. Dip. Chirurgia, Cattedra di Chirurgia Odontostomatologica, Università di Pisa)

**Figura 3.14.**





**Immagini TC con ricostruzione tridimensionale di lesioni necrotica in zona mascellare superiore destro: (a-b)** visioni sul piano frontale, mostra come la lesione si estenda cranialmente fino ad interessare la porzione inferiore dell'apertura piriforme; **(c-d)** visioni sul piano laterale, è apprezzabile l'estensione della lesione in senso antero-posteriore; **(e-f)** visioni sul piano orizzontale, evidenziano l'interessamento della porzione di palato duro da parte della lesione necrotica.

(Immagini: Prof. Gabriele M. Dip. Chirurgia, Cattedra di Chirurgia Odontostomatologica, Università di Pisa)

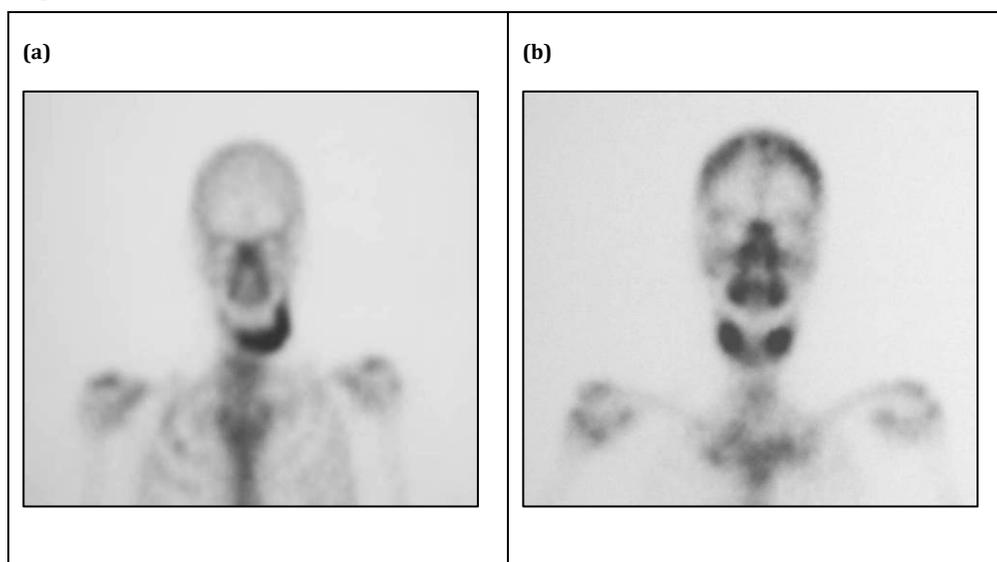
#### - Tecniche di analisi metabolica -

L'analisi metabolica è volta ad evidenziare aree del tessuto osseo che presentano alterazioni del fisiologico processo di turnover osseo. Tra queste tecniche la scintigrafia ossea con tecnezio 99 (TC-99) è altamente sensibile nell'individuazione delle aree ad elevato rimodellamento osseo. Pur essendo altamente sensibile la scintigrafia ossea presenta il limite di avere una bassa specificità. Infatti a livello dei mascellari sono frequenti aree di ipercaptazione associate a processi infettivi endodontico-parodontali per cui si rende

necessaria una diagnosi differenziale dalle lesioni osteonecrotiche. (Figura 3.15.)

La tomografia ad emissione di positroni è una tecnica ancor più sensibile che permette di individuare l'osteomielite (acuta e cronica) con elevata accuratezza già nelle primissime fasi. Le cellule infiammatorie, come i neutrofilii ed i macrofagi attivati, presenti nell'area di infiammazione, acuta o cronica, assorbono il farmaco marcato a causa della loro elevata attività ed appaiono come aree di accumulo (Chiandussi et al. 2006 e Rizzoli et al. 2008).

**Figura 3.15.**



**Immagini scintigrafiche con Tc-99 di lesioni osteonecrotiche: (a)** estesa area di ipercaptazione interessante l'intero corpo mandibolare di sinistra; **(b)** lesione bilaterale a livello mandibolare.

(Immagini: Prof. Gabriele M. Dip. Chirurgia, Cattedra di Chirurgia Odontostomatologica, Università di Pisa)

### 3.3.7. La prevenzione dell'osteonecrosi dei mascellari

Il largo impiego della terapia con BPs, le sue innumerevoli indicazioni e le posologie estremamente variabili rendono necessario da parte dell'odontoiatra un approccio specifico e diverso di fronte ad ogni quadro clinico. Recentemente una "task force" creata dall'American Society for Bone and Mineral Research ha concluso che le conoscenze del mondo scientifico riguardo all'ONJ sono ancora limitate e pertanto non è ancora possibile formulare delle linee guida evidence-based. Tuttavia la prevenzione e la cura della salute del cavo orale, nei pazienti

che assumono BPs, è raccomandata in modo univoco (Khosla et al. 2007). E' tuttavia possibile tracciare delle caratteristiche comuni a molteplici scenari clinici. Nella prevenzione possiamo trovarci di fronte a due situazioni cliniche:

pazienti in attesa di intraprendere terapia con BPs;

pazienti in terapia con BPs senza evidenza di ONJ.

- Pazienti in attesa intraprendere terapia con BPs -

Scopo della gestione del paziente in attesa di essere sottoposto a terapia con BPs è quello di evidenziare ogni potenziale processo infettivo a carico dei tessuti dentari e/o parodontali. E' necessario quindi sottoporli a visita odontoiatrica completa ed esame radiografico mediante ortopantomografia. Infatti, nel determinismo dell'ONJ riveste un ruolo particolare l'alterazione del metabolismo osseo a causa dell'inibizione di cellule osteoclastiche e osteoblastiche. Questo fenomeno, in presenza di un processo infiammatorio caratterizzato da inibizione di cellule infiammatorie quali i macrofagi può evolvere verso ONJ. Pertanto, è necessario diagnosticare e prevenire la diffusione di un eventuale processo settico dal cavo orale ad i tessuti duri attraverso i canali radicolari e il legamento parodontale. In presenza di potenziali foci infettivi endodontico-parodontali la terapia mirerà alla loro eliminazione. Le terapie di decontaminazione batterica del cavo orale (terapie endodontiche, parodontali ed estrattive) dovrebbero essere effettuate nel periodo di tempo che intercorre tra la prima visita e l'inizio della terapia con BPs. Il rischio di lasciare patologie infettive non può essere sottostimato in tali pazienti dunque è raccomandata una maggiore severità diagnostica nel delineare il piano di trattamento. In particolare gli elementi dentari a prognosi incerta dovrebbero essere estratti senza tentare approcci di tipo conservativo a dubbia predicibilità di successo. Gli interventi odontostomatologici possono essere molteplici e spesso richiedere del tempo per accertarne l'efficacia. Una delle problematiche maggiori nella gestione del piano di trattamento è la nulla o limitata procrastinabilità delle terapie con BPs, visto il grave quadro patologico di base. Pertanto è auspicabile una stretta collaborazione fra l'oncologo e l'odontostomatologo per determinare l'inizio della terapia con BPs e le tempistiche del trattamento odontostomatologico. Idealmente questa collaborazione dovrebbe basarsi su corrispondenza scritta. Il rapporto rischio-beneficio di posporre l'inizio della terapia con BPs in queste circostanze cliniche non è stato ancora valutato in modo sistematico. Pertanto nello scegliere le terapie sono da preferirsi quelle radicali a più rapida risoluzione, come le estrazioni, piuttosto che le conservative che, al di là della minore

predicibilità, allungherebbero i tempi di guarigione. Solo nei casi in cui la terapia possa essere effettivamente procrastinabile può essere valutato un approccio meno invalidante. Per quanto concerne le terapie odontoiatriche chirurgiche, quali ad esempio un'estrazione dentaria, non è possibile evincere dalla letteratura se sia necessario effettuare profilassi antibiotica (Gabriele et al. 2008). La terapia con BPs dovrebbe iniziare nel momento in cui tutti i processi di intenso rimaneggiamento osseo devono essere considerati completati. Alcuni autori suggeriscono che si abbisogni di 3 mesi da un'estrazione per ritornare ad un'attività ossea metabolica di base. Tuttavia, nel caso in cui non si possa aspettare questo tempo dall'ultima estrazione, si consiglia almeno un mese di attesa visto che i maggiori processi di guarigione avvengono nelle prime 4 settimane (Cardaropoli et al. 2003).

- Pazienti in terapia con BPs senza evidenza di ONJ -

Lo scopo della gestione del paziente già sottoposto a terapia con BPs è quello di evitare ogni atto cruento che possa determinare stimolo per rimodellamento osseo. I pazienti sottoposti a terapia con BPs sono pazienti come tutti gli altri, pertanto possono sottoporsi a tutte le terapie odontostomatologiche evitando però ogni procedura che determini l'attivazione dei processi di guarigione ossea. Al contrario della fase precedente, le estrazioni e gli interventi radicali o d'elezione dovrebbero essere il più possibili evitati. In caso di lesioni dento-parodontali, anche destruenti, la terapia conservativa rappresenta la prima scelta infatti, ad ogni procedura chirurgica si associa un maggiore rischio di sviluppo di lesioni osteonecrotiche (Migliorati et al. 2005 e Ruggiero et al. 2006). Pertanto, se necessario è possibile ricorrere a terapie "eroiche". Ad esempio, qualora un elemento dentario non risultasse recuperabile è consigliabile eseguire un'amputazione coronale con successiva terapia endodontica e mantenimento delle radici sommerse piuttosto che l'estrazione. La ferita alveolare, infatti, potrebbe rappresentare un locus minoris resistentiae per l'incapacità di ricreare una rete vascolare adatta alla sua guarigione (Wood et al. 2002). Nei pazienti portatori di protesi removibili, sia totali che parziali, devono essere controllate le condizioni dei tessuti molli al disotto dei manufatti stessi, per evitare decubiti che possono esitare in lesioni alle mucose ed al sottostante tessuto osseo (Marunick et al. 2006). E' consigliabile ribasare il manufatto frequentemente per evitare qualsiasi tipo di compressione che potrebbe provocare dei microtraumi. Infatti, la letteratura evidenzia, come una piccola percentuale di pazienti, portatori di protesi fissa o mobile, senza alcuna causa apparente sviluppi lesioni osteonecrotiche (Marx et al. 2005). E' possibile che protesi incongrue agiscano, durante la masticazione, determinando delle microfratture ossee che in pazienti in terapia con BPs non evolvono verso la guarigione spontanea. Qualora non fosse possibile procrastinare od evitare l'estrazione, come nel caso di espulsione infettiva dell'elemento dentario è

necessario effettuare l'intervento sotto profilassi antibiotica. Al fine di ridurre le complicanze infettive può essere utilizzata un'infusione rapida in 30 minuti 1200 mg di amoxicillina ed acido clavulanico in 100cc di soluzione fisiologica 1 ora prima dell'estrazione e successivamente dopo 12 ore per il primo giorno. A partire dal giorno seguente all'intervento il paziente continua la terapia antibiotica con amoxicillina ed acido clavulanico 1 g per os ogni 12 ore per 7-10 giorni. Qualora non si potessero eseguire terapie endovenose nel giorno d'intervento un'alternativa può essere il trattamento della profilassi dell'endocardite: 2 g di amoxicillina ed acido clavulanico per os un'ora prima dell'intervento e dopo un grammo ogni 12 ore. Oltre a queste misure profilattiche sistemiche è suggeribile una seduta di igiene orale 3 giorni prima dell'eventuale intervento chirurgico o estrazione dentaria. Inoltre, uno sciacquo di clorexidina allo 0,2% della durata di 2 minuti nell'immediato pre-operatorio. Al fine di evitare le complicanze post operatorie come l'alveolite l'alveolo post-estrattivo è consigliabile eseguire un'abbondante lavaggio con soluzione fisiologica. In fine per favorire una guarigione di prima intenzione è consigliabile l'applicazione di punti di sutura. Indipendentemente dalla terapia eseguita, questi pazienti dovrebbero essere monitorati attentamente nel tempo. Possibilmente, ogni 3 mesi, una scrupolosa visita odontostomatologica dovrebbe essere effettuata. Inoltre, il mantenimento di un'eccellente igiene orale è cruciale, pertanto in queste occasioni sono auspicabili delle sedute di igiene professionale (Gabriele et al. 2008).

