

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO
in SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE e SPERIMENTALI

DIPARTIMENTO
di SCIENZE MEDICHE

CURRICULUM / CORSO DI DOTTORATO
in SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE e METABOLICHE
XXIV CICLO

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
STATO SECRETORIO DI GH E SOMATOMEDINE CIRCOLANTI NELLA TALASSEMIA:
INFLUENZA SU TURNOVER E DENSITA' MINERALE OSSEA

Settore scientifico MED/13

Agnese Cattaneo

TUTOR: dr. Massimo Scacchi

COORDINATORE DEL DOTTORATO: prof. Paolo Beck Peccoz

A.A. 2010/2011

SOMMARIO

INTRODUZIONE

B-talassemia.....	pag. 3
Complicanze sistemiche nella B-talassemia.....	pag. 10
Complicanze endocrine nella B-talassemia.....	pag. 11
Osso.....	pag. 16
Osso e sistema GH/IGFs.....	pag. 22

STUDIO SPERIMENTALE

PAZIENTI E METODI.....	pag. 27
ANALISI STATISTICA.....	pag. 28

RISULTATI.....	pag. 29
----------------	---------

CONCLUSIONI.....	pag. 35
------------------	---------

BIBLIOGRAFIA.....	pag. 38
-------------------	---------

INTRODUZIONE

β-talassemia

Le β-talassemie sono emoglobinopatie secondarie a difetto di sintesi delle catene β. Quest'ultima può essere soltanto ridotta (β⁺-talassemia) o assente (β⁰-talassemia); nell'ambito di queste due entità si riconoscono diverse forme cliniche che riflettono diversi tipi di lesioni dei geni β-globinici.

Le lesioni genetiche scoperte nelle varie forme di β-talassemia sono molto eterogenee; diversamente dalla α-talassemia non vi è, se non in rari casi, delezione del gene globinico. I meccanismi più frequentemente in gioco sono rappresentati da mutazioni puntiformi di tipo *non-senso* con arresto della trascrizione del gene, o comportanti inserzione di una singola base con conseguente lettura sfalsata del gene (*frame-shift*), mutazioni di sequenze introniche, con conseguente alterata processazione intranucleare (*splicing*) dell'RNA messaggero, o mutazioni nella regione del "promoter" che determinano riduzione della sintesi globinica¹.

Dal punto di vista clinico si distinguono forme di diversa gravità, denominate talassemia minor, intermedia e major.

Lo stato eterozigote della β-talassemia, definito anche *talassemia minor* o minima, o microcitemia costituzionale, o stato di portatore asintomatico di β-talassemia², è una condizione asintomatica determinata da uno stato di eterozigosi per il gene della β⁰ o β⁺-talassemia¹. L'esame emocromocitometrico di questi pazienti evidenzia poliglobulia con microcitosi ed ipocromia, lo striscio del sangue periferico mostra alterazione della morfologia dei globuli rossi, l'elettroforesi dell'emoglobina mette in evidenza l'aumento della HbA₂. La forma di talassemia minor in cui è assente il quadro di anemia è definita "sindrome di Rietti-Greppi-Micheli".

I portatori di questo trait talassemico sono totalmente asintomatici dal punto di vista clinico; tuttavia il riconoscimento di questi individui è molto importante ai fini della profilassi eugenetica della talassemia.

Il termine *talassemia intermedia* non si riferisce al genotipo ma al quadro clinico che è di gravità intermedia tra la forma major e la forma minor di talassemia. I

genotipi responsabili di questa forma sono l'eterozigosi per il gene della β^0 -talassemia a cui vanno aggiunte alcune situazioni di doppia eterozigosi come quella per la β e δ - β -talassemia e quella per la β -talassemia e la persistenza ereditaria di emoglobina fetale³. L'esordio clinico è più tardivo rispetto ai soggetti con β -talassemia omozigote, lo sviluppo psichico e fisico è normale; le deformazioni ossee sono scarse o assenti per cui la facies microcitemica è molto sfumata, il grado di anemia è variabile, mentre si ha costante epatosplenomegalia con siderosi epatica e frequentemente vi è colelitiasi. Il quadro ematologico è qualitativamente analogo a quello della talassemia major, tuttavia l'anemia microcitica ipocromica è meno spiccata ed è quasi sempre associata a reticolocitosi. Dalla terza decade di vita possono rendersi necessarie le trasfusioni, anche se per definizione la terapia trasfusionale non dovrebbe essere indicata. Tuttavia questo schematismo non ha riscontro nella pratica, anche perché oggi si tende a trasfondere più spesso che in passato, allo scopo di prevenire le lesioni ossee, le modificazioni della facies e la splenomegalia.

La sopravvivenza di questi pazienti è variabile, data la variabilità del quadro clinico ed ematologico; in alcuni pazienti è abbastanza lunga, anche in assenza di terapia emotrasfusionale.

La *β -talassemia omozigote o major o morbo di Cooley*, è la forma più grave di anemia emolitica congenita.

Dal momento che le alterazioni genetiche sono eterogenee, nell'ambito di questa forma di talassemia vi può essere un certo grado di variabilità nell'espressione clinica. Si distinguono almeno tre categorie genotipiche: le forme β^0/β^0 , β^0/β^+ e le forme β^+/β^+ ¹.

Le manifestazioni cliniche compaiono al 4°-6° mese di vita, quando nel soggetto normale ha luogo il passaggio dalla prevalenza della produzione di catene γ a quella di catene β e δ , con il neonato che presenta pallore ingravescente, subittero ed epatosplenomegalia. Si associano spesso sintomi sistemici quali anoressia, decadimento delle condizioni generali e febbricola.

Nella fase conclamata il paziente non trattato mostra i segni dell'anemia con emolisi intramidollare e periferica. E' sempre presente epatosplenomegalia

marcata, associata ad ittero. L'esame cardiologico evidenzia cardiomegalia secondaria ad uno stato ipercinetico, come verrà spiegato in seguito.

Quando il quadro è conclamato, i bambini presentano una fisionomia caratteristica, con la tipica "facies microcitemica" determinata dagli zigomi sporgenti, dal naso con radice piuttosto infossata ed ali larghe, taglio degli occhi di tipo mongoloide, epicanto, mascellari allargati e dal cranio rotondo e ingrossato. All'esame radiologico il cranio mostra l'allargamento della diploe con possibile scomparsa del tavolato esterno e alterazione delle trabecole della spongiosa. La neoformazione di trabecole disposte radialmente conferisce il tipico aspetto del "cranio a spazzola."⁴

Gli esami ematochimici evidenziano un quadro di anemia microcitica ipocromica, incremento del numero dei reticolociti in circolo e iperbilirubinemia indiretta, ipersideremia e iperferritinemia conseguenti all'emolisi e all'eritropoiesi inefficace; lo striscio del sangue periferico dimostra alterazioni morfologiche dei globuli rossi, mentre all'elettroforesi dell'emoglobina si osserva solo HbA2 ed HbF (omozigosi per β^0 -talassemia) o HbA2, F, ed A in quantità non superiore al 10-15% (omozigosi per β^+ -talassemia grave)⁵. Nel caso di un trattamento trasfusionale appropriato, il bambino appare pressoché normale, poiché la soppressione della proliferazione midollare provocata dalle trasfusioni previene le modificazioni scheletriche e la mancanza dei globuli rossi alterati, cioè resi rigidi dalla presenza di corpi inclusi costituiti da catene α libere, evita lo sviluppo della splenomegalia. Tuttavia, il progressivo accumulo di ferro introdotto con le trasfusioni determina, a partire dai 9-10 anni di età, una serie di complicanze come quelle cardiache, epatiche e endocrine, che verranno descritte successivamente, tali da richiedere una terapia ferrochelante.

Le β -talassemie sono diffuse soprattutto nelle popolazioni di origine mediterranea, africana e asiatica, situate in una fascia tropicale e subtropicale estesa dal Mediterraneo al sud-est Asiatico.

Negli ultimi dieci anni il numero delle nascite di nuovi pazienti talassemici è andato riducendosi, grazie ad un piano di prevenzione e diagnosi prenatale attuato nelle regioni a più alto rischio⁶.

In Italia la prevalenza dei portatori sani di α -talassemia varia tra il 2.4% del Lazio, il 5-8% della Puglia, il 7-8% della Sicilia e il 12.9% della Sardegna. Si può calcolare che su una popolazione di circa 55 milioni di abitanti vi siano in Italia circa 3 milioni di β -talassemici, la maggioranza dei quali sono eterozigoti, cioè “portatori sani”.

La Sardegna è una delle regioni italiane a più alto rischio per l’elevato numero di portatori sani (300.000 circa) su una popolazione di circa 1,6 milioni.

In pratica un sardo ogni otto si calcola sia microcitemico. Risulta di conseguenza più facile piuttosto che altrove che si formi una coppia a rischio; secondo le ultime statistiche è a rischio una coppia su settanta. I soggetti affetti da β -talassemia major che attualmente vivono in Sardegna sono circa 1600 con un rapporto di 1/100.000 abitanti⁷.

Come già accennato in precedenza, la β -talassemia major non trattata è costantemente fatale. I mezzi terapeutici oggi a nostra disposizione hanno contribuito non solo a determinare il prolungamento e il miglioramento della qualità di vita dei pazienti ma anche ad eliminare o quasi le manifestazioni un tempo tipiche della malattia.

Il più utilizzato schema terapeutico si basa su tre direttive:

1. mantenimento dei livelli di emoglobina entro i range di normalità, mediante adeguato regime trasfusionale, al fine di eliminare lo stimolo sul midollo osseo, controllando così la complessa patologia che deriva dalla sua iperattività.
2. splenectomia nell’infanzia così da impedire la distruzione delle emazie con il conseguente aggravamento dell’anemia.
3. rimozione dell’eccesso di ferro di origine trasfusionale con l’utilizzo di opportuni agenti chelanti.

Le emotrasfusioni rappresentano storicamente il primo approccio terapeutico alla talassemia.

Gli scopi delle trasfusioni includono la correzione dell’anemia, la soppressione dell’eritropoiesi e l’inibizione dell’aumentato assorbimento gastrointestinale di ferro. Al fine di ottenere questi risultati inizialmente venivano utilizzati regimi di ipertrasfusione o supertrasfusione che portavano a gravi danni conseguenti

all'eccessivo apporto di ferro. Attualmente, invece, viene utilizzato un protocollo trasfusionale che prevede che il livello di emoglobina pretrasfusionale sia tra 9 e 10 g/dl⁸; questo regime sembra essere associato ad un'adeguata inibizione midollare conseguente alla riduzione di produzione di eritropoietina e ad un relativo basso accumulo di ferro per la marcata riduzione del suo assorbimento a livello intestinale. La riduzione dell'eritropoiesi inefficace determina un più lento rilascio in circolo di globuli rossi alterati che comporta un più lento incremento volumetrico della milza con ritardata insorgenza dell'ipersplenismo.

E' raccomandato iniziare un regolare regime trasfusionale in presenza di gravi segni e sintomi della malattia che generalmente si manifestano quando la concentrazione di emoglobina si trova costantemente al di sotto di 7 g/dl. La maggior parte dei pazienti riceve la prima trasfusione verso la metà o la fine del primo anno di vita, tuttavia alcuni bambini non necessitano di supporto ematico fino all'età di 4 anni, a dimostrazione dell'esistenza di diverse forme di talassemia major.

I malati sottoposti a terapia trasfusionale cronica possono con maggiore facilità contrarre malattie infettive come l'epatite B e C, l'infezione da Citomegalovirus e da HIV; grazie alle vaccinazioni le infezioni da HBV sono ormai rare, mentre sono ancora frequenti le altre. Inoltre, al fine di prevenire alcune delle reazioni che si possono verificare in seguito alle trasfusioni vengono utilizzate emazie deleucocitate in modo da ridurre la quantità di citochine presenti nelle unità di sangue.

Inevitabilmente la terapia emotrasfusionale determina un sovraccarico di ferro importante che dipende direttamente dal numero di trasfusioni praticate e dall'età del paziente. Come verrà spiegato meglio in seguito la emosiderosi da trasfusione è la causa principale di morbilità e mortalità nei pazienti talassemici. L'utilizzo di un farmaco ferro-chelante ha consentito in parte di risolvere questo problema prolungando ulteriormente la sopravvivenza media. I tre chelanti del ferro usati oggi nella pratica clinica sono la deferoxamina (DFO), il deferiprone (DFP) ed il deferasirox (DFX). Tali farmaci sono in grado sia di ridurre il sovraccarico marziale già presente che di ritardare la sua comparsa in pazienti regolarmente sottoposti a terapia. I meccanismi d'azione della DFX non sono

completamente noti, ma è certo che il farmaco non sottrae ferro all'emoglobina né alle altre strutture proteiche delle quali il ferro è costituente essenziale, ma chela il ferro costituente la quota libera o in transito tra transferrina e ferritina e soprattutto dal deposito epatico⁹.

La terapia ferro-chelante viene iniziata in genere non prima del secondo anno di vita e comunque solo dopo un certo numero di emotrasfusioni. La terapia ferrochelante è in grado di determinare un notevole miglioramento della crescita, dello sviluppo puberale e di prevenire alcune delle complicanze legate al sovraccarico di ferro¹⁰.

L'efficacia della terapia ferro-chelante deve essere attentamente tenuta sotto controllo in ogni paziente. La determinazione dei livelli di ferritina sierica è utile, ma questi possono presentare oscillazioni anche importanti indipendenti dall'accumulo di ferro, come in caso di iperpiressia, processi infettivi o infiammatori acuti, iperemolisi cronica o anche per la stessa eritropoiesi inefficace.

La Biosusciometria Magnetica tramite SQUID (Superconducting Quantum Interference Device) è innocua, ed è basata sulla metodologia più sensibile e specifica: misura direttamente le proprietà magnetiche di ferritina ed emosiderina; non è quindi influenzata da altri fattori.

Peraltro, data la limitata disponibilità di questa metodica, dovuta ai costi elevati ed all'alta specializzazione richiesta per la sua applicazione¹¹, se pur con qualche limite, la ferritina può essere utilizzata come indice del carico marziale del paziente.

Come accennato precedentemente, pazienti affetti da β -talassemia vanno incontro inevitabilmente ad ipersplenismo, cioè incremento notevole della attività emocataretica della milza, con conseguente splenomegalia più o meno marcata. L'ottimizzazione del trattamento trasfusionale e la maggiore attenzione clinica hanno, negli ultimi anni, reso meno grave questo problema. La splenectomia, un tempo pratica terapeutica molto utilizzata, è considerata oggi necessaria solo quando il fabbisogno ematico diviene superiore a 1.5 volte quello di un paziente-controllo con le stesse caratteristiche cliniche ma già splenectomizzato, quando la splenomegalia è tale da determinare compressione locale e dolore e quando

risultano presenti marcate leucopenia e piastrinopenia conseguenti all'ipersplenismo¹².

L'unica terapia finora in grado di portare ad una guarigione definitiva il paziente β -talassemico è il trapianto di midollo osseo. I fattori presi in considerazione nei protocolli di trapianto per valutare la possibilità di sopravvivenza e la guarigione dei malati sono la presenza o meno, prima del trapianto, di epatomegalia, di fibrosi portale e di inefficace terapia chelante. I bambini che non presentano alcuno di questi fattori di rischio hanno una percentuale di sopravvivenza libera da malattia superiore al 90% nei tre anni successivi al trapianto; nei pazienti con due fattori di rischio la sopravvivenza è dell'84%, mentre in quelli con tutti e tre i fattori è di circa il 60%¹³.

Nell'ultimo decennio nuovi approcci terapeutici sono stati studiati e testati al fine di poter guarire i pazienti talassemici. Uno di questi è la terapia genica che ha lo scopo di inserire all'interno di alcune cellule del paziente un gene normale in sostituzione di uno alterato. Il trasferimento del gene all'interno della cellula bersaglio avviene grazie all'uso di vettori nel cui corredo genico è stata introdotta la sequenza genica da impiantare. Uno studio condotto nel 2002¹⁴ ha dimostrato l'efficacia di questa terapia in un modello murino, facendo crescere l'entusiasmo nei confronti di questo nuovo approccio.

Altre terapie che in futuro potranno essere utilizzate e che in parte hanno già dato buoni risultati sono quelle con idrossiurea e acido butirrico per aumentare la produzione di emoglobina fetale, il trapianto di cellule staminali prelevate dal cordone ombelicale e il trapianto di midollo osseo intrauterino¹⁵.

Complicanze sistemiche nella β -talassemia

Negli ultimi due decenni la corretta applicazione della terapia trasfusionale e ferrochelante ha determinato un aumento della sopravvivenza e il miglioramento della qualità di vita dei pazienti affetti da talassemia major. D'altro canto, parallelamente sono emerse patologie secondarie che a lungo termine possono modificare la loro aspettativa e qualità di vita. Le epatopatie, le cardiopatie e le endocrinopatie, la cui causa principale è l'emocromatosi secondaria, sono alcune tra le più frequenti complicanze che si riscontrano in questi pazienti.