### 3.3.8. La gestione e la terapia dell'osteonecrosi dei mascellari

Lo scopo della terapia del paziente affetto da ONJ è migliorarne la qualità di vita tramite il controllo, o l'eliminazione ove possibile, della componente infettiva, algica e disfunzionale. Infatti è proprio la presenza della sovra infezione che si instaura sulle aree necrotiche e sui tessuti molli vicini a compromettere significativamente una qualità di vita già alterata. La diffusione e l'estensione del processo infettivo non è dovuta solo alla soluzione di continuo tissutale che si viene a creare a livello del cavo orale o della cute circostante, ma è aggravata da alcuni cofattori sistemici. Infatti la maggior parte dei pazienti ha un'età avanzata, uno stato sistemico defedato o immunocompromesso ed è sottoposto a concomitanti terapie antitumorali e/o steroidee (Osorio-Sanchez et al. 2007). Unitamente a questi fattori di rischio sistemici è possibile riscontrare frequentemente, a livello locale, una scarsa igiene orale e la presenza di foci settici odontogeni. Ciò è imputabile alla trascuratezza del cavo buccale sovente osservabile in questi pazienti (Napeñas et al. 2007). È comprensibile pertanto come la gestione della problematica infettiva sia cruciale ed imponga la stretta collaborazione tra odontostomatologo ed oncologo vista la complessità dei quadri clinici. L'odontoiatra ha come obiettivo la gestione ed il contenimento delle problematiche infettive locali. Questo deve

essere perseguito cercando di evitare manovre chirurgiche cruenta che interessino direttamente il tessuto osseo. Pertanto, la rimozione non chirurgica dei foci infettivi mediante terapie conservative, endodontiche e parodontali è necessaria e di primaria importanza nonostante la presenza di ONJ. Il trattamento delle lesioni osteonecrotiche prevede una terapia medica a cui spesso è associata un terapia chirurgica. La terapia medica ha lo scopo di limitare e controllare le infezioni secondarie dei tessuti molli circostanti. Questa prevede la somministrazione di una terapia antibiotica sistemica unitamente ad una terapia antisettica locale. La durata della terapia antibiotica ed i benefici ottenibili mediante l'utilizzo di soluzioni antisettiche non sono definiti ma permettono di migliorare la qualità di vita del paziente. Idealmente, può essere consigliabile l'esecuzione di un esame microbiologico della lesione e di un antibiogramma per individuare l'antibiotico appropriato. Tuttavia, la terapia sistemica generalmente consta di amoxicillina e clavulanato 2-3 g/die o ciprofloxacina 500-1500 mg/die nei penicillino-resistenti. La durata e la posologia della terapia antibiotica dovrebbero essere stabilite in accordo con l'oncologo, poiché si tratta di terapie protratte nel tempo ed a posologie elevate. Generalmente sono effettuati dei cicli di terapia antibiotica di circa 10-15 giorni da ripetere ogni qual volta sia apprezzabile un riacutizzarsi della sintomatologia. La complessità di alcuni quadri clinici può rendere perciò necessario il prolungamento della terapia fino ad alcuni mesi (Gabriele et al. 2008). (Tabella 3.1.)

**Tabella 3.1.**

**TERAPIA ANTIBIOTICA SISTEMICA**

Principio Attivo	Posologia
Amoxicillina e Acido Clavulanico	1 g ogni 8 ore
Ciprofloxacina	250-750 mg ogni 12 ore
Klaritromicina	500 mg ogni 12 ore
Azitromicina	500 mg ogni 24 ore

Quando è presente una notevole flogosi ed edema dei tessuti molli vicini, può comparire una sintomatologia algica che rende necessaria l'instaurazione di una terapia analgesica. (Tabella 3.2.)

**Tabella 3.2.**

TERAPIA ANALGESICA	
Principio Attivo	Posologia
Ketorolac 10 mg	ogni 8 ore
Naprossene sodico 550 mg	ogni 12 ore
Paracetamol 500 mg- Codeina 30 mg	ogni 12 ore

La terapia sistemica deve essere affiancata dall'impiego a livello topico di collutori e gel a base di clorexidina allo 0,2% e all'1% rispettivamente. Poiché frequentemente queste sovrainfezioni sono sostenute da germi anaerobici, questi presidi a base di clorexidina possono essere preceduti da un lavaggio con perossido d'idrogeno a 12 vol. Tuttavia l'ossigeno terapia iperbarica non si è mostrata efficace nel trattamento dell'ONJ (Migliorati et al. 2006). (Tabella 3.3.)

**Tabella 3.3.**

TERAPIA ANALGESICA	
Principio Attivo	Posologia
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 12 vol	ogni 6-8 ore
Clorexidina collutorio 0,2%	ogni 6-8 ore
Clorexidina gel 1%	ogni 6-8 ore

Sempre a livello locale, le aree di esposizione ossea possono essere ricoperte con placche removibili per proteggere sia l'area esposta, che i tessuti molli circostanti durante la fonazione e la masticazione. Nei pazienti portatori di protesi removibili parziali o totali queste dovrebbero essere controllate e ribasate frequentemente, con materiali estremamente "morbidi", in modo da minimizzare il trauma per i tessuti molli. Comunque l'utilizzo di manufatti protesici removibili dovrebbe essere limitato.

Per quanto concerne la terapia chirurgica delle lesioni, oggi gli interventi tendono ad essere più conservativi. Le aree di tessuto osseo esposto sono

sottoposte a minimi debridement volti ad eliminare le asperità dell'area in modo da limitare i traumi per i tessuti molli circostanti e per rendere la lesione più facilmente detergibile. Gli interventi più invasivi sono generalmente eseguiti per contenere i danni ai tessuti vicini o trattare le complicanze quali raccolte ascessuali e fistole cutanee o mucose. Nel corso di questi interventi l'obiettivo è di ridurre al minimo il traumatismo sul tessuto osseo poiché ciò potrebbe esitare in un'espansione della lesione preesistente (Ruggiero et al. 2006). Infatti la rimozione chirurgica "en-bloc" delle aree necrotiche ha prodotto risultati variabili, in quanto è estremamente difficile, da parte del chirurgo, demarcare la porzione di osso necrotico dalle zone limitrofe di tessuto vitale. Infatti, anche il tessuto osseo sano presenta un marcato grado di sclerosi con netta riduzione della componente midollare a favore della corticale. Questa marcata sclerosi del tessuto osseo ed il meccanismo di guarigione ossea, che stimola l'intervento chirurgico possono spiegare perché, a seguito di interventi ossei demolitivi con ampie resezioni, si abbiano recidive localizzate ai margini delle aree di osteotomia.

Il paziente con ONJ deve essere monitorato, con follow-up periodici per scongiurare aggravamenti dei quadri clinici e valutare la compliance e la tollerabilità delle terapie di supporto.

## Bibliografia.

1. Graziani F, Cei S, La Ferla F, Cerri E, Itró A, Gabriele M. Association between osteonecrosis of the jaws and chronic high dosage intravenous bisphosphonates therapy: a case series. *J Craniofac Surg.* 2006 Sep;17(5):876-879.
2. Reuther T, Schuster T, Mende U, Kübler A. Osteoradionecrosis of the jaws as a side effect of oledronato of head and neck tumor patients-a report of a thirty year retrospective review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32:289-295.
3. Thiel HJ. Osteoradionecrosis. I. Etiology, pathogenesis, clinical aspects and risk factors. *Radiobiol Radiother (Berl).* 1989;30:397-413.
4. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and oledronato (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1115-1118.
5. Ruggiero SL, Merotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:527-534.
6. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:1567-1575.
7. Donoghue AM. Bisphosphonates and osteonecrosis: analogy to phossy jaw. *Med J Aust.* 2005 Aug 1;183(3):163-4.
8. Hunter D. Occupational diseases. Lecture II. Phosphorus, mercury, silver, manganese, metal fume fever, nickel carbonyl, infections, anthrax, glanders, weils disease, ankylostomiasis, cysticercosis, deficiency diseases. *Lond Hosp Gaz* 1935; 39: 25-50.
9. Wang J, Goodger NM, Pogrel MA. Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Sep;61(9):1104-7.
10. Starck WJ, Epker BN. Failure of osseointegrated dental implants after diphosphonate therapy for osteoporosis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995 Jan-Feb;10(1):74-8.
11. Tarassoff P, Csermak K. Avascular necrosis of the jaws: risk factors in metastatic cancer patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Oct;61(10):1238-9.
12. Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol.* 2003 Nov 15;21(22):4253-4.
13. Carter GD, Goss AN. Bisphosphonates and avascular necrosis of the jaws. *Aust Dent J.* 2003 Dec;48(4):268.
14. Damato K, Gralow J, Hoff A, Huryn J, Marx R, Ruggiero S, Schubert M, Toth B, Valero V. Expert panel recommendation for prevention, diagnosis and treatment of osteonecrosis of the jaw. 2005 March ODAC Meeting Briefing Document Zometa® (zoledronic acid) Injection, Aredia® (pamidronato disodium) Injection; Appendix 11;1-7.
15. Markiewicz MR, Margarone JE 3<sup>rd</sup>, Campbell JH, Aguirre A. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of

- the jaws: a review of current knowledge. *J Am Dent Assoc.* 2005 Dec;136(12):1669-74.
16. Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Systematic Review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med* 2006;144:753-761
  17. Vescovi P. Osteonecrosi dei mascellari (ONJ) e bifosfonati (BF): la letteratura. In: Vescovi P. Osteonecrosi mascellari e bisfosfonati: prevenzione, diagnosi e terapia. Parma 2007;10-22.
  18. Chiandussi S, Biasotto M, Dore F, Cavalli F, Cova MA, Di Lenarda R. Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol.* 2006 Jul;35(4):236-43.
  19. Vescovi P, Merigo E, Meleti M, Manfredi M. Bisphosphonate-associated osteonecrosis (BON) of the jaws: a possible treatment? *J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Sep;64(9):1460-2.
  20. Zavras AI, Zhu S. Bisphosphonates are associated with increased risk for jaw surgery in medical claims data: is it osteonecrosis? *J Oral maxillofac Surg* 2006;64:917-923.
  21. Mavrokokki T, Cheng A, Stein B, Goss A. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Mar;65(3):415-23.
  22. Bertoldo F, Santini D, Lo Cascio V. Bisphosphonates and osteomyelitis of the jaw: a pathogenic puzzle. *Nature Clinical practice Oncology* 2007;12(4):711-721.
  23. Zervas K, Verrou E, Teleioudis Z, Vahtsevanos K, Banti A, Mihou D, Krikelis D, Terpos E. Incidence, risk factors and management of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma: a single-centre experience in 303 patients. *Br J Haematol.* 2006 Sep;134(6):620-3.
  24. Vescovi P. Epidemiologia. In: Vescovi P. Osteonecrosi mascellari e bisfosfonati: prevenzione, diagnosi e terapia. Parma 2007;68-82.
  25. Rody WJ Jr, King GJ, Gu G. Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001 Nov;120(5):477-89.
  26. Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M, Sato M, Kawahata H, Inaguma N, Kitamura Y, Nomura S. Role of osteopontin in bone matologi caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res.* 1999 Jun;14(6):839-49.
  27. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002 Feb;17(2):210-20.
  28. Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Dmochowski J, Genco RJ. Periodontal disease and the incidence of tooth loss in postmenopausal women. *J Periodontol.* 2005 Jul;76(7):1123-8.
  29. Burt B; Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol.* 2005 Aug;76(8):1406-19.
  30. Fleish H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998;19(1):80-100
  31. López-Galindo MP, Bagán JV, Jiménez-Soriano Y, Alpiste F, Camps C. Clinical evaluation of dental and periodontal status in a group of oncological patients before chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006 Jan 1;11(1):E17-21.

32. Altundal H, Güvener O. The effect of alendronate on resorption of the alveolar bone following tooth extraction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;33(3):286-93.
33. Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Mouloupoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, Koutsoukou V, Gika D, Anagnostopoulos A, Papadimitriou C, Terpos E, Dimopoulos MA. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol.* 2005 Dec 1;23(34):8580-7.
34. Hellstein JW, Marek CL. Bisphosphonate osteochemonecrosis (bis-phossy jaw): is this phossy jaw of the 21<sup>st</sup> century? *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 May;63(5):682-9.
35. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcene A, Devy L, Foidart JM, Castronovo V, Green JR. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics* 2002;302(3):1055-1061.
36. Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, Clezardin P. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrate rats. *Cancer Res* 2002 Nov 15;62(22):6538-44.
37. Santini D, Vincenzi B, Avvisati G, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, Salerno A, Denaro V, Tonini G. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenetic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2002 May;8(5):1080-4.
38. O'Brien SN, Blijlevens NM, Mahfouz TH, Anaissie EJ. Infections in patients with aematological cancer: recent developments. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003:438-72.
39. Wessel JH, Dodson TB, Zavras AI. Zoledronate, smoking, and obesity are strong risk factors for osteonecrosis of the jaw: a case-control study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Apr;66(4):625-31.
40. Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol.* 1998 Jan;34(1):39-43.
41. Horz HP, Conrads G. Diagnosis and anti-infective therapy of periodontitis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007 Aug;5(4):703-15.
42. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Apr;19(2):71-6
43. Dannemann C, Zwahlen R, Grätz KW. Clinical experiences with bisphosphonate induced osteochemonecrosis of the jaws. *Swiss Med Wkly.* 2006 Aug 5;136(31-32):504-9.
44. Corradi D, Corcione L, Vescovi P. Patogenesi ed istopatologia delle ONJ. In: Vescovi P. Osteonecrosi mascellari e bisfosfonati: prevenzione, diagnosi e terapia. Parma 2007;85-93.
45. Hansen T, Kunkel M, Weber A, James Kirkpatrick C. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates – histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. *J Oral Pathol Med.* 2006 Mar;35(3):155-60.
46. Rizzoli R, Burlet N, Cahall D, Delmas PD, Eriksen EF, Felsenberg D, Grbic J, Jontell M, Landesberg R, Laslop A, Wollenhaupt M, Papapoulos S, Sezer O, Sprafka M, Reginster JY. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonate treatment for osteoporosis. *Bone.* 2008 May;42(5):841-7.