Il danno epatico cronico nel paziente talassemico è il risultato di un processo multifattoriale in cui hanno un ruolo principale l'accumulo di ferro, soprattutto se la terapia ferro-chelante non è eseguita correttamente, e le infezioni croniche di virus trasmessi con le trasfusioni di sangue, ma a cui possono anche partecipare l'accumulo di endotossine o di altri metalli, le alterazioni immunologiche e la suscettibilità genetica dei singoli soggetti, la carenza di vitamine e di sostanze antiossidanti¹⁶. Un quadro di epatopatia di gravità variabile, si riscontra nel 90% dei pazienti già dopo i 15 anni di età.

Dal punto di vista istopatologico si possono riscontrare fibrosi degli spazi portalì, formazione di ponti che delimitano pseudolobuli e con il passare degli anni un quadro di cirrosi emocromatosica. Nei restanti pazienti il quadro è quello di una epatite cronica attiva o di una epatite cronica persistente.

E' noto da tempo l'effetto fibrogenico del sovraccarico di ferro, ed una correlazione tra concentrazione intraepatica di ferro e sviluppo di cirrosi, diabete e malattie cardiache è stata dimostrata nei pazienti con emocromatosi genetica¹⁷. Come già accennato, un'altra complicanza che si manifesta in questi soggetti tra i 10 e i 20 anni di età è la cardiopatia, la quale rappresenta ancora oggi la più frequente causa di morbilità e mortalità.

Lo stato di anemia cronica ed il sovraccarico di ferro secondario alla terapia trasfusionale sono i principali fattori coinvolti nell'eziopatogenesi della cardiopatia, ma è probabile che anche fenomeni infettivi come pericarditi e miocarditi possano avere un ruolo nell'insorgenza di tale complicanza nel paziente talassemico¹⁸, probabilmente per l'aumentato tropismo virale per il tessuto miocardico nel quale siano presenti depositi di ferro. Studi recenti suggeriscono come anche il deficit di GH, dovuto al danno indotto dal sovraccarico di ferro a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi, possa contribuire al danno cardiaco nei pazienti talassemici¹⁹.

L'anemia determina essenzialmente un quadro di cardiopatia caratterizzato da interessamento delle sezioni destre con importante componente dilatativa, insufficienza tricuspidalica e ipertensione polmonare; l'emocromatosi, invece, determina interessamento delle camere cardiache di sinistra con ridotta

compliance del ventricolo, grave insufficienza mitralica e ridotta cinesi parietale globale.

La miocardiopatia da accumulo marziale si sviluppa molto lentamente ed in maniera progressiva, spesso diviene clinicamente evidente solo quando la funzione ventricolare è compromessa o quando compaiono aritmie sintomatiche. Dopo la comparsa di segni clinici, l'evoluzione può essere rapida fino a portare a volte a scompenso cardiaco refrattario²⁰.

Complicanze endocrine nella β -talassemia

Come accennato precedentemente il miglioramento e la razionalizzazione del trattamento ferro-chelante, il regime trasfusionale oggi adeguato e le altre terapie di supporto hanno incrementato significativamente le aspettative di vita del paziente talassemico che può oltrepassare la seconda, terza o anche la quarta decade di vita²¹. Questo ha fatto sì che venissero messe in luce nuove patologie, tra cui quelle endocrine, prima non riconoscibili per la mortalità precoce di questi pazienti. La maggior parte delle alterazioni endocrine riscontrabili, possono essere ricondotte al sovraccarico di ferro²².

Molti degli studi sulle alterazioni endocrine in corso di β -talassemia puntano il dito sulle correlazioni esistenti tra elevati livelli di ferritina, superiori a 1000-1500 ng/ml, e danno endocrino. Inoltre, studi condotti con l'impiego della risonanza magnetica sull'encefalo di pazienti talassemici hanno chiaramente evidenziato la presenza di alterazioni strutturali dell'ipofisi legate al deposito di ferro²³.

Recenti studi hanno dimostrato che esso aumenta la formazione di radicali liberi e la perossidazione dei lipidi con conseguenti alterazioni di alcune strutture cellulari, come le membrane mitocondriali, lisosomiali e citoplasmatiche²⁴. La suscettibilità individuale al sovraccarico di ferro e la sensibilità delle cellule all'effetto di questo metallo possono almeno in parte spiegare la discrepanza esistente tra livelli di ferritina ed alterazione della funzione endocrina riscontrabile in molti pazienti. Oltre al sovraccarico di ferro ed al conseguente danno tissutale altri fattori giocano un ruolo spesso non secondario nella genesi delle alterazioni endocrine nella talassemia. L'anemia cronica con conseguente ipossia tissutale, riscontrabile purtroppo ancora oggi in alcuni Paesi ove le

trasfusioni vengono praticate solo saltuariamente è di per sé in grado di indurre alterazioni endocrine spesso sovrapponibili a quelle riscontrabili nei soggetti politrasfusi. Anche l'epatopatia secondaria al sovraccarico di ferro o legata ad epatiti croniche da infezioni virali, spesso contratte con le trasfusioni, è in grado, soprattutto quando in fase avanzata, di modificare profondamente la funzione endocrina sia attraverso alterazioni del metabolismo epatico degli ormoni, sia modificando il controllo aminergico ipotalamico che presiede alla neuroregolazione della funzione ipofisaria, sia attraverso la ridotta secrezione di ormoni, come l'IGF-I (insulin-like growth factor I), mediatore biologico di gran parte degli effetti somatotropinici, prodotto direttamente dal fegato. Bisogna inoltre ricordare che anche la carente sintesi proteica, spesso grave in corso di epatopatia e la conseguente malnutrizione sono in grado di incidere sulla sintesi ormonale. Inoltre, possibili alterazioni endocrine, soprattutto a livello pancreatico e paratiroideo, potrebbero essere mediate da disordini enzimatici indotti dal sovraccarico di ferro²⁵.

Tutte le ghiandole endocrine possono essere compromesse, portando a quadri clinici di ipotiroidismo, compromissione della crescita staturale, ipogonadismo, mancato sviluppo puberale, diabete, ipocorticosurrenalismo, ipoparatiroidismo e disturbi del metabolismo del calcio, osteopenia ed osteoporosi.

Per quanto riguarda la prevalenza del deficit della funzione tiroidea nei pazienti talassemici, in questi ultimi anni sono stati riportati dati discordanti. Infatti, in alcuni studi la funzione tiroidea è stata descritta come normale, mentre in altre esperienze quadri di ipotiroidismo primario franco o sub-clinico. Discordanti sono inoltre le opinioni riguardanti il possibile ruolo dell'emocromatosi come causa del deficit tiroideo. Queste divergenze possono essere attribuite al ridotto numero di pazienti valutati in alcuni di questi studi, ai diversi protocolli di trattamento utilizzati e alle diverse caratteristiche genetiche e razziali dei pazienti, le quali possono giocare un ruolo nel determinare il quadro di compromissione tiroidea. Tuttavia, studi più recenti hanno dimostrato una condizione di eutiroidismo in circa l'80% dei pazienti, di ipotiroidismo subclinico (normali valori di fT3 e fT4 ma incremento del TSH) nel 4%, di ipotiroidismo franco nel 12%, e una iper-risposta

del TSH dopo stimolo con TRH in un quarto dei pazienti con normali valori ormonali basali²⁶.

Il deficit staturale nei pazienti affetti da Morbo di Cooley è una caratteristica clinica di comune osservazione, come si rileva dai numerosi dati riportati in letteratura. La patogenesi di questo deficit è complessa, multifattoriale ed ancora non completamente chiarita.

Studi recenti dimostrano che anche la terapia ferrochelante con DFX può contribuire al deficit di crescita, in quanto il farmaco è in grado di inibire la sintesi di DNA, la proliferazione dei fibroblasti e la formazione del collagene; può inoltre causare deficit di zinco, a sua volta responsabile di riduzione dei valori di fosfatasi alcalina, un enzima zinco-dipendente. Tutto questo determina displasia ossea, pseudorachitismo, alterazione a livello dei polsi e delle ginocchia e di conseguenza una riduzione della velocità di crescita²⁷.

Inoltre, la presenza di eventuali alterazioni delle ghiandole surrenaliche e tiroidea, ma soprattutto l'ipogonadismo con ritardato o assente sviluppo puberale, presente nel 50-100% dei pazienti talassemici, compromettono ulteriormente lo sviluppo staturale²⁸.

Per quanto riguarda la secrezione di GH, i dati della letteratura sono spesso ottenuti su gruppi ristretti di pazienti trattati con protocolli trasfusionali e di terapia ferro-chelante a volte enormemente differenti. Ciò porta a risultati spesso discordanti tra loro. Sono stati infatti riportati sia una normale secrezione somatotropinica che un iposomatotropinismo di origine prevalentemente ipotalamica.

Il risultato finale, indipendentemente dal livello del difetto, è rappresentato dal non raggiungimento in periodo pre-puberale o puberale di una statura adeguata.

Un ruolo importante sembra attribuibile anche alla somatomedina, mediatore di gran parte degli effetti biologici dell'ormone della crescita, sintetizzato a livello epatico. Infatti, la secrezione di IGF-1 e della sua binding protein IGFBP-3 è spesso ridotta a causa del danno epatico indotto dal sovraccarico di ferro; pertanto l'alterazione dell'asse GH-IGF-IGFBP è responsabile del ritardo di crescita²⁹.

In conclusione, molti fattori contribuiscono al ritardo di crescita, non tutti sono contemporaneamente presenti nei pazienti, ma molti di questi possono essere correlati tra loro.

L'alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi con ritardato o assente sviluppo puberale rappresenta la più frequente alterazione endocrina in corso di β -talassemia omozigote. Tale alterazione interessa in genere il 50-100% dei pazienti²⁴. L'alterazione può essere riconducibile almeno in parte al danno del testicolo e dell'ovaio legato al sovraccarico di ferro; vari studi istologici hanno documentato a livello testicolare un quadro di fibrosi interstiziale, una iperpigmentazione dei tubuli seminiferi indifferenziati e un ridotto numero di cellule del Leyding, e a livello ovarico un ispessimento dello stroma e un ridotto numero di follicoli primordiali³⁰. Tuttavia, nella maggior parte dei casi la funzionalità gonadica è compromessa secondariamente ad una alterata funzione dell'asse ipotalamo-ipofisi legata all'accumulo di ferro a livello ipofisario. Le cellule dell'ipofisi anteriore sono particolarmente sensibili allo stress ossidativo indotto dai radicali liberi e le cellule gonodotrope sembrano esserlo maggiormente rispetto agli altri stipiti cellulari.

Anche dopo il trapianto di midollo osseo, l'unica terapia finora in grado di guarire dalla malattia, permane un deficit della funzione gonadica, probabilmente dovuto all'effetto tossico che i farmaci utilizzati nel regime di condizionamento esercitano sulle gonadi³¹.

Il quadro clinico più frequente è rappresentato dal ritardato o assente sviluppo puberale, con infantilismo genitale e mancata comparsa dei caratteri sessuali secondari. In una percentuale variabile di pazienti lo sviluppo puberale spontaneo può essere più o meno completo ma spesso, nel corso degli anni, funzione sessuale e riproduttiva tendono a peggiorare anche in questi pazienti, con perdita della libido, impotenza, regressione parziale dei caratteri sessuali secondari e amenorrea secondaria³².

La compromissione della funzione pancreatica con ridotta secrezione di insulina, che inizia generalmente nella seconda decade, è un dato di frequente riscontro nel paziente talassemico anche se i meccanismi che ne stanno alla base non sono stati ancora completamente chiariti.

Lo sviluppo del diabete mellito in pazienti talassemici in terapia ipertrasfusionale è stato principalmente correlato all'effetto tossico del ferro a livello della β -cellula con conseguente deficit insulinico.

Sembra esistere una correlazione tra il danno indotto dal sovraccarico di ferro e l'attivazione di un processo autoimmune nel pancreas.

Il deposito di ferro, attraverso il danno ossidativo, contribuisce all'alterazione della β -cellula causando una infiammazione cronica aspecifica con conseguente fibrosi. Il danno a carico della membrana cellulare probabilmente agisce come fattore trigger della risposta autoimmunitaria, responsabile a sua volta del deficit di secrezione insulinica³³.

Molti altri meccanismi sono stati ipotizzati per spiegare l'indiscutibile relazione esistente tra talassemia major e diabete mellito. Senza dubbio rilevante è il danno epatico, sia da accumulo di ferro, sia da infezioni virali post-trasfusionali con conseguente alterazione della tolleranza glucidica, così come rilevanti sono la predisposizione genetica, lo stato puberale e la compliance alla terapia ferro-chelante.

La progressione verso il diabete mellito nella talassemia major avviene per tappe: abbiamo una prima fase di insulino-resistenza con iperinsulinemia compensatoria e normale tolleranza glucidica ed una fase successiva con ridotta tolleranza glucidica, cui segue un esaurimento delle β -cellule e conseguente deficit di secrezione insulinica progressiva fino al diabete clinico³⁴.

Si sottolinea l'importanza di diagnosticare precocemente in questi pazienti un'alterazione nel metabolismo dei carboidrati, in quanto l'intensificazione della terapia ferro-chelante permette di ridurre il dosaggio della terapia insulinica necessaria ai pazienti diabetici, così come è in grado di prevenire l'insorgenza del diabete mellito se iniziata ad un'età precoce³⁵.

Anche il surrene, come molte altre ghiandole endocrine, può essere interessato dall'emosiderosi, soprattutto nei pazienti trattati a lungo con terapia trasfusionale. In letteratura si segnala una funzionalità surrenalica normale con ritmo circadiano del cortisolo conservato e normali livelli plasmatici di aldosterone. E' stata però evidenziata un'alterazione del ritmo secretorio circadiano dell'ACTH³⁶, nonché una iper-risposta dell'ACTH allo stimolo con CRH

in presenza di normali valori di cortisolemia e cortisoluria. Altro dato rilevante per quanto concerne la funzionalità surrenalica nella β -talassemia è la dissociazione tra secrezione di cortisolo, in genere normale, e secrezione di androgeni surrenalici, caratterizzata da ridotti livelli di DHEA e DHEA-S. Come è noto, questi ormoni giocano un ruolo di rilievo nell'induzione dell'adrenarca, prima tappa dello sviluppo puberale.

L'ipocalcemia è una condizione di frequente riscontro nei pazienti talassemici e la sua eziologia è multifattoriale. Le cause più comuni sono l'ipoparatiroidismo, il deficit di Vitamina D, il danno epatico cronico che impedisce l'idrossilazione della Vitamina D, l'espansione midollare e la riduzione della massa ossea e del contenuto midollare. L'ipoparatiroidismo è una complicanza endocrina che si verifica nei pazienti talassemici dopo i sedici anni di età ed ha una prevalenza del 10.7%³⁷. La riduzione di secrezione del paratormone sembra essere la conseguenza del danno indotto dal sovraccarico di ferro a livello delle ghiandole paratiroidee e del riassorbimento osseo dovuto all'espansione del midollo eritropoietico secondario all'eritropoiesi inefficace e all'anemia cronica. Dal punto di vista clinico l'ipoparatiroidismo si manifesta con ipocalcemia, iperfosfatemia, normali o ridotti livelli di fosfatasi alcalina e normali livelli di Vitamina D³⁵.

La terapia è basata sulla somministrazione di calcio e metaboliti attivi del colecalciferolo.

Osso

L'osteoporosi è una patologia caratterizzata da riduzione della massa ossea con alterazione della sua struttura, perdita o decremento della resistenza del tessuto osseo e conseguente maggior rischio di fratture³⁸.

Le regioni più frequentemente colpite dalle fratture osteoporotiche sono i corpi vertebrali, la porzione distale dell'avambraccio e la regione prossimale del femore.

Lo scheletro umano è costituito da due tipi di osso: l'osso corticale, localizzato nello strato più esterno, e l'osso trabecolare, che rappresenta lo strato spongioso più interno. Le cellule deputate alla neoformazione ossea sono denominate

osteoblasti e quelle invece deputate alla rimozione o al riassorbimento osseo vengono denominate osteoclasti.

Questo continuo processo di riassorbimento e neoformazione determina rimodellamento di circa il 10% dello scheletro adulto ogni anno. In sintesi, la massa ossea totale nello scheletro è il risultato del bilancio tra la quantità totale di massa ossea acquisita nelle prime decadi di vita e quella successivamente persa nel corso degli anni.

L'acquisizione dell'osso mineralizzato è un processo graduale che inizia precocemente nell'infanzia e subisce una drammatica accelerazione durante l'adolescenza, per raggiungere il picco di massa ossea all'età di circa 20 anni. Fisiologicamente, infatti, all'età di 9 anni il contenuto totale di minerali nell'osso è di circa 900 g; questo viene più che raddoppiato all'età di 21 anni, quando raggiunge valori di circa 2200 g³⁹. Da allora si assiste ad una progressiva perdita, pari all'1% annuo. Nelle donne si ha un'accelerazione della perdita ossea dopo la menopausa come verrà spiegato più avanti, dovuta probabilmente alla mancanza degli effetti protettivi degli estrogeni. In particolare Compston *et al.* hanno stimato che il rischio di frattura osteoporotica nelle donne inglesi di età superiore ai 50 anni è pari al 14% per il femore ed all'11% per la colonna vertebrale⁴⁰.

Il picco di massa ossea, così come il ritmo di perdita ossea, sono influenzati da numerosi fattori tra cui quelli genetici, nutrizionali (dieta povera di calcio) comportamentali (esercizio fisico, fumo, alcool)⁴¹ nonché, molto importanti, fattori endocrini, quali l'ipoestrogenemia delle donne dopo la menopausa⁴².