47. Manfredi M, Vescovi P. Aspetti diagnostici e clinici. In: Vescovi P. Osteonecrosi mascellari e bisfosfonati: prevenzione, diagnosi e terapia. Parma 2007;95-110.
48. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S, McCauley LK, McGowan J, McKee MD, Mohla S, Pendrys DG, Raisz LG, Ruggiero SL, Shafer DM, Shum L, Silverman SL, Van Poznak CH, Watts N, Woo SB, Shane E; American Society for Bone and Mineral Research. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2007 Oct;22(10):1479-91.
49. Gabriele M, Graziani F, Cei S, La Ferla F. Gestione odontostomatologica del paziente in terapia con bifosfonati: le nostre linee guida. *DoctorOS* 2008 Apr;19(4):369-377.
50. Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J.Clin.Periodontol.* 2003;30:809-18.
51. Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper. *J Am Dent Assoc.* 2005 Dec;136(12):1658-68.
52. Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Oct;102(4):433-41.
53. Marunick M, Gordon S. Prosthodontic treatment during active osteonecrosis related to radiation and bisphosphonate therapy: a clinical report. *J.Prosthet.Dent.* 2006;96:7-12.
54. Osorio-Sanchez JA, Karapetis C, Koczwara B. Efficacy of aprepitant in management of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Intern Med J.* 2007 Apr;37(4):247-50.
55. Napeñas JJ, Brennan MT, Bahrani-Mougeot FK, Fox PC, Lockhart PB. Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Jan;103(1):48-59.
56. Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncol.* 2006 Jun;7(6):508-14.

# Capitolo 4

## 4.1. Razionale della sperimentazione

Gli studi retrospettivi condotti in questi anni hanno evidenziato, quali fattori di rischio per lo sviluppo di osteonecrosi a carico delle ossa mascellari, i pregressi traumi dento-alveolari come le avulsioni dentarie, le protesi incongrue e tutti gli interventi iatrogeni interessanti il tessuto osseo dei mascellari (Ruggiero et al. 2004). Due sono le ipotesi patogenetiche proposte:

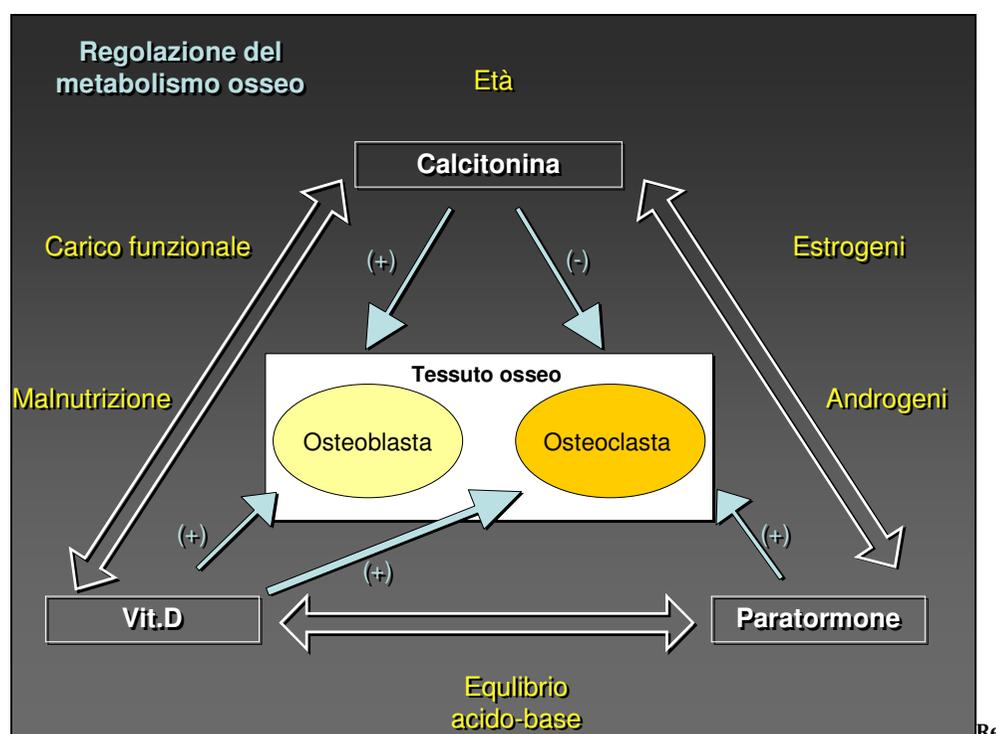
Induzione dell'apoptosi ed inibizione dell'adesione delle cellule osteoclastiche.

Inibizione della neoangiogenesi.

Secondo la prima teoria, sarebbe la riduzione del fisiologico processo di rimodellamento e guarigione ossea indotto dalla terapia con BPs a cui si associa una sovra infezione batterica a determinare la comparsa di ONJ. Diversamente, la seconda ipotesi identifica come fattore patogenetico la riduzione dell'apporto ematico, mediante l'inibizione della neoangiogenesi. Ciò determinerebbe un aumento del rischio di sviluppare osteonecrosi con seguente osteomielite (Marx 2003). Tuttavia recenti evidenze della letteratura non supportano questa seconda ipotesi patogenetica e sostengono che l'ONJ sia imputabile principalmente all'inibizione dell'attività osteoclastica. Infatti l'inibizione degli osteoclasti determina un ritardo ed un prolungamento del processo di riparazione ossea a cui segue un aumento della suscettibilità ai processi infettivi, i quali possono evolvere facilmente verso l'osteomielite e poi l'osteonecrosi (Bertoldo et al. 2007). Le ossa mascellari risulterebbero interessate da questo processo a causa del continuo processo di

rimodellamento osseo promosso dai continui stimoli determinati dagli elementi dentari, che determinerebbe un maggiore deposito delle molecole di BPs a carico dei mascellari. L'incidenza di queste lesioni interessa esclusivamente un porzione limitata (2-8%) del campione dei soggetti affetti da patologia neoplastica in terapia con bifosfonati. Ciò potrebbe essere imputabile a particolari caratteristiche genotipiche caratterizzanti pazienti affetti da lesioni osteonecrotiche che potrebbe determinare un aumento della suscettibilità (Zavras et al. 2006 e Woo et al. 2006). In condizioni fisiologiche l'omeostasi ed il metabolismo del tessuto osseo è influenzato da fattori ormonali come la calcitonina, il paratormone e la vitamina D ed in seconda misura dagli ormoni sessuali come gli estrogeni. Quest'ultimi agiscono a livello del tessuto osseo sia direttamente, grazie alla capacità delle cellule osteoclastiche di rispondere e metabolizzare gli steroidi sessuali, che indirettamente, modulando l'azione degli ormoni calciotropici (paratormone e vitamina D). (Figura 4.1.)

**Figura 4.1.**

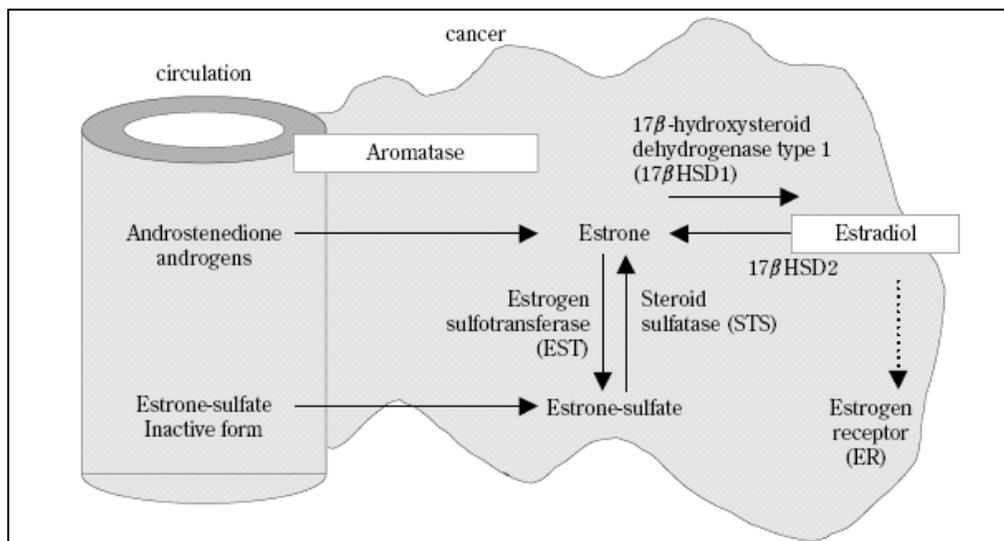


**Regolazione del metabolismo osseo:** l'attività delle cellule osteoblastiche ed osteoclastiche è mediata da fattori endocrino-metabolici e costituzionali.

L'azione diretta degli estrogeni sul tessuto osseo è permessa dalla presenza a livello delle cellule osteoclastiche delle due isoforme del recettore per gli

estrogeni (ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ ) e del complesso dell'aromatasi P450, enzima chiave nella conversione degli androgeni in estrogeni (Ribot et al. 2006). (Figura 4.2.)

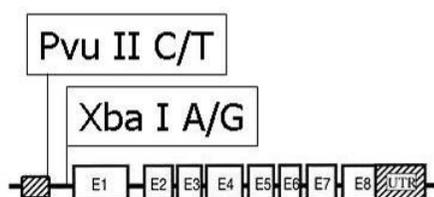
**Figura 4.2.**



**L'aromatasi è responsabile della trasformazione a livello tissutale degli androgeni in estrogeni.** Tratta da: Pietras RJ. Biologic basis of sequential and combination therapies for hormone-responsive breast cancer. *Oncologist*. 2006 Jul-Aug;11(7):704-17.

In particolare l'estradiolo ha mostrato di inibire l'attività di osteoclasti umani attraverso la modulazione sia dell'adesione che dell'apoptosi delle cellule osteoclastiche (Shevde et al. 2000, Sakai et al. 2000 e Scrivastava et al. 2001). Il recettore ER-1 presenta due varianti comuni (PvuII and XbaI) localizzate sull'introne 1 a cui sono associate variazioni nei markers di rimodellamento osseo. In particolare i portatori del genotipo TT per PvuII e del genotipo GG per XbaI, mostrano una significativa maggiore densità ossea (BMD) a causa di una maggiore espressione del recettore estrogenico (Tofteng et al. 2004 e Rapuri et al. 2006). (Figura 4.3.)

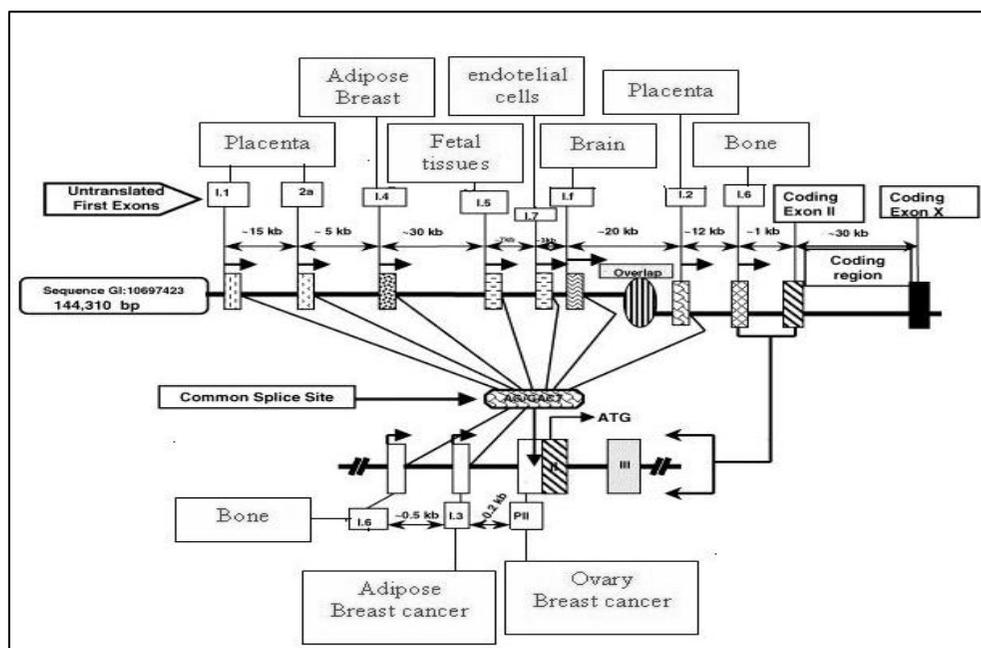
**Figura 4.3.**



**Localizzazione degli SNP PvuII e XbaI all'interno dell'introne 1.**

Diversamente l'aromatasi è codificata da un singolo gene (GYP19) comprendente 17 esoni su un segmento di circa 80 Kb. Nei tessuti sani, la regolazione dell'espressione dell'aromatasi è regolata da specifici promoter che determinano la variante di splicing espressa. Ad oggi, sono stati identificati ben 9 promoter, ciascuno dei quali è attivato da specifiche citochine ed ormoni. A livello osseo la regolazione dell'espressione dell'aromatasi è regolata dal promoter I.4 su cui agiscono a livello trascrizionale fattori come il TGF $\beta$ 1. L'espressione dell'aromatasi nel tessuto osseo è attivata a seguito di una frattura o dalla perdita della funzione ovarica durante la menopausa determinando così un incremento a livello locale degli estrogeni (Ribot et al. 2006). È stato trovato un comune polimorfismo nella regione 5'-non codificante di CYP 19 in grado di influenzare la BMD ed in particolare all'allele minore TT (prevalenza media nella popolazione caucasica del 22.6%) è stata associata ad un'elevata attività dell'aromatasi e di elevati livelli di BMD, probabilmente a causa di una maggiore espressione della variante di splicing ovarica (Zarrabeita et al. 2004). (Figura 4.4.)

**Figura 4.4.**



**Schema indicante le diverse varianti di splicing del gene codificante per l'aromatasi.**

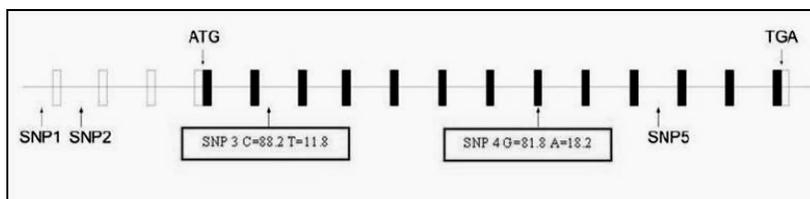
Tratta da: Enjuanes A, Garcia-Giralt N, Supervía A, Nogués X, Ruiz-Gaspà S, Bustamante M, Mellibovsky L, Grinberg D, Balcells S, Díez-Pérez A. A new SNP in a negative regulatory region of the CYP19A1 gene is associated with lumbar spine BMD in postmenopausal women. *Bone*. 2006 May;38(5):738-43.

Oltre a questo polimorfismo intronico, il gene codificante per l'aromatasi, presenta anche un polimorfismo non sinonimo, unico nella razza caucasica. Questo polimorfismo è in grado di determinare un cambio nella sequenza amminoacidica, in particolare, i soggetti omozigoti GG, per il polimorfismo Arg264Cys, presentano una minore attività enzimatica (Ma et al. 2005).

I BPs presentano perciò un'azione a livello del tessuto osseo, ed in particolare a carico degli osteoclasti, sinergica a quella degli estrogeni. Perciò un'elevata espressione a livello tissutale di estrogeni potrebbe essere implicata nella patogenesi dell'ONJ. In particolar modo l'azione degli estrogeni a livello osseo, potrebbe rappresentare un fattore di rischio per insorgenza delle ONJ.

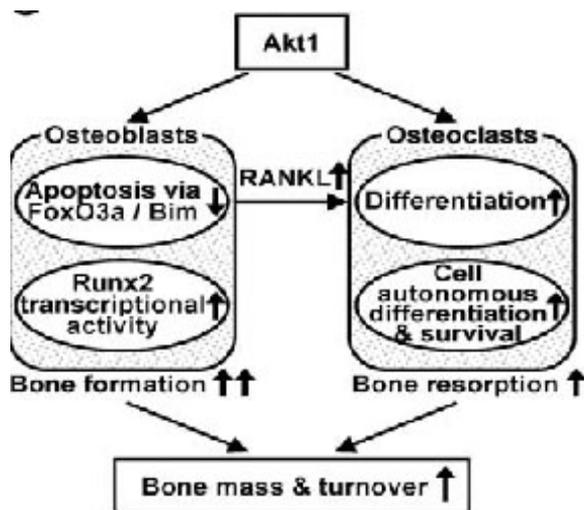
L'effetto antiangiogenetico dei BPs dipende dalla loro capacità di indurre apoptosi nelle cellule endoteliali. È stato dimostrato che i BPs contenenti azoto, come lo zoledronato, inducono l'apoptosi nelle cellule endoteliali attraverso l'inibizione della fosforilazione della serina-treonina-chinasi AKT-1 nota anche col nome di proteina chinasi B (PKB). La trasfezione genica in cellule endoteliali di una forma costitutivamente attiva di AKT-1 protegge le cellule dall'apoptosi indotta da BPs (Bezzi et al. 2003). L'AKT-1 svolge un ruolo protettivo nei confronti dell'azione pro-apoptotica che i BPs hanno sulle cellule osteoclastiche. Una ridotta espressione di questa serina-treonina-chinasi determina un aumento della suscettibilità all'apoptosi, sopprimendo la differenziazione e la funzione degli osteoclasti (Kawamura et al. 2007). Sono noti due polimorfismi del gene AKT-1 associati a differente livello di espressione della proteina. Le varianti alleliche CC per lo SNP 3 e AA per lo SNP 4, associate ad una ridotta espressione di AKT-1, favoriscono l'induzione di apoptosi; i pazienti con questo genotipo potrebbero pertanto essere più sensibili agli effetti pro-apoptotici dei BPs e quindi sviluppare più facilmente ONJ. (Figura 4.5.)

**Figura 4.5.**



Localizzazione degli SNP 3 e 4 del gene dell'AKT-1..

Figura 4.6



“AKT-1 in Osteoblasts and Osteoclasts Controls Bone Remodeling”

#### 4.2. Ipotesi di studio

Gli estrogeni hanno dimostrato in vitro un possibile sinergismo con il primo meccanismo patogenetico proposto. L'estradiolo in particolare induce l'apoptosi ed inibisce l'adesione alla matrice extracellulare delle cellule osteoclastiche umane. I BPs presentano al livello del tessuto osseo un'azione sinergica a quella degli estrogeni. Perciò, un aumento dell'espressione dei recettori degli estrogeni o un aumento della produzione degli estrogeni a livello locale, potrebbe rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo e l'insorgenza dell'ONJ.

A livello tissutale, l'espressione del recettore dell'estrogeno (ER- $\alpha$ ) è geneticamente determinata. In particolare, i portatori del genotipo TT per PvuII e del genotipo GG per XbaI (due varianti del recettore ER- $\alpha$ ), presentano una maggiore espressione del recettore degli estrogeni ER- $\alpha$ . Inoltre il livello di estrogeni, a livello locale, è modulato dall'enzima aromatasi, la cui espressione è geneticamente determinata. La presenza del polimorfismo TT nella regione 5'-non codificante di CYP 19 è associata ad una maggiore produzione di aromatasi. Oltre a ciò, la presenza del polimorfismo, non sinonimo, GG per Aromatasi Arg264Cys determina la sintesi di una aromatasi con una cisteina al posto di una arginina, questa alterazione determina una minore attività enzimatica e quindi condiziona i livelli tissutali di estrogeni.

L'effetto antiangiogenetico dei BPs dipende dalla loro capacità di indurre apoptosi nelle cellule endoteliali. Questo effetto è mediato dall'inibizione della fosforilazione della serina-treonina-chinasi AKT-1. Sono noti due polimorfismi del gene AKT-1 associati a differente livello di espressione della proteina. Le varianti alleliche TT per lo SNP3 di AKT-1 e la variante AA per lo SNP4 di AKT-1 sono associate ad una ridotta espressione di AKT-1 e favoriscono l'induzione di apoptosi; i pazienti con questo genotipo potrebbero pertanto essere più sensibili agli effetti antiangiogenetici e pro-apoptotici dei BPs e quindi sviluppare più facilmente ONJ.

#### 4.3. Obiettivo dello studio

Valutare l'associazione tra varianti alleliche di ER- $\alpha$ , Aromatasi e AKT-1 ed il rischio di sviluppare ONJ. In particolare saranno valutati i seguenti polimorfismi:

ER- $\alpha$ : PvuII (rs2234693, T/C) e XbaI (rs9340799, A/G)

Aromatasi C1531T (rs10046, C/T)

Aromatasi Arg264Cys (rs700519, A/G)

AKT-1 SNP3 (rs3730358, C/T)

AKT-1 SNP4 (rs1130233, A/G)

in un campione di pazienti in terapia con acido zoledronico affetti o meno da lesioni osteonecrotiche dei mascellari.

#### 4.4. Materiali e metodi

##### 4.4.1. Disegno della sperimentazione

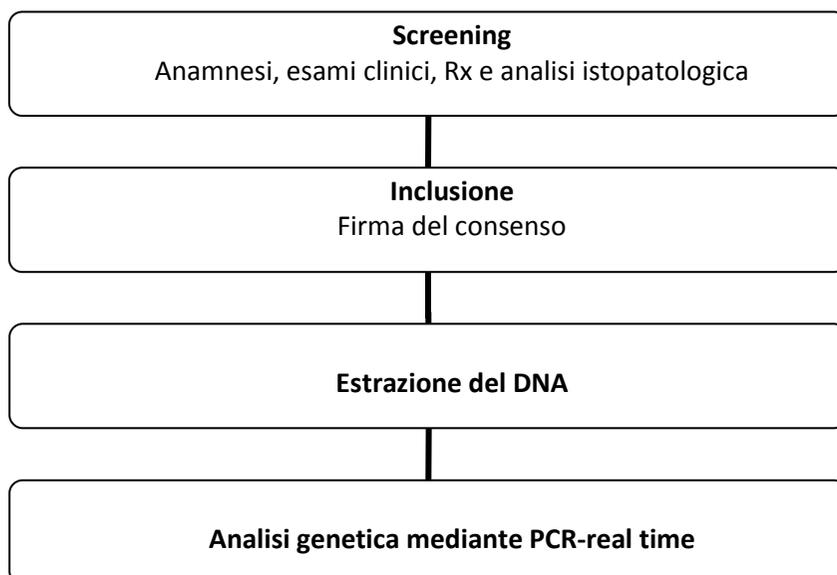
Lo studio pilota monocentrico è stato condotto, previa autorizzazione del Comitato Etico Locale, su un campione di 88 pazienti in terapia con acido zoledronico per il controllo dei metastasi ossee, affetti o meno da lesioni osteonecrotiche delle ossa mascellari. I soggetti sono stati selezionati fra i

pazienti afferenti presso la U.O. di Odontostomatologia e Chirurgia Orale dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana diretta dal Prof Mario Gabriele.

L'eventuale presenza di lesioni osteonecrotiche è stata verificata attraverso l'esame obiettivo, esami strumentali di tipo radiografico ed analisi istopatologica. I soggetti idonei sono stati dunque sottoposti ad un prelievo ematico dalla vena antecubitale secondo le procedure standard. Sul campione di sangue prelevato sono state effettuate analisi di tipo farmacogenetico volta a evidenziare la presenza di polimorfismi di ER- $\alpha$  PvuII (rs2234693, T/C) e XbaI (rs9340799, A/G), di Aromatasi CYP19A1 (rs10046,C/T), di Aromatasi Arg264Cys (rs700519, A/G) e di SNP3 di AKT-1 (rs3730358, C/T) e SNP4 di AKT-1 (rs1130233, A/G).

Dopo il prelievo ematico, i soggetti inclusi nello studio sono stati trattati per la patologia secondo gli standard forniti dalla Good Clinical Practice (GCP).(Figura 4.7.)

**Figura 4.7.**



Flow Chart dello studio

#### 4.4.2. Screening

L'obiettivo di questa fase è stato identificare i potenziali pazienti da includere nello studio. Durante lo screening è stata effettuata un'accurata indagine anamnestica di tipo medico ed odontostomatologico. A questa ha fatto seguito un esame obiettivo volto a ricercare la presenza di foci di tipo osteonecrotico. L'esame clinico è stato affiancato da un'analisi radiografica mediante ortopantomografia al fine di identificare foci infettivi endo-ossei. Quando era necessario a fini diagnostico-terapeutici sono stati eseguiti ulteriori accertamenti, quali RM e/o TC Dentascan, ed analisi istopatologiche per confermare il sospetto diagnostico di lesione osteonecrotica dei mascellari.