Già nella prima descrizione del quadro clinico della talassemia fatta da Cooley nel 1925 venivano citate le alterazioni ossee. Queste ultime consistevano in un allargamento delle ossa craniche e facciali che conferiva ai pazienti un aspetto mongoloide. Lo studio radiologico delle ossa craniche mostrava caratteristiche alterazioni della loro struttura, che i radiologi considerano patognomoniche di tale patologia. Le ossa lunghe manifestavano le stesse modificazioni.

Le alterazioni ossee descritte da Cooley derivano dalla notevole espansione midollare che fa seguito, come abbiamo visto, all'enorme stimolo all'eritropoiesi compensatoria, risultato dell'eritropoiesi inefficace e della maggiore distruzione periferica dei globuli rossi, causa di anemia. L'espansione midollare nei pazienti

non trasfusi o ipotrasfusi può raggiungere valori pari a 15-30 volte i valori normali, provocando di conseguenza distorsione e fragilità ossee. Le ossa craniche dei bambini affetti da talassemia major non trattati sono allargate con la presenza di bozze frontali e posteriori, ipertrofia della mascella con retrazione del labbro superiore, prominenza dell'arcata dentaria superiore e conseguente malocclusione. Si osserva inoltre avvallamento della radice del naso e allungamento della rima palpebrale.

Dal punto di vista morfologico a carico delle ossa craniche sono evidenti un assottigliamento dei tavolati esterno e interno prevalentemente a carico delle ossa della calotta, una dilatazione notevole della diploe con assottigliamento delle trabecole ossee e dilatazione degli spazi midollari; a ciò si associa una reazione del periostio che provoca una neoformazione di trabecole ossee perpendicolari alla calotta cranica, con conseguente comparsa del caratteristico aspetto radiologico del "cranio a spazzola".

Si riscontrano anche alterazioni a carico delle ossa lunghe, ove prevalgono i processi osteolitici che provocano l'assottigliamento della corticale, mentre sono di solito modesti i segni di neoformazione ossea⁴³.

La colonna vertebrale mostra deformità, scoliosi, cifosi e collassi vertebrali con conseguente compressione del midollo spinale.

Tutte queste alterazioni sono la conseguenza dell'espansione midollare, di una severa osteoporosi e della eritropoiesi extramidollare⁴⁴.

Le coste contengono midollo osseo durante tutta la vita: l'iperattività del midollo determina osteoporosi, traslucenze localizzate, erosioni corticali e deformità che assumono l'aspetto così detto a "costa dentro costa"⁴⁵.

Tutte queste alterazioni sono state osservate in pazienti, come detto precedentemente, non trasfusi o ipotrasfusi, dove lo stimolo da parte dell'anemia all'eritropoiesi compensatoria è elevatissimo; i nuovi protocolli terapeutici hanno profondamente modificato questo quadro.

I regimi trasfusionali attuati oggi consentono di mantenere una emoglobina pre-trasfusionale di circa 9-10 g/dl, determinando una importante soppressione dell'espansione midollare e limitando così le lesioni ossee da queste derivate. Nonostante ciò, numerosi studi evidenziano come la patologia ossea e

l'osteoporosi in particolare rivestano ancora un ruolo di rilievo nei pazienti affetti da talassemia major^{46,47}.

Giardinia *et al.* hanno misurato il contenuto minerale osseo di pazienti affetti da talassemia major ben trasfusi e ben chelati e hanno riscontrato una elevata incidenza di osteoporosi a livello della colonna vertebrale in entrambi i sessi⁴⁸.

Jensen *et al.* hanno studiato 82 pazienti di età compresa tra i 12 e 43 anni di entrambi i sessi, tutti affetti da talassemia major, che hanno ricevuto un trattamento trasfusionale e ferrochelante ottimale secondo gli schemi attuali; l'osteoporosi è stata osservata nel 42% dei pazienti⁴⁹. Tali dati sono stati avvalorati anche in recenti lavori di De Sanctis⁴³ e Chan⁵⁰.

Le complicanze endocrine hanno acquisito un ruolo di rilievo nella storia naturale della talassemia, soprattutto nei pazienti adulti che sono stati sottoposti ad una adeguata terapia trasfusionale e ferrochelante, sia per quel che concerne la prevalenza di queste complicanze, sia per quel che concerne la morbilità da esse prodotta²⁵.

Tra i fattori più rilevanti che condizionano il metabolismo osseo sicuramente si collocano gli ormoni sessuali.

Il testosterone ha un effetto stimolante diretto sulla differenziazione e sulla proliferazione degli osteoblasti. Il meccanismo attraverso il quale questo processo avviene non è perfettamente conosciuto, tuttavia è stato ipotizzato che un ruolo importante possa essere svolto dalla stimolazione della produzione di fattori di crescita⁵¹ e dalla modulazione della velocità di differenziazione degli osteoblasti e degli osteoclasti, con rallentamento del rimaneggiamento⁵².

Sia gli estrogeni che il progesterone sono noti essere attivi nel metabolismo osseo, limitandone il riassorbimento e promuovendone la neoformazione.

Come già accennato l'ipogonadismo ipogonadotropo è la più comune complicanza endocrina nel paziente affetto da talassemia major ed esso gioca un ruolo di notevole importanza nello sviluppo dell'osteopenia-osteoporosi di tale condizione. Questo viene confermato anche dall'osservazione che la terapia ormonale sostitutiva, attuata in modo continuo mediante estrogeni porta ad un incremento dei parametri di densità ossea⁵³. Anche lo studio di Jensen *et al.*⁴⁸, seguito da quelli più recenti di Chatterjee⁵⁵ e Caruso-Nicoletti³², conferma come

l'ipogonadismo fornisca un contributo sostanziale allo sviluppo dell'osteoporosi, dimostrando che i pazienti che non sono andati incontro ad una pubertà spontanea sono affetti da una osteoporosi più severa rispetto a coloro i quali hanno avuto un normale sviluppo puberale.

Anche i pazienti talassemici affetti da diabete mellito rappresentano una popolazione caratterizzata generalmente da un decremento della densità minerale ossea^{56,57}. Infatti anche nella popolazione talassemica si riscontra una stretta relazione tra diabete e la severità della patologia ossea⁵⁸.

L'ipoparatiroidismo può probabilmente intervenire nella patogenesi dell'osteoporosi, ma tale intervento non è sufficientemente quantificabile, mentre il ruolo svolto dall'ipotiroidismo nella genesi dell'osteoporosi non è ancora stato chiarito.

La DFX, farmaco chelante il ferro indispensabile per la sopravvivenza dei pazienti talassemici, presenta, a seguito di un suo uso continuativo, effetti tossici a carico dello scheletro⁵⁹. Inibisce infatti la sintesi del DNA, la proliferazione dei fibroblasti, la formazione di collagene e può portare ad un deficit di zinco. Pazienti che ricevono in modo inappropriato dosi eccessive di DFX, vanno frequentemente incontro ad alterazioni a carico del femore, a ginocchio valgo con difficoltà alla deambulazione, ad arresto o a severa riduzione della velocità di crescita. Le misure corporee risultano sproporzionate e caratteristicamente si osserva tronco accorciato e sproporzione tra gli arti superiori ed inferiori.

Dal punto di vista radiologico sono state documentate: platispondilosi vertebrale e lesioni cosiddette a "racchetta" a livello degli arti⁵⁹.

Il riscontro di tali alterazioni fa supporre che la terapia ferrochelante possa giocare un ruolo nella genesi della patologia ossea ed in particolare nella genesi dell'osteoporosi.

Garofano *et al.* hanno studiato un gruppo omogeneo di pazienti affetti da talassemia major di età compresa tra gli 8 e i 14 anni, in fase pre-puberale, tutti regolarmente trasfusi e chelati, nei quali il sovraccarico di ferro si era sempre mantenuto relativamente basso: in questo gruppo si è rilevata una prevalenza di osteopatia pari all'85% e di bassa statura pari al 50%, con riduzione della velocità di crescita. Le alterazioni ossee non sembrano imputabili né all'anemia né al

sovraccarico di ferro, in quanto i pazienti erano adeguatamente chelati. I dati suggeriscono che la ferrochelazione di per sé potrebbe aver contribuito al danno osseo in questi pazienti in età pre-puberale che non presentavano ancora quelle complicanze endocrine (ipogonadismo, diabete, ipoparatiroidismo e ipotiroidismo) e che possono contribuire, almeno in parte, alla patologia ossea⁶⁰.