#### 4.4.3. Criteri d'inclusione

Per poter essere inclusi nello studi i soggetti dovevano rispondere ai seguenti criteri di inclusione:

Pazienti di età superiore ai 18 anni;

Pazienti affetti da patologia oncologica od onco-ematologica;

Pazienti in terapia con zoledronato da almeno 9 mesi che presentassero o meno lesioni osteonecrotiche a carico della ossa mascellari.

#### 4.4.4. Criteri d'esclusione

Sono stati esclusi dalla sperimentazione tutti soggetti che rispondevano ai sottostanti criteri di esclusione:

Pazienti di età inferiore 18 anni;

pazienti che abbiano effettuato radioterapia a livello della testa e del collo;

pazienti in terapia con zoledronato da meno di 9 mesi;

pazienti che presentano foci infettivi a livello del cavo orale;

pazienti incapaci di consentire a partecipare allo studio.

#### 4.4.5. Protocollo sperimentale

##### - Inclusione -

Il gruppo di pazienti per poter accedere allo studio hanno dovuto esprimere il loro consenso scritto. Questa fase e tutto lo studio è stata interamente condotta in accordo all'ultima revisione della Dichiarazione di Helsinki. La Dichiarazione di Helsinki raccomanda che, nella ricerca biomedica, il consenso del soggetto a partecipare allo studio possa essere ottenuto solo dopo che il medico abbia fornito esaurienti spiegazioni sugli scopi, metodi, benefici e potenziali rischi dello studio. Il soggetto o, nel caso in cui il soggetto non sia in grado di fornire il consenso informato, il suo rappresentante legalmente riconosciuto, deve inoltre essere informato sul proprio diritto sia a rifiutare la partecipazione, che a ritirarsi dallo studio in qualsiasi momento.

Dopo aver valutato l'anamnesi medica ed odontoiatrica ed aver presentato ad ogni paziente il proprio piano di trattamento. I pazienti che hanno accettato di partecipare allo studio e rispondevano ai criteri sopra riportati sono stati inclusi nella sperimentazione. A questi pazienti è stato effettuato un singolo prelievo ematico venoso periferico da 5 ml. I campioni ematici prelevati sono stati inviati al laboratorio e conservati in maniera del tutto anonima in modo che non sia possibile avere un'associazione tra il campione e il donatore.

##### - Estrazione del DNA -

I campioni di sangue, una volta giunti in laboratorio, sono stati conservati a  $-20^{\circ}$  C per un periodo di tempo massimo di 10 giorni prima di procedere all'estrazione del DNA. Al momento dell'estrazione i campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente fino a completo scongelamento.

L'estrazione del DNA è stata eseguita mediante il QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, CA, USA); tale metodica ha inizio con la preparazione di 20  $\mu$ l di QIAGEN Proteasi (o Proteasi K) sul fondo di una provetta da microcentrifuga da 1,5 ml, segue l'aggiunta di 200  $\mu$ l di sangue intero. Nel caso in cui il volume del campione ematico sia inferiore a 200  $\mu$ l è necessario aggiungere un appropriato volume di tampone fosfato, phosphate-buffered saline (PBS). Successivamente, nella provetta devono essere addizionati 200 $\mu$ l di tampone di lisi (Buffer AL) ed è necessario garantire la formazione di una soluzione omogenea agitando con vortex per 15 secondi. A questo punto il campione deve essere incubato a  $56^{\circ}$  C per 10 minuti, al fine di assicurare la massima resa di DNA. Terminata l'incubazione, per recuperare la quantità di miscela evaporata e depositatasi sulle pareti della provetta è necessario centrifugare brevemente il campione. La metodica procede con l'aggiunta di 200  $\mu$ l di etanolo al 96-100% e con

l'agitazione del campione mediante vortex per 15 secondi; quindi, al fine di rimuovere le gocce presenti sulle pareti della provetta si sottopone il campione ad una breve centrifugata. La miscela, così ottenuta, viene trasferita all'interno dell'apposita provetta contenente la colonna QIAamp spin column, ponendo attenzione alla membrana presente sul fondo della colonna; si centrifuga, quindi, ad 8000 rpm per 1 minuto. La resina contenuta nella colonna trattiene il DNA mentre il filtrato si deposita in una provetta di raccolta che deve essere scartata. In seguito la QIAamp spin column viene posizionata in un'altra provetta di raccolta e devono essere aggiunti 500µl del tampone di lavaggio AW1. Si procede centrifugando a 8000 rpm per 1 minuto, scartando la provetta di raccolta contenente il filtrato e posizionando la colonna in un nuovo tubo. Si aggiungono, quindi, 500µl del tampone di lavaggio AW2 e si centrifuga a 14000 rpm per 3 minuti scartando il filtrato. La QIAamp spin column viene collocata in una provetta da microcentrifuga da 1,5 ml e si aggiungono 200 µl di tampone di eluizione, si esegue poi un'incubazione a temperatura ambiente di 5 minuti ed infine si centrifuga ad 8000 rpm per 1 minuto. Al termine della centrifugata è possibile scartare la colonna e conservare l'eluato, contenente il DNA. Per valutare la purezza e la quantità di DNA ottenuto, un volume di 1µl del campione sarà diluito in 499 µl di acqua distillata autoclavata e ne sarà misurata l'assorbanza mediante lo spettrofotometro UVIKON (Kontron Instruments). Le letture dell'assorbanza saranno effettuate alla lunghezza d'onda di 260 nm, lunghezza alla quale assorbono gli acidi nucleici, tenendo conto del fatto che un valore di assorbanza di 1 con un cammino di 1 cm corrisponde a 50 µg/ml di DNA a doppia elica ed a 40 µg/ml di DNA a singola elica. Misurando, inoltre, l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 280 nm (picco d'assorbanza delle proteine, principale contaminante degli estratti) ed effettuando il rapporto tra le rispettive assorbanze a 260 e 280 nm si può ottenere una stima della purezza del DNA, in genere si considera soddisfacente un indice di purezza compreso tra 1,6 e 1,9.

- PCR-real time -

Reazione di amplificazione a catena della polimerasi (PCR) quantitativa

La valutazione dei polimorfismi del singolo nucleotide (SNPs) degli enzimi coinvolti in questo studio è stata effettuata mediante un'analisi di PCR quantitativa utilizzando lo strumento ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems). La PCR quantitativa, denominata anche PCR Real Time, è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanee del DNA. Questa metodica è una recente variante della PCR, tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali.

Mentre nella PCR classica, è possibile verificare solo alla fine dell'esperimento il risultato dell'amplificazione, la real-time PCR consente di seguire l'evolversi della reazione in tempo reale, garantendo una maggiore flessibilità, una migliore interpretazione dei risultati ed una più semplice ed affidabile quantificazione degli stessi. Il parametro che viene misurato nella real-time PCR è l'aumento di fluorescenza: oltre ai due primers necessari per l'amplificazione, è presente, infatti, una sonda complementare al DNA da amplificare. La sequenza della sonda viene scelta in modo tale che possa ibridizzarsi al DNA stampo all'interno della porzione amplificata. Questa sonda è marcata ad una estremità con un fluoroforo, una sostanza che se eccitata con luce di una particolare lunghezza d'onda diviene fluorescente. All'estremità opposta a quella del fluoroforo, la sonda porta un "quencher", una molecola che, quando è vicina al fluoroforo, è in grado di inibirne la fluorescenza. (figura 4)

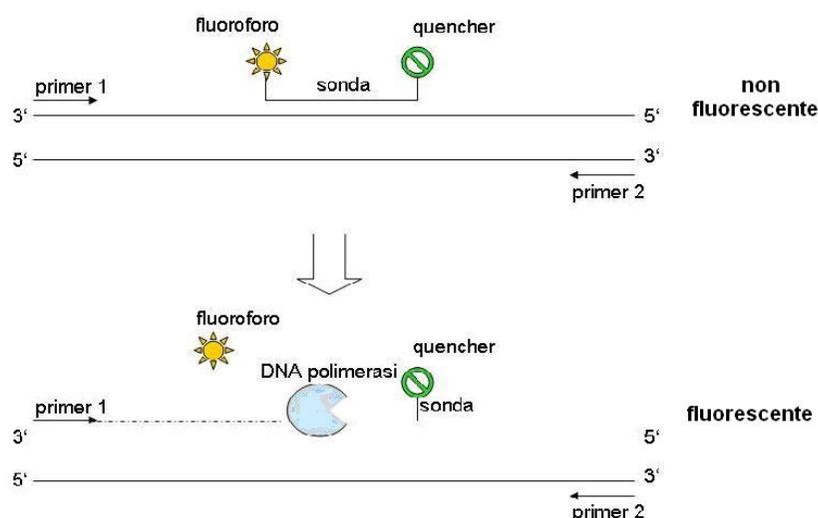


Figura 4: PCR Real Time

All'inizio della reazione, la sonda si ibridizza al DNA stampo ma nessuna fluorescenza può essere misurata in quanto il quencher assorbe l'emissione del fluoroforo. Col procedere della reazione di copiatura dello stampo la sonda viene gradualmente degradata nei singoli nucleotidi che la costituiscono per mezzo dell'attività esonucleasica 5'→3' della AmpliTaq Gold® DNA polimerasi, questo determina il progressivo allontanamento del quencher, che non trovandosi più sufficientemente vicino al fluoroforo, non ne assorbe l'emissione. Si assisterà di conseguenza ad un aumento della fluorescenza che

sarà proporzionale al contenuto di DNA stampo presente nel campione; questo consente di trasformare la fluorescenza misurata durante l'amplificazione in una quantificazione dell'abbondanza del DNA stampo oggetto di analisi. Poichè diversi fluorofori sono disponibili con emissione di fluorescenza a lunghezze d'onde diverse fra loro, è possibile seguire l'amplificazione in tempo reale di diversi stampi direttamente nella stessa provetta. Questa possibilità è stata sfruttata nel presente lavoro: sono state disegnate con il programma File Builder (v. 2.0) due sonde marcate con due diversi fluorofori (VIC e FAM), ciascuna specifica per uno dei due alleli dello SNP da analizzare. Al termine dei cicli di amplificazione la discriminazione allelica viene effettuata mediante l'analisi dei dati con il software SDS (v. 2.1) che è in grado di distinguere e quantificare il segnale di fluorescenza delle sonde VIC e FAM determinando il contenuto allelico presente in ciascun campione. (figura 5)

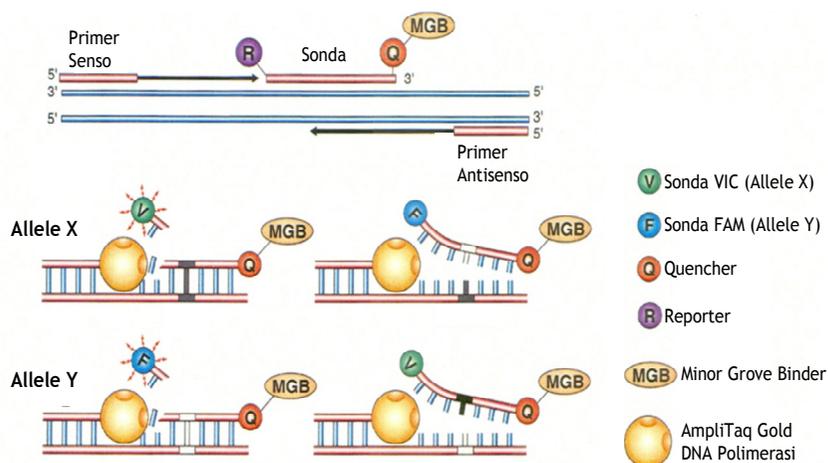


Figura 5: PCR Real Time

In ciascuna provetta sono stati posti 11,875µl di DNA e acqua DNasi e RNasi free, 12,5µl di TaqMan Universal PCR Master Mix e 0,625 µl di una miscela contenente i primers e le sonde specifiche, in concentrazioni ottimizzate e validate, per un volume finale di 25 µl.