Sebbene questi risultati suggeriscono l'opportunità di approfondire il ruolo della terapia ferrochelante nel determinismo dell'osteoporosi, i nuovi farmaci volti a contrastare l'accumulo marziale potrebbero avere un impatto meno evidente a livello osseo rispetto alla desferoxamina.

I fattori genetici svolgono un ruolo importante nel determinismo della densità minerale ossea. Questa sembra essere regolata da una ereditarietà poligenica, tuttavia i geni coinvolti sono ancora poco definiti. Un ruolo importante anche se non completamente chiarito è attribuito al gene che codifica per i recettori degli estrogeni a livello osseo⁶¹. Anche il gene che codifica per il recettore della vitamina D è implicato nella regolazione della massa ossea.

Il collagene di tipo I è la proteina principale dell'osso, questa proteina viene codificata dai geni COL1A1 e COL1A2. Il polimorfismo G→T, presente in una regione regolatoria del gene COL1A1 a livello del sito di riconoscimento per il fattore di trascrizione Sp1, è stato recentemente associato alla riduzione della massa ossea e alle fratture osteoporotiche nelle donne inglesi e tedesche in post-menopausa^{62,63}.

In un recente studio effettuato sui pazienti talassemici questo polimorfismo è stato riscontrato nel 30% circa dei casi in forma eterozigote e nel 4% circa in forma omozigote, con un rapporto maschi/femmine di 2:1, facendo supporre che nei maschi talassemici il polimorfismo per l'Sp1 possa contribuire alla genesi dell'osteoporosi. Nelle donne tale associazione non risulta invece statisticamente significativa⁶⁴. Questa ipotesi verrebbe rafforzata dall'osservazione che l'osteoporosi è più frequente e più grave nei pazienti talassemici maschi rispetto alle femmine.

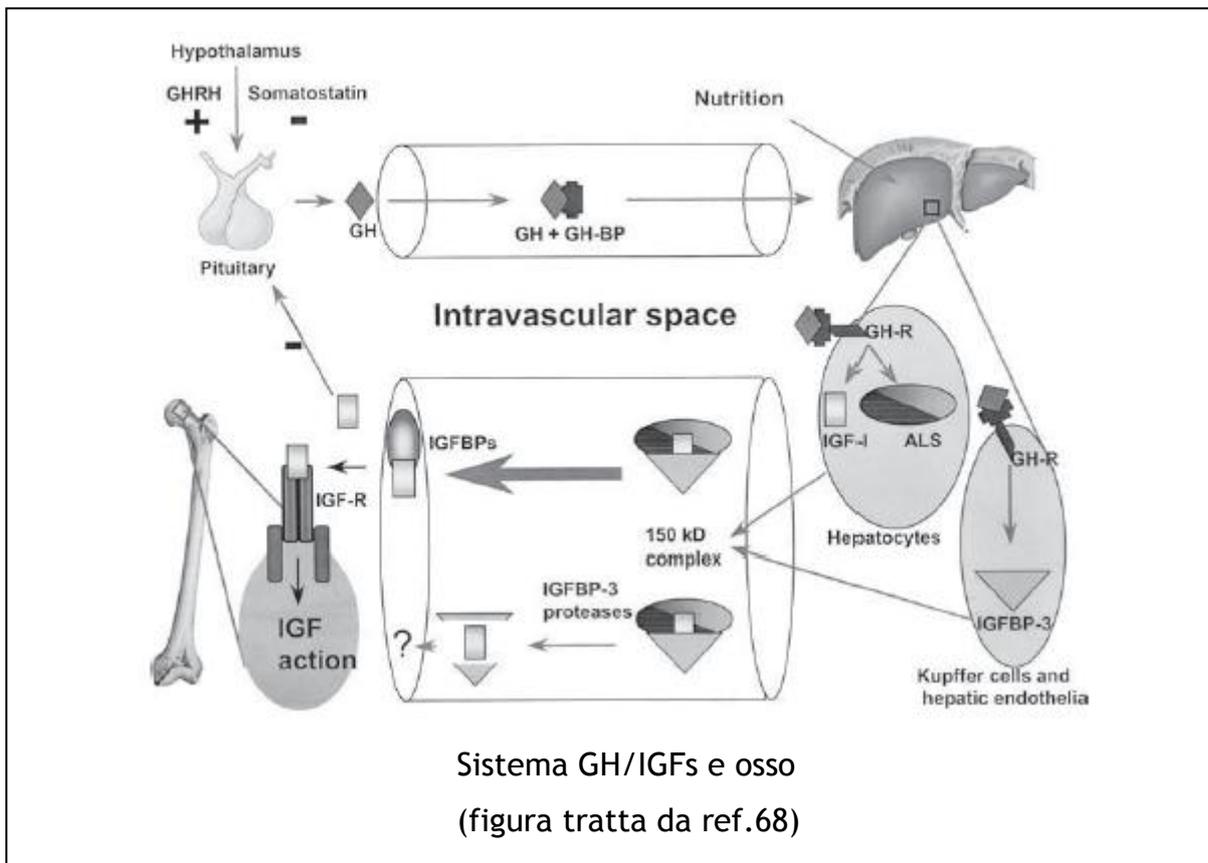
Osso e sistema GH/IGFs

L'asse GHRH-GH-IGF1 sembrerebbe anch'esso implicato nella genesi dell'osteopatia nel morbo di Cooley⁶⁵ⁱ.

Gran parte delle azioni somatotrope su vari tessuti è mediata dalla produzione di Insulin like Growth Factor I (IGF-I). IGF-I, originariamente noto come somatomedina C, è di fatto il mediatore somatico della crescita, il cui gene è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 12⁶⁶. Si tratta di un fattore di crescita polipeptidico costituito da 70 aminoacidi del peso molecolare di 7.5 kDa e una struttura per il 70% omologa a IGFII e per il 50% alla proinsulina⁶⁷. Il fegato costituisce la maggiore fonte di IGF-I sebbene ne esista una produzione locale di rilevante importanza fisiologica⁶⁸. IGF-I ha azioni non solo endocrine ma anche autocrine e paracrine. Alcuni ormoni quali estrogeni, PTH e glucocorticoidi influenzano la produzione di IGF-I^{69,70}, tuttavia l'ormone somatotropo è il maggior determinante della secrezione epatica del fattore di crescita. IGF-I circolante dipende dall'età, con bassi livelli alla nascita, un picco alla pubertà e livelli costantemente in diminuzione nell'età adulta^{69,71}.

E' ampiamente dimostrata in un soggetto sano l'importanza dell'azione dell'ormone della crescita (GH) nel normale processo di rimodellamento osseo.

Il GH agirebbe con meccanismo diretto e tramite incremento della secrezione di IGF1 sia a livello epatico che a livello locale⁷² stimolando la proliferazione degli osteoblasti e le loro funzioni tra cui la produzione di fosfatasi alcalina, osteocalcina e collagene di tipo I⁷². Su stimolo di GH, ormone paratiroideo ed estrogeni, gli osteoblasti rilasciano a livello locale IGF-I, che stimola la sintesi del DNA e la replicazione delle cellule della linea osteoblastica; inoltre le somatomedine svolgono un ruolo fondamentale nel promuovere le funzioni degli osteoblasti maturi⁷³. IGF-I è stato inoltre dimostrato promuovere la differenziazione degli osteoclasti da precursori mononucleati e stimolare l'attività degli osteoclasti preesistenti⁷⁴.



I due meccanismi di azione del GH, diretto e mediato, appaiono integrati e sinergici. Pazienti ipostaturici prepuberi con deficit di GH presentano valori di densità minerale ossea (BMD) ridotti, e la terapia sostitutiva consente un miglioramento dell'osteopenia.

Pertanto, anche in pazienti con deficit di GH acquisito in età adulta è stato dimostrato un quadro di osteoporosi secondaria con rischio di fratture⁷⁵, e la terapia sostitutiva a lungo termine ha portato un netto miglioramento del quadro osteometabolico^{76,77}.

Come già accennato, una quota di pazienti talassemici prepuberi ipostaturici studiati presenta un deficit di GH con valori deficitari di IGF1 e IGFBP3.

In pazienti talassemici prepuberi GH deficitari, Sartorio *et al.* hanno dimostrato come la terapia sostitutiva abbia comportato un incremento dei valori di BMD e ripercussioni sul quadro metabolico osseo⁷⁸.

In un paziente adulto talassemico ipostaturico, ipogonadico, non sostituito e gravemente osteoporotico, Danesi *et al.* hanno mostrato come la terapia con GH abbia determinato, parallelamente ad un aumento dell'altezza, un incremento della BMD sia a livello femorale che vertebrale⁷⁹.