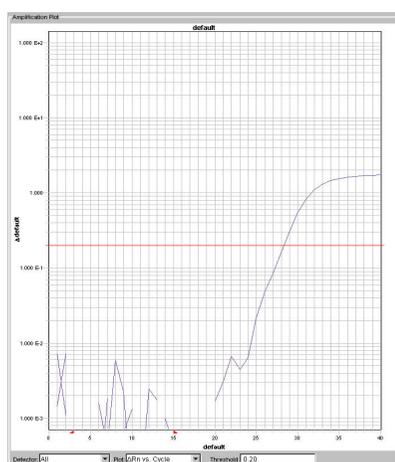
La TaqMan Universal PCR Master Mix contiene oltre alla polimerasi AmpliTaq Gold® DNA, una AmpErase uracil-N-glicosilasi (UNG), un pool di deossinucleotidi con deossiuridina trifosfato (dUTP), ed altri componenti del tampone enzimatico opportunamente ottimizzati. La presenza della AmpErase UNG permette di prevenire fenomeni di contaminazione e carry-over che potrebbero essere comuni a causa della ripetitività della reazione polimerasica perchè, durante un passaggio di incubazione a 50°C per 2 minuti, l'enzima

determina la degradazione di eventuali prodotti di precedenti PCR che contengono dUTP (Tabella 1). La successiva incubazione a 95°C per 10 minuti permette quindi da un lato di inattivare la UNG e dall'altro di innescare la reazione di PCR per mezzo dell'attivazione della polimerasi e della denaturazione del DNA presente nei campioni. Il contenuto delle provette è infatti posto mediante piastre da 96 pozzetti nello strumento AbiPrism 7900HT, che è in grado di riscaldare i campioni alle temperature programmate per ciascuna fase dei 40 cicli della reazione di PCR. In particolare, la fase di denaturazione è effettuata a 95°C per 15 secondi, mentre quella di appaiamento dei primers ed estensione è condotta a 60°C, per 1 minuto.

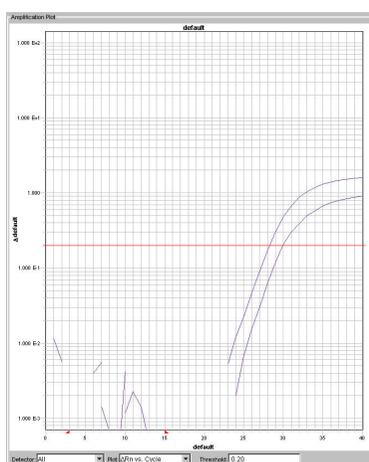
**Tabella 1: Caratteristiche delle fasi di PCR Real Time**

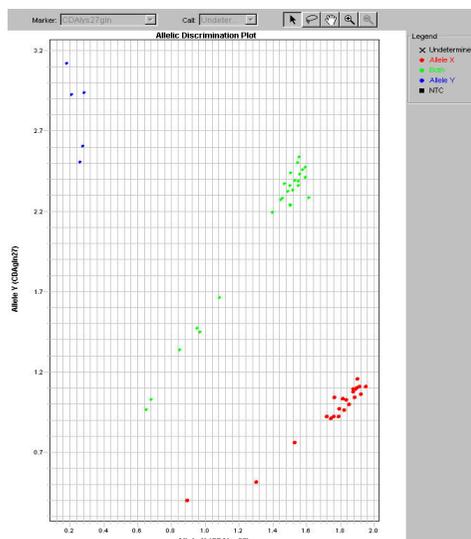
Passaggio	Incubazione e Con UNG	Attivazione della AmpliTaq Gold	CICLO di PCR (40 cicli)	
			Denaturazione	Estensione
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tempo	2 min	10 min	15 sec	1 min
Volume	25 µL			

### Es. di omozigote



### Es. di eterozigote





### Es. Post Read

- Conservazione dei campioni di DNA -

Tutti i campioni di DNA raccolti durante la sperimentazione sono stati conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  presso l'U.O. di Farmacologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Pisa.

#### 4.4.6. Analisi statistica

Essendo uno studio pilota è stata utilizzata un'analisi statistica di tipo descrittivo (media, mediana, deviazione standard, minimo e massimo). Per l'analisi della significatività delle frequenze alleliche è stato utilizzato il test del  $K^2$ . Quando la frequenza di un allele è risultata essere inferiore a 5 soggetti è stato applicato il test delle probabilità esatte di Fischer. L'analisi del linkage disequilibrium è stata effettuata con il programma Haploview v. 4.1 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>). Il livello di significatività utilizzato è stato 0,05. I valori di p sono stati arrotondati a tre cifre decimali.

## 4.5. Risultati

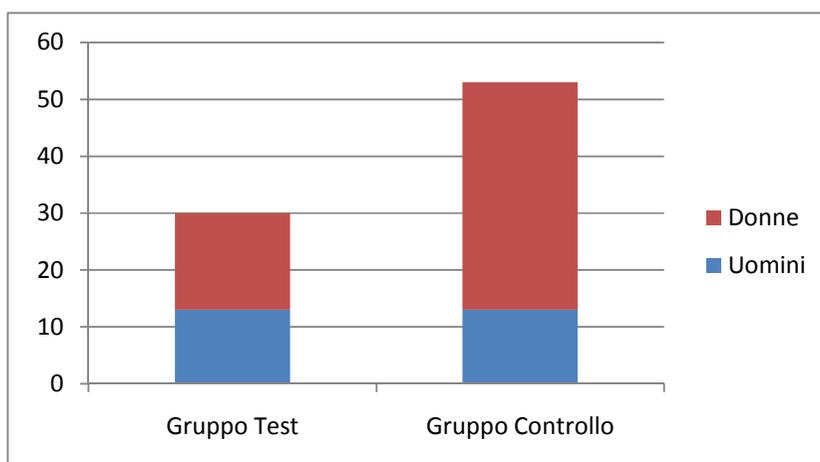
### 4.5.1. Caratteristiche del campione

Nella fase di screening della sperimentazione, sono stati visitati presso la U.O. di Odontostomatologia e Chirurgia Orale dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, 168 pazienti oncologici o onco-ematologici provenienti dall'area vasta nord-ovest Toscana e dalle province di Grosseto e La Spezia. Tra questi pazienti, 83 (49,4%) rispondevano a parametri di inclusione. Le cause di esclusione dallo studio nella fase di screening sono state: durata di trattamento con acido zoledronico inferiore a 9 mesi nel 51% dei casi; presenza di foci infettivi a livello del cavo orale nel 36% dei casi; radioterapia a livello della testa e del collo nel 7% dei casi e in soli 5 casi per rifiuto da parte del paziente di partecipare allo studio.

I pazienti inclusi nello studio sono stati suddivisi in due gruppi: il gruppo test, costituito da 30 pazienti (17 donne, 13 uomini) che presentavano lesioni osteonecrotiche a livello del cavo orale, ed il gruppo controllo di 53 pazienti (40 donne, 13 uomini) privi di lesioni osteonecrotiche e di foci infettivi clinicamente e radiologicamente obiettabili a livello del cavo orale. (Grafico 4.1.)

L'età media dei soggetti era di 70,5 anni (SD 9,59) per i pazienti appartenenti al gruppo test e di 67,3 anni (SD 12,1) per il gruppo controllo.

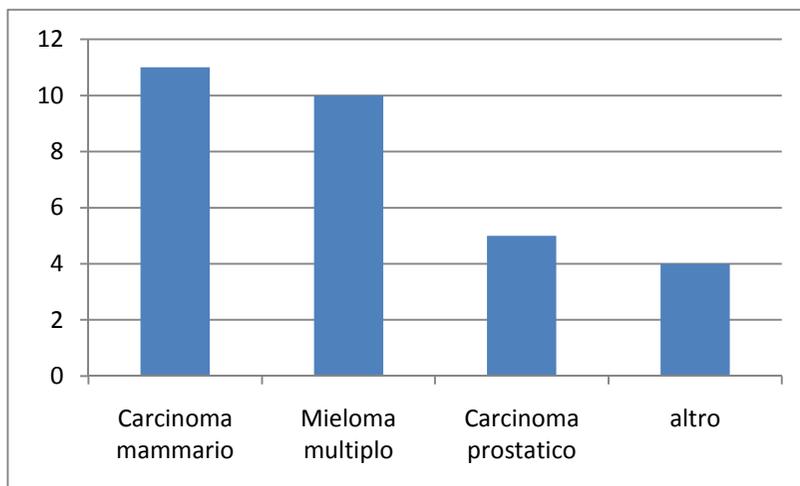
#### Grafico 4.1.



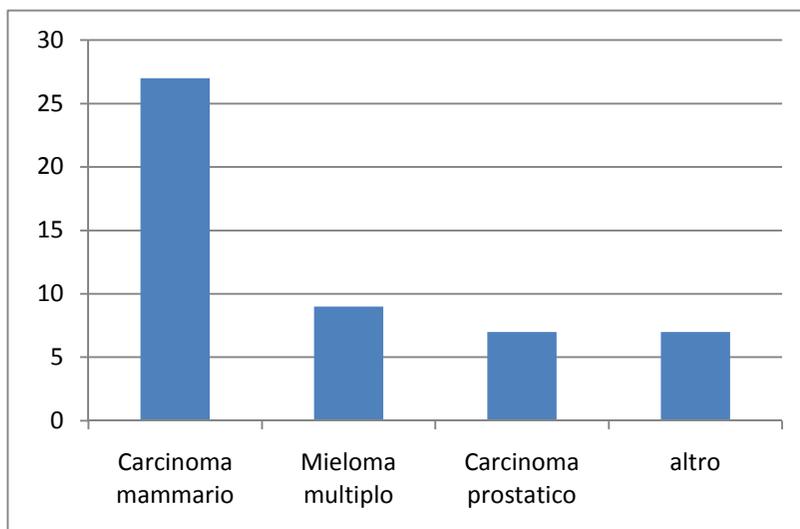
Analizzando la patologia primaria per cui i soggetti sono stati sottoposti a trattamento con acido zoledronico, troviamo nel gruppo test la prevalenza di

carcinoma mammario (11 pazienti) e di mieloma multiplo (10 pazienti) seguiti dal carcinoma prostatico (5 pazienti) e da altre patologie oncologiche (4 pazienti). Nel gruppo controllo si è avuta la prevalenza di carcinoma mammario (27 pazienti) seguito dal mieloma multiplo (9 pazienti), dal carcinoma prostatico (7 pazienti) e da altre patologie oncologiche (7pazienti). (Grafico 4.2.-4.3.)

**Grafico 4.2. Patologie primarie gruppo Test**

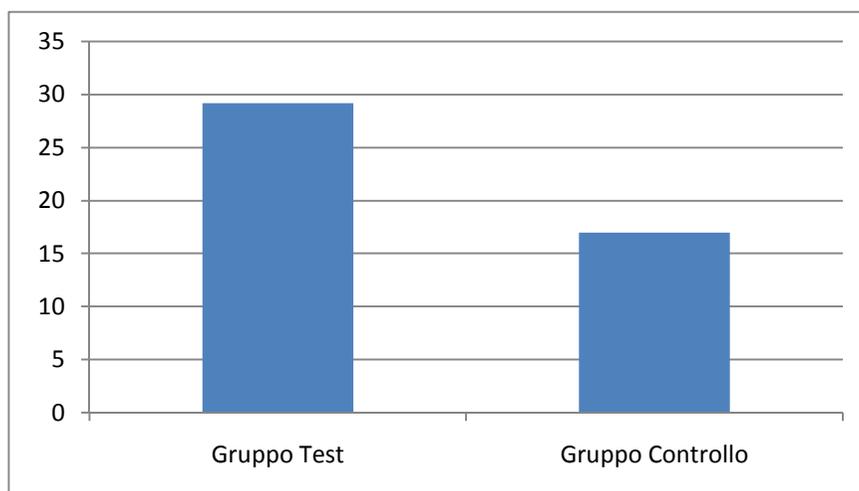


**Grafico 4.3. Patologie primarie gruppo Controllo**



La durata media di trattamento con acido zoledronico è stata di 29,18 mesi (SD 16,76) per il gruppo test e di 16,69 mesi (SD 17,30) per i soggetti appartenenti al gruppo controllo. (Grafico 4.4.)

**Grafico 4.4. Durata Trattamento con Zoledronato**



#### 4.5.2. Frequenze alleliche

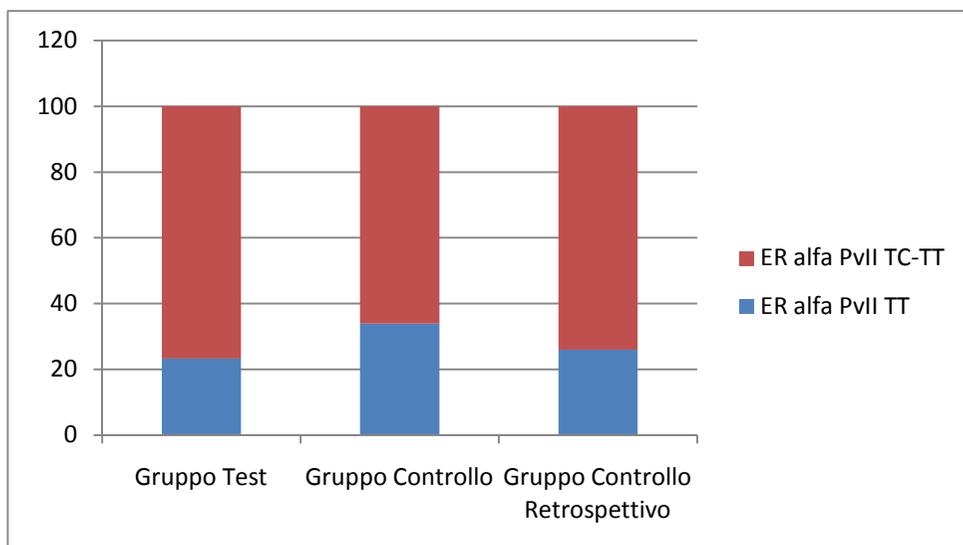
- ER- $\alpha$ : PvuII e XbaI -

L'analisi del polimorfismo dello SNP di PvuII (rs2234693, T/C) del recettore ER- $\alpha$  non ha mostrato nessuna differenza significativa ( $p > 0.05$ ) tra il gruppo test ed il gruppo controllo (frequenza: gruppo test 23.33%; gruppo controllo 33.96%). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata nemmeno quando il campione è stato confrontato con un gruppo controllo retrospettivo fornito della banca dati della Divisione di Farmacologia e Chemioterapia del Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Pisa (frequenza 25.97%). (Grafico 4.5.)

Del recettore ER- $\alpha$  è stato analizzato anche lo SNP di XbaI (rs9340799, A/G): non è stata osservata alcuna differenza significativa ( $p > 0.05$ ) tra il gruppo test ed il gruppo controllo (frequenza: gruppo test 40,00%; gruppo controllo 38.46%). Risultati analoghi sono stati ottenuti anche dal confronto con il un

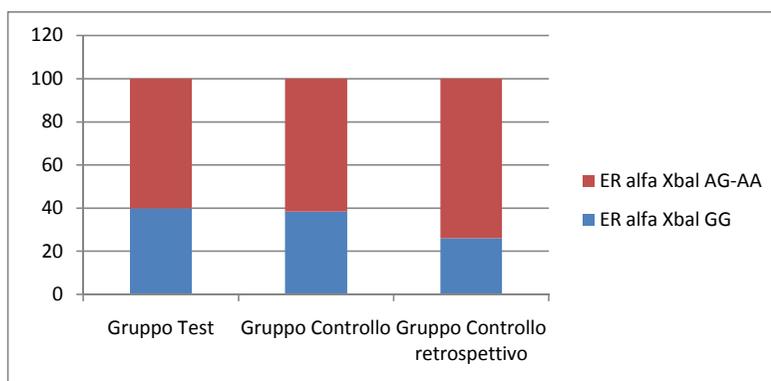
gruppo controllo retrospettivo in nostro possesso (frequenza 25.97%). (Grafico 4.6.)

**Grafico 4.5.**



**Il grafico dei risultati ottenuti per lo SNP PvuII di ER- $\alpha$ :** le percentuali dell'allele omozigote TT a cui è associata una maggiore espressione a livello tissutale del recettore ER- $\alpha$  degli estrogeni e degli alleli TC-CC. Le frequenze appaiono graficamente simili per tutti e tre i gruppi.

**Grafico 4.6.**

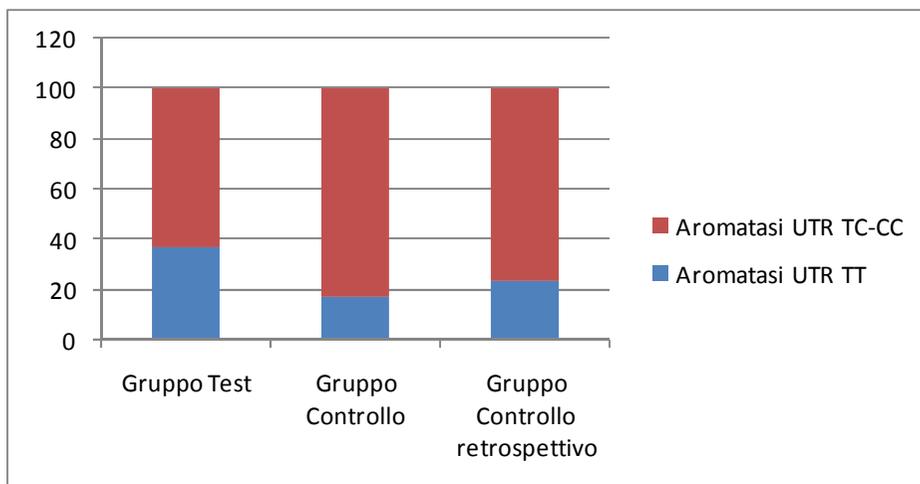


**Il grafico dei risultati ottenuti per lo SNP XbaI di ER- $\alpha$ :** le percentuali dell'allele omozigote GG a cui è associata una maggiore espressione a livello tissutale del recettore ER- $\alpha$  degli estrogeni e degli alleli TC-CC. Le frequenze non presentano differenze statisticamente significative tra i tre i gruppi.

### - Aromatasi C1531T -

L'analisi del polimorfismo dello SNP Aromatasi C1531T (rs10046, C/T) ha evidenziato che la frequenza dell'allele omozigote TT è pari al 36,67% dato significativamente più elevato rispetto al 16,98% rilevato all'interno della popolazione controllo. Il dato è stato confermato anche dall'analisi condotta sul campione controllo retrospettivo (frequenza 23,38%) ( $p=0,059$ ). (Grafico 4.7.)

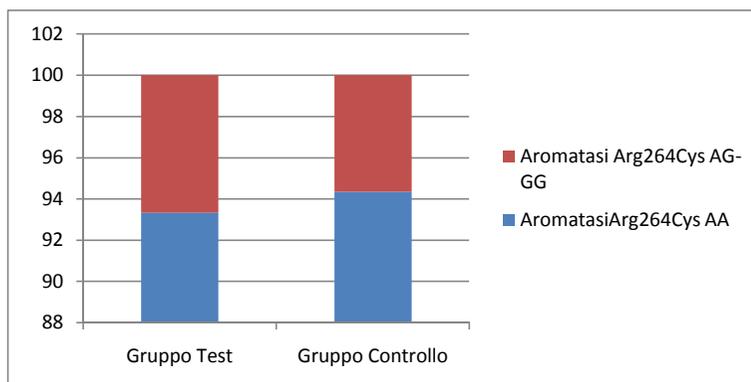
**Grafico 4.7.**



**Il grafico dei risultati ottenuti per lo SNP di Aromatasi C1531T:** l'allele omozigote TT, a cui è associata una maggiore espressione a livello tissutale di aromatasi, presenta una frequenza maggiore statisticamente significativa rispetto al gruppo controllo. Una conformità di risultati è apprezzabile anche rispetto al gruppo controllo retrospettivo.

### - Aromatasi Arg264Cys -

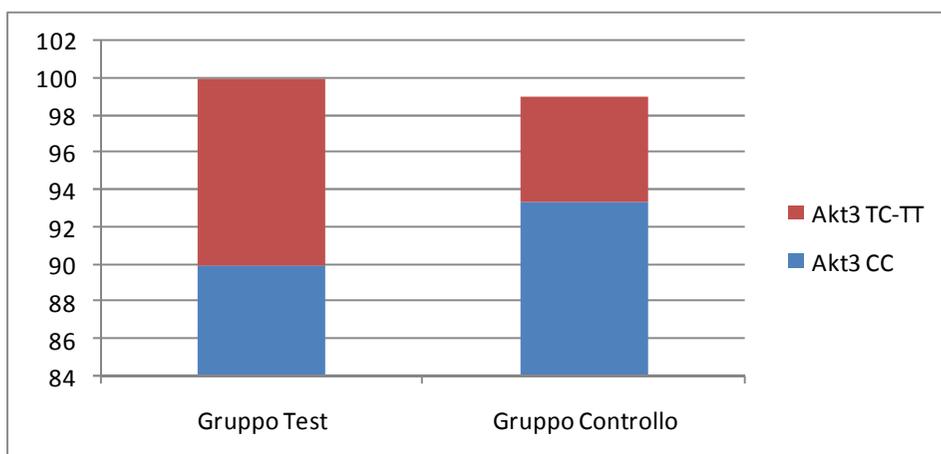
Nell'analisi del polimorfismo non sinonimo Aromatasi Arg264Cys (rs700519, A/G) l'allele AA presenta una frequenza elevata nella popolazione generale, dato riscontrato sia nel gruppo test (93,33%) che controllo (94,34%). Gli alleli minori AG ed in particolare l'omozigote GG, a cui è associata la sintesi di un'aromatasi della ridotta attività enzimatica, presentano una frequenza estremamente bassa e nel gruppo test è pari a 0 per quanto riguarda l'allele GG. (Grafico 4.8.)

**Grafico 4.8.**

**Il grafico dei risultati ottenuti per lo SNP non sinonimo Aromatase Arg264Cys:** le frequenze degli alleli GG e AG sono estremamente basse e non presentano differenze statisticamente significative tra il gruppo test ed il controllo ( $p > 0.05$ ).

- SNP3 di AKT-1 -

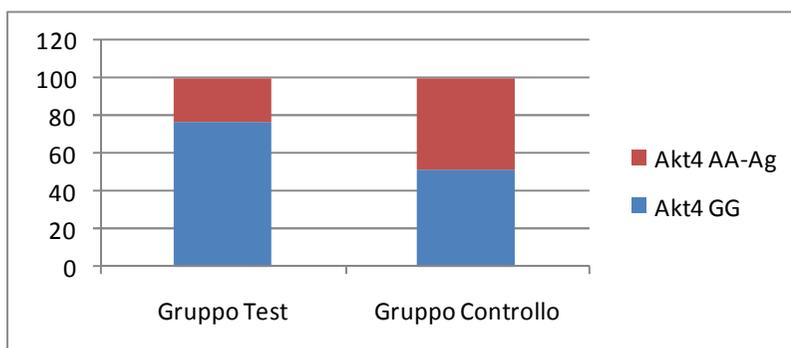
L'analisi dello SNP3 di AKT-1 (rs3730358, C/T) ha rilevato una frequenza maggiore degli alleli TC-TT all'interno del gruppo controllo (40.00%) rispetto al gruppo test (8.33%) ( $p < 0.01$ ). Inoltre, la frequenza rilevata all'interno del gruppo controllo si discosta in modo marcato dalla frequenza attesa nella popolazione caucasica (15.6%). (Grafico 4.9.)

**Grafico4.9.**

**Il grafico dei risultati ottenuti per lo SNP3 di AKT-1:** l'allele omozigote CC presenta una frequenza maggiore nel gruppo controllo rispetto al gruppo test. L'allele CC presenta nella popolazione caucasica una frequenza bassa ed è associato ad una minore espressione a livello tissutale di AKT.

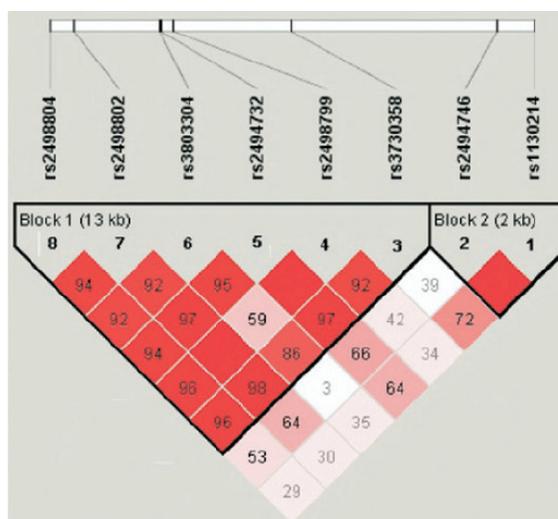
## - SNP4 di AKT-1 -

L'allele AA dello SNP4 di AKT-1 (rs1130233, A/G) presenta una frequenza significativa nella popolazione caucasica. (Grafico 4.10.)

**Grafico 4.10.****Il grafico dei**

**risultati ottenuti per lo SNP4 di AKT-1:** le frequenze dell'allele GG sono elevate per il gruppo test rispetto al gruppo controllo, pertanto il campione di soggetti in esame permette di identificare differenze statisticamente significative tra i due gruppi.

L'analisi di linkage disequilibrium ha mostrato che che rs3730358 e rs1130233 sono tagging SNPs che costituiscono un *haplotype block* con altri polimorfismi di AKT-1, risultandone un pattern complesso il cui risultato funzionale supera quello dei singoli SNPs. (Grafico 4.11.)

**Grafico 4.11.**

**Il grafico dei risultati ottenuti con l'analisi LD:** i vari polimorfismi di AKT-1 sono raggruppati in un *haplotype block* e pertanto ereditati insieme.