Di fatto, precedenti studi condotti in pazienti talassemici adulti hanno documentato una correlazione positiva tra i livelli di IGF-I e i valori di BMD vertebrale e femorale ^{65,80}. A tale proposito, in una nostra recente pubblicazione, è stata descritta una correlazione positiva tra i picchi di GH e la mineralizzazione ossea a livello femorale in presenza di valori medi di BMD significativamente inferiori nei pazienti affetti da GHD severo rispetto ai soggetti con normale secrezione somatotropa ⁸¹. Come possibile interpretazione delle suddette osservazioni si potrebbe supporre che la scarsa secrezione di GH possa influenzare negativamente la produzione locale di somatomedine (IGFs) a livello osseo. In alternativa si potrebbero prendere in considerazione eventuali difetti di bioattività di IGF-I o anomalie di produzione di IGF-II, il fattore di crescita maggiormente espresso nella matrice ossea nell'uomo.

IGF-II è un peptide costituito da 67 aminoacidi con un peso molecolare di 7.5 kDa il cui gene è collocato sul braccio corto del cromosoma 11 ⁸². Come per IGF I anche la produzione di IGF-II è in gran parte epatica e, sebbene dopo la nascita il GH non stimoli la secrezione di IGF II, i livelli di quest'ultimo risultano ridotti di circa il 20% negli stati di deficit somatotropo, probabilmente secondariamente ai ridotti livelli delle proteine di legame, la cui produzione dipende dal GH. Al momento attuale non si conoscono del tutto i maggiori fattori che influenzano i livelli circolanti di IGF-II che risultano bassi alla nascita, aumentano nelle prime settimane di vita e poi rimangono stabili. Efstradiatis et al. ha dimostrato che IGF-II è il più importante fattore di crescita fetale ma non ha effetti sullo sviluppo somatico post-natale. Nella maggior parte dei tessuti è espresso l'allele paterno di IGF II mentre la copia materna risulta silente; l'espressione biallelica della somatomedina è stata documentata nel midollo osseo ⁸³.

La definizione del ruolo delle somatomedine nel determinare l'accrescimento scheletrico è stato studiato con l'utilizzo di modelli murini knockout per i geni codificanti IGF I e IGF II o i loro recettori. Tali studi hanno confermato che entrambi i fattori di crescita sono fondamentali per lo sviluppo prenatale dal momento che ratti deficitari raggiungevano solo il 60% delle normali dimensioni alla nascita ⁸⁴. Il tessuto scheletrico è ricco di IGFs; in estratti di tessuto osseo femorale prelevati in corso di interventi di posizionamento protesico Baylink et al.

hanno documentato la presenza di fattori in grado di stimolare la mitosi cellulare in colture di osso murino. Il fattore di crescita così descritto è stato successivamente purificato, sequenziato e denominato IGFII⁸⁵. Sia IGF I che IGF II si legano al recettore IGFIR, mentre solo IGFII lega IGFIR 2 receptor.

Recentemente è stato dimostrato che condizioni di ipossia inibiscono la differenziazione osteogenica delle cellule mesenchimali pluripotenti con un meccanismo di downregulation sull'espressione genica di bmp2 and runx2⁸⁶. È stato inoltre dimostrato che l'ipossia è un importante fattore di stimolo per gli osteoclasti e il riassorbimento osseo⁸⁷. Di fatto, in colture cellulari incubate con O₂ 10% per 6 giorni, il numero di osteoclasti è aumentato di circa 1.6 volte rispetto a quello in colture incubate con O₂ 20%. Peraltro una non ottimale ossigenazione potenzia la formazione degli osteoclasti indotta da RANKL unitamente a variazioni nell'espressione di diversi geni; in particolare determina una upregulation di IGF II che sembra essere a sua volta coinvolta nella osteoclastogenesi⁸⁸. Considerando la patologia talassemica e la condizione di ipossia tissutale ad essa potenzialmente associata, le suddette osservazioni risultano interessanti per lo studio fisiopatologico delle complicanze osteometaboliche.

Per concludere in merito al potenziale ruolo di IGF II sul metabolismo osseo, è stato dimostrato che l'aggiunta della somatomedina esogena a colture di osteoblasti determina un significativo incremento dell'espressione di fosfatasi alcalina, indice di rimaneggiamento osseo⁸⁹

In considerazione del documentato fisiologico contributo del sistema GH/IGF nella mineralizzazione scheletrica e della diffusa compromissione ossea nella patologia talassemica, scopo del presente studio è stato quello di approfondire per la prima volta le relazioni fra IGFs circolanti da un lato e metabolismo e densità ossea dall'altro in un gruppo molto ampio di soggetti talassemici adulti.

STUDIO SPERIMENTALE

PAZIENTI E METODI

Nel presente studio sono stati inclusi 139 pazienti affetti da β -talassemia major e in minor misura intermedia politrasfusi (età media 32.3 ± 7.87 anni); tutti i soggetti erano in stabile regime trasfusionale e trattamento ferrochelante da almeno 15 anni. Al momento dello studio i pazienti presentavano livelli di emoglobina > 7.5 g/dl, adeguato stato nutrizionale ed eventuali terapie ormonali sostitutive di funzionalità tiroidea, gonadica e corticosurrenalica ove necessarie. In ciascun soggetto sono stati determinati i livelli sierici di IGF-I, IGF-II, osteocalcina, CTx, NTx urinario.

Le concentrazioni sieriche di IGF-I sono state determinate con metodica CLIA (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA); i coefficienti di variabilità intra-dosaggio per valori medi di IGF-I di 63, 208 e 766 $\mu\text{g/l}$ sono del 4.8%, 5.2% e 4.4%, rispettivamente e quelli inter-dosaggio per livelli medi di IGF-I di 62, 215 e 811 $\mu\text{g/l}$ sono del 7.1%, 5.7% e 7.4%, rispettivamente. La sensibilità della metodica è di 6 $\mu\text{g/l}$. I livelli di somatomedina c sono espressi come IGF-I SDS, calcolati secondo la formula⁹⁰ : $\text{IGF-I SDS} = (\log[\text{IGF-I}] + 0.00625 \times \text{età} - 2.555)/0.104$. I valori di IGF-I SDS sono stati utilizzati per l'analisi statistica; livelli < -1.88 (3° percentile) sono stati considerati inferiori alla norma.

I livelli di IGF II sono stati determinati mediante metodica RIA (Mediagnost Reutlingen - Germania) mediante utilizzo di specifici anticorpi policlonali ad elevata affinità. La cross-reattività con IGF I è inferiore allo 0.05% e la sensibilità pari a 0.1 ng/ml. Il coefficiente di variabilità inter-dosaggio è pari al 7.9% , e intra-dosaggio non eccede il 5.4%. In considerazione dell'età dei pazienti arruolati, è stato considerato un range di normalità per valori IGF II compresi tra 360 e 880 ng/ml (rispettivamente 3° e 95° percentile di IGF II in una popolazione sana di età compresa tra 20 e 40 anni).

La riserva somatotropa è stata valutata mediante test di stimolo potenziato con GHRH (Geref, Serono, Rome, Italy) in bolo e.v. (0.5 g/kg peso corporeo, massimo 30 g) + arginina (S.A.L.F., Torino, Italy) in infusione in 30 minuti attraverso

differente accesso venoso; i campioni ematici sono stati quindi raccolti a 15, 30, 45, 60, e 90 minuti dopo l'inizio dell'infusione e centrifugati a 1000 g per 10' a 4 °C. Il siero è stato poi conservato a -20 °C fino al momento del dosaggio di GH eseguito mediante chemiluminescenza (CLIA, Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA); i coefficienti di variabilità intra-dosaggio per valori medi di GH pari a 0.8, 5.9 e 17.1 µg/l è del 2.8%, 3.7% e 5.4%, rispettivamente mentre i coefficienti di variabilità inter-dosaggio per valori medi di GH pari a 0.1, 6.2, 16.2 µg/l sono di 7.5%, 6.2% e 8.7%, rispettivamente. La sensibilità della metodica è di 0.02 µg/l.

La presenza di deficit di GH severo e parziale è stata diagnosticata in presenza di picchi di GH rispettivamente < 9 ng/ml e compresi tra 9 e 16 ng/ml, secondo la normale pratica clinica.

I livelli sierici di osteocalcina sono stati determinati mediante CLIA (LIAISON, DiaSorin, Stillwater, MN, USA); la sensibilità del dosaggio è di 0.3 µg/l.

I valori di NTx sono stati misurati mediante enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Wampole Laboratories, Princeton, NJ, USA). Il limite di sensibilità della metodica è di 20 nmol BCE.

La densità minerale ossea (BMD) lombare e femorale è stata determinata mediante DEXA (Hologic QDR 2000 Plus densitometer - Hologic Inc., Waltham, MA, USA). I livelli di BMD sono espressi come T-score, parametro di confronto con la BMD di soggetti adulti, rappresenta il numero di deviazioni standard dalla BMD media di una popolazione giovane e sana. La diagnosi di osteoporosi è stata posta sulla base del riscontro di valori di T-score \leq -2.5 come da linee guida attuali.