ER- $\alpha$ Pvull	Frequenze alleliche		<sup>2</sup>	K	p
Test	TT	TC-CC			
	23.33	76.67			
Controllo	33.96	66.04	.03	1	>0.05
Controllo Retrospektivo	25.97	74.03	.00	0	>0.05
ER- $\alpha$ Xbal	Frequenze alleliche		<sup>2</sup>	K	p
Test	GG	AG-AA			
	40	60			
Controllo	38.46	61.54	.02	0	>0.05
Controllo Retrospektivo	25.97	74.03	.49	0	>0.05
Aromatasi C1531T	Frequenze alleliche		<sup>2</sup>	K	p
Test	TT	TC-CC			
	36.67	63.33			
Controllo	16.98	83.02	.06	4	0.044
Controllo Retrospektivo	23.37	76.62	.05	3	0.085
Aromatasi Arg264Cys	Frequenze alleliche		<sup>2</sup>	K	p
Test	AA	GG-AG			
	93.33	6.66			
Controllo	94.34	5.66	.03	0	>0.05
SNP4 di AKT-1	Frequenze alleliche		<sup>2</sup>	K	p
Test	CC	TT-TC			
	90	10			
Controllo	66.04	33.96	.82	5	0.016
SNP4 di AKT-1	Frequenze alleliche		<sup>2</sup>	K	p
Test	GG	AG-AA			
	76.67	23.33			
Controllo	51.92	48.08	.89	4	0.027

## Bibliografia.

1. Ruggiero SL, Merotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:527-534.
2. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and oledronato (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1115-1118.
3. Bertoldo F, Santini D, Lo Cascio V. Bisphosphonates and osteomyelitis of the jaw: a pathogenic puzzle. *Nature Clinical practice Oncology* 2007;12(4):711-721.
4. Zavras AI, Zhu S. Bisphosphonates are associated with increased risk for jaw surgery in medical claims data: is it osteonecrosis? *J Oral maxillofac Surg* 2006;64:917-923.
5. Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Systematic Review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med* 2006;144:753-761.
6. Ribot C, Tremollieres F, Pouilles JM Aromatase and regulation of bone remodelling. *Joint Bone Spine* 2006;73: 37-42
7. Pietras RJ. Biologic basis of sequential and combination therapies for hormone-responsive breast cancer. *Oncologist*. 2006 Jul-Aug;11(7):704-17.
8. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97(14):7829-7834.
9. Scrivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. Estrogen decrease osteoclasta formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem* 2001;276(12):8836-8840.
10. Sakai H, Kobayashi Y, Sakai E, Shibata M, Kato Y. Cell adhesion is a prerequisite for osteoclasta survival. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270(2):550-556.
11. Tofteng CL, Kindmark A, Brandstrom H et al. Polymorphism in the CYP 19 and AR genes-relation to bone mass and longitudinal bone changes in postmenopausal women with or without hormone replacement therapy. *Calcif Tissue Int.* 2004;74: 25-34
12. Rapuri PB, Gallager JC ER1 gene polymorphisms are associated with changes in bone remodeling markers and treatment response to estrogen. *Maturitas* 2006;53: 371-379.
13. Zarrabeita MT, Hernandez JL, Valero C, Zarrabeita AL, Garcia-Unzueta, Amado JA, Gonzalez-Macias J, Riancho J. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the aromatase gene influences bone mass and fracture risk. *European Journal of Endocrinology* 2004;150:699-704.
14. Enjuanes A, Garcia-Giralt N, Supervía A, Nogués X, Ruiz-Gaspà S, Bustamante M, Mellibovsky L, Grinberg D, Balcells S, Díez-Pérez A. A new SNP in a negative regulatory region of the CYP19A1 gene is associated with lumbar spine BMD in postmenopausal women. *Bone*. 2006 May;38(5):738-43.
15. Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, Coronel J, Pelleymounter L, Wang L, Eckloff BW, Schaid D, Wieben ED, Adjei AA, Weinshilboum RM. Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):11071-82.

16. Bezzi M, Hasmin M, Bieler G, Dormond O, Ruegg C. Zoledronate Sensitizes endothelial cells to tumor necrosis factor-induced programmed cell death. *J Biol Chem* 2003;278(44):43603-43614.
17. Kawamura N, Kugimiya F, Oshima Y, Ohba S, Ikeda T, Saito T, Shinoda Y, Kawasaki Y, Ogata N, Hoshi K, Akiyama T, Chen WS, Hay N, Tobe K, Kadowaki T, Azuma Y, Tanaka S, Nakamura K, Kawaguchi H. Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodelling. *PLoS ONE* 2007;2(10):e1058.

## Conclusioni

I benefici che i pazienti oncologici possono trarre dalla terapia con BPs, in ordine di decremento dell'incidenza di eventi scheletrici e riduzione del dolore osseo, rendono oggi questo trattamento essenziale ai fini di ottenere un miglioramento della qualità di vita del malato oncologico (Coleman 2004).

I BPs sono generalmente ben tollerati con un'ottima compliance da parte del paziente (Conte & Guarnieri 2004). Tuttavia a partire dal 2003, anno della descrizione in letteratura dei primi casi di ONJ, si è assistito ad un progressivo e costante aumento delle pubblicazioni, sia su riviste di odontostomatologia e di chirurgia oro-maxillo-facciale, che su riviste mediche di elevato impact factor (Marx 2003, Migliorati 2003, Woo et al. 2006 e Rizzoli et al. 2008).

L'ONJ indotta da BPs presenta aspetti clinici simili alla phossy jaw, patologia altamente invalidante, che colpiva gli addetti alla lavorazione del fosforo bianco nelle fabbriche di fiammiferi della metà del XIX (Donoghue 2005). Le lesioni possono variare da piccole lesioni endodontico-parodontali ad ampie aree di esposizione ossea con interessamento dei tessuti molli orali e peri-orali (Ruggiero et al. 2004, Marx et al. 2005 e Graziani et al. 2006). L'evoluzione delle lesioni è lenta e condizionata dallo stato di salute sistemica del paziente. La terapia medica e chirurgica riescono solo in alcuni casi a determinare la guarigione delle lesioni e talvolta persistono esiti altamente invalidanti (Ruggiero et al. 2006, Woo et al. 2006 e Gabriele et al. 2008). Innanzi a questi limiti terapeutici diviene fondamentale la prevenzione e l'identificazione dei fattori di rischio. In questi anni numerose pubblicazioni hanno cercato di fornire linee guida per la prevenzione e la gestione dell'ONJ indotta da BPs, tuttavia la conoscenza dei meccanismi patogenetici non è stata tuttora pienamente compresa (Damato et al. 2005 e Marx et al. 2005).

L'ipotesi patogenetica oggi più accreditata, identifica nell'azione diretta dei BPs sulle cellule osteoclastiche, e nel conseguente ritardo del fisiologico processo di rimodellamento osseo, la causa prima di una osteomielite e poi della conseguente necrosi (Bertoldo et al. 2007). Il ritardo nel processo di rimodellamento e guarigione del tessuto osseo è determinato dall'effetto pro-apoptotico dei BPs sulle cellule osteoclastiche (Coxon et al. 1998). Questo ritardo nella riparazione tissutale espone il tessuto osseo a sovra infezioni batteriche da parte della ricca flora del cavo orale, perciò ogni intervento iatrogeno, come avulsioni dentarie e interventi sul tessuto osseo dei mascellari rappresentano un fattore di rischio (Marx et al. 2005).

Sulla base di questa teoria patogenetica lo studio genetico, da noi condotto, permette di escludere il ruolo dei polimorfismi del recettore ER- $\alpha$  degli estrogeni nella patogenesi dell'ONJ. Diversamente il polimorfismo

dell'aromatasi (C1531T) potrebbe svolgere il ruolo di fattore di rischio per lo sviluppo di ONJ. Risultati inattesi sono stati ottenuti nello studio dei polimorfismi di AKT-1 e sebbene escludano un suo ruolo diretto nella patogenesi dell'ONJ, l'elevata significatività dei risultati ottenuta nell'analisi del polimorfismo di SNP3 di AKT-1 può essere vista come un aspetto particolare di un fenomeno più ampio, come suggerito dall'analisi LD. L'LD block che si costituisce grazie ai singoli polimorfismi ereditati insieme determina un risultato funzionale ben più complesso del singolo membro di questo blocco. Perciò ulteriori studi, su una popolazione più ampia di soggetti, saranno necessari per valutare quest'ultima ipotesi.

Questa sperimentazione rappresenta la prima applicazione di un'analisi farmacogenetica nello studio dell'osteonecrosi dei mascellari indotta da BPs e può rappresentare un valido punto di partenza per altre ricerche.

---

## Bibliografia.

1. Coleman RE. Bisphosphonates: clinical experience. *Oncologist*. 2004;9 Suppl 4:14-27.
2. Conte P, Guarneri V. Safety of intravenous and oral bisphosphonates and compliance with dosing regimens. *Oncologist*. 2004;9 Suppl 4:28-37.
3. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and oledronato (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1115-1118.
4. Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol*. 2003 Nov 15;21(22):4253-4.
5. Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Systematic Review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med* 2006;144:753-761
6. Rizzoli R, Burlet N, Cahall D, Delmas PD, Eriksen EF, Felsenberg D, Grbic J, Jontell M, Landesberg R, Laslop A, Wollenhaupt M, Papapoulos S, Sezer O, Sprafka M, Reginster JY. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonate treatment for osteoporosis. *Bone*. 2008 May;42(5):841-7.
7. Donoghue AM. Bisphosphonates and osteonecrosis: analogy to phossy jaw. *Med J Aust*. 2005 Aug 1;183(3):163-4.
8. Ruggiero SL, Merotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:527-534.
9. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:1567-1575.
10. Graziani F, Cei S, La Ferla F, Cerri E, Itró A, Gabriele M. Association between osteonecrosis of the jaws and chronic high dosage intravenous bisphosphonates therapy: a case series. *J Craniofac Surg*. 2006 Sep;17(5):876-879.
11. Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Oct;102(4):433-41.
12. Gabriele M, Graziani F, Cei S, La Ferla F. Gestione odontostomatologica del paziente in terapia con bifosfonati: le nostre linee guida. *DoctorOS* 2008 Apr;19(4):369-377.
13. Damato K, Gralow J, Hoff A, Huryn J, Marx R, Ruggiero S, Schubert M, Toth B, Valero V. Expert panel recommendation for prevention, diagnosis and treatment of osteonecrosis of the jaw. 2005 March ODAC Meeting Briefing Document Zometa® (zoledronic acid) Injection, Aredia® (pamidronato disodium) Injection; Appendix 11;1-7.
14. Bertoldo F, Santini D, Lo Cascio V. Bisphosphonates and osteomyelitis of the jaw: a pathogenic puzzle. *Nature Clinical practice Oncology* 2007;12(4):711-721.
15. Coxon FP, Benford HL, Russell RG, Rogers MJ. Protein synthesis is required for caspase activation and induction of apoptosis by bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol*. 1998 Oct;54(4):631-8.

## *Ringraziamenti*

Un grazie sincero al Chiar.mo Prof. Romano Danesi, che con premurosa attenzione mi ha guidato durante questo anno di tesi, stimolando la mia curiosità ed il mio interesse verso la ricerca e suscitandomi domande che alla fine del corso di laurea mi permetteranno di fare una scelta più consapevole sul mio futuro professionale.

Egli mi ha affiancato a persone che hanno fatto sì che questo studio diventasse un lavoro di squadra; per questo, alla fine del percorso della tesi, oltre a ringraziarlo per il mio arricchimento culturale lo ringrazio per avermi permesso di confrontarmi con persone dalle quali ho ricevuto molto.

Per questo si meritano i miei più calorosi ringraziamenti tutte le persone che sono state sempre presenti e pronte a risolvere ogni mio dubbio o incertezza.

In assoluto un ringraziamento di cuore al mio Tutor Dr. Francesco Crea, il quale è stato il primo ad accogliermi nel laboratorio, con totale disponibilità, soprattutto nella prima parte del lavoro, e che mi ha sempre consigliato la strada più giusta da seguire, contribuendo a indirizzare il mio lavoro verso un maggiore senso critico.

Un ringraziamento speciale al Dr. Fabio La Ferla, il quale mi ha dato la possibilità di seguire con più consapevolezza la parte clinica di questa tesi, mostrandosi sempre pronto a fornirmi ogni spiegazione utile e chiarificatrice.

Ringrazio inoltre il Prof. Mario Gabriele per la gentile concessione delle immagini, la Dr.sa Simona Ricciardi, la Dr.sa Valentina Mey e Elisa Ghetti per il tempo che hanno speso per la realizzazione di questa tesi.

Infine anche se non hanno contribuito direttamente alla stesura della tesi, mi sento di ringraziare la mia famiglia, i miei cari nonni, gli zii, tutti gli amici, in particolare Chiara Antinucci e Marzia Del Re che hanno creduto sin dall'inizio che io potessi arrivare a questo traguardo e che hanno riposto in me fiducia, con i quali ho condiviso ogni passo dei miei studi, dalle soddisfazioni alle fatiche.