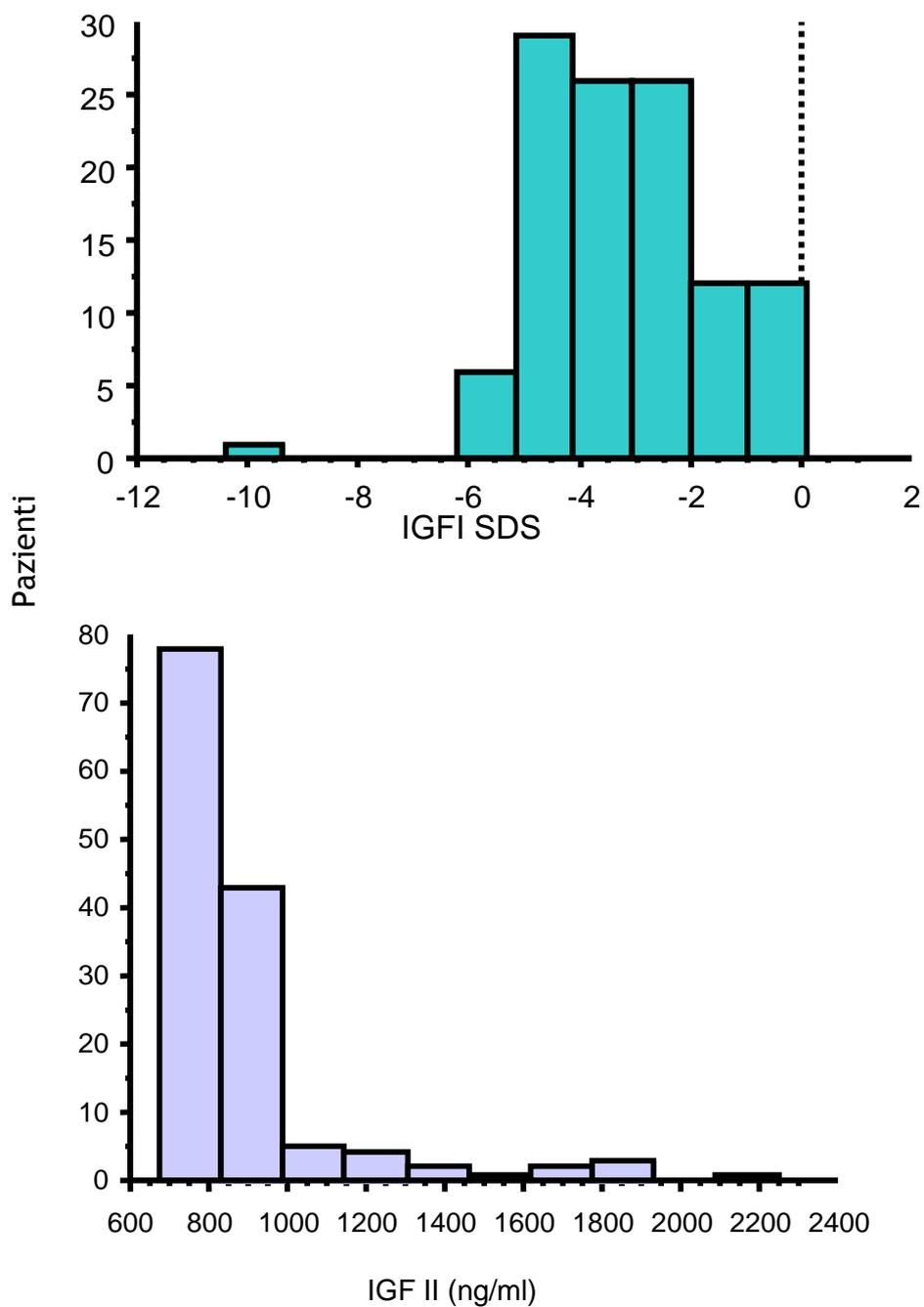
ANALISI STATISTICA

I risultati sono espressi come media \pm SEM. Per il confronto tra gruppi è stato utilizzato il test di Student per dati spaiati; per la valutazione dell'associazione tra variabili è stata eseguita una analisi di regressione lineare. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un software disponibile in commercio (StatView, Abacus Concepts, Berkeley, USA). Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

I livelli di IGF-I sono risultati inferiori alla norma per età nell'86.7% dei soggetti; in nessun caso sono stati documentanti bassi valori di IGF-II (Fig. 1).

Figura 1



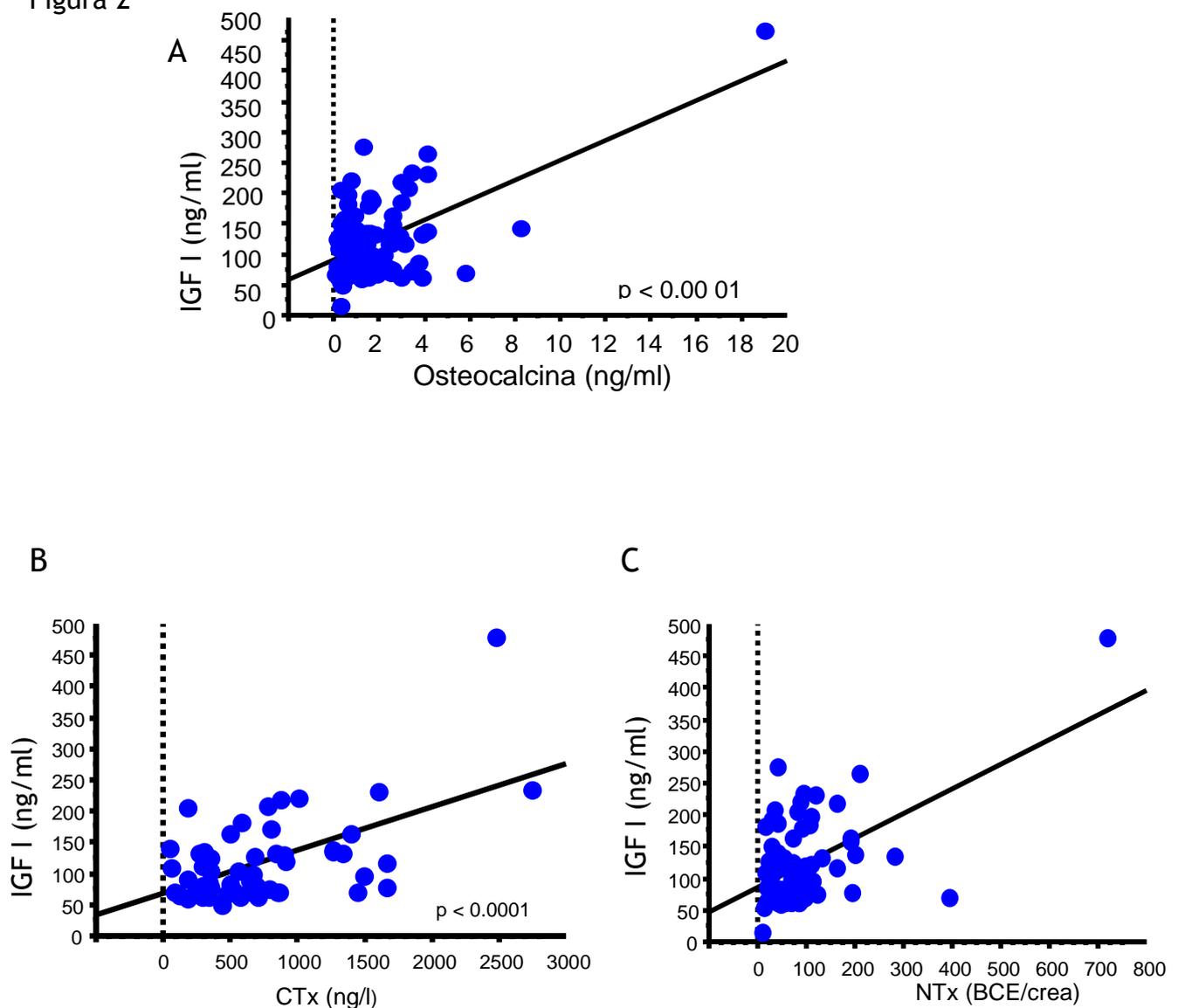
Un quadro di osteoporosi è stato documentato a livello femorale nel 58.1% dei soggetti e a livello lombare nel 54.3% dei pazienti.

Un deficit severo di GH era presente nel 27.9% dei soggetti.

Nell'intero gruppo di pazienti, non sono state osservate correlazioni tra picco di GH da un lato e osteocalcina, CTx e NTx dall'altro.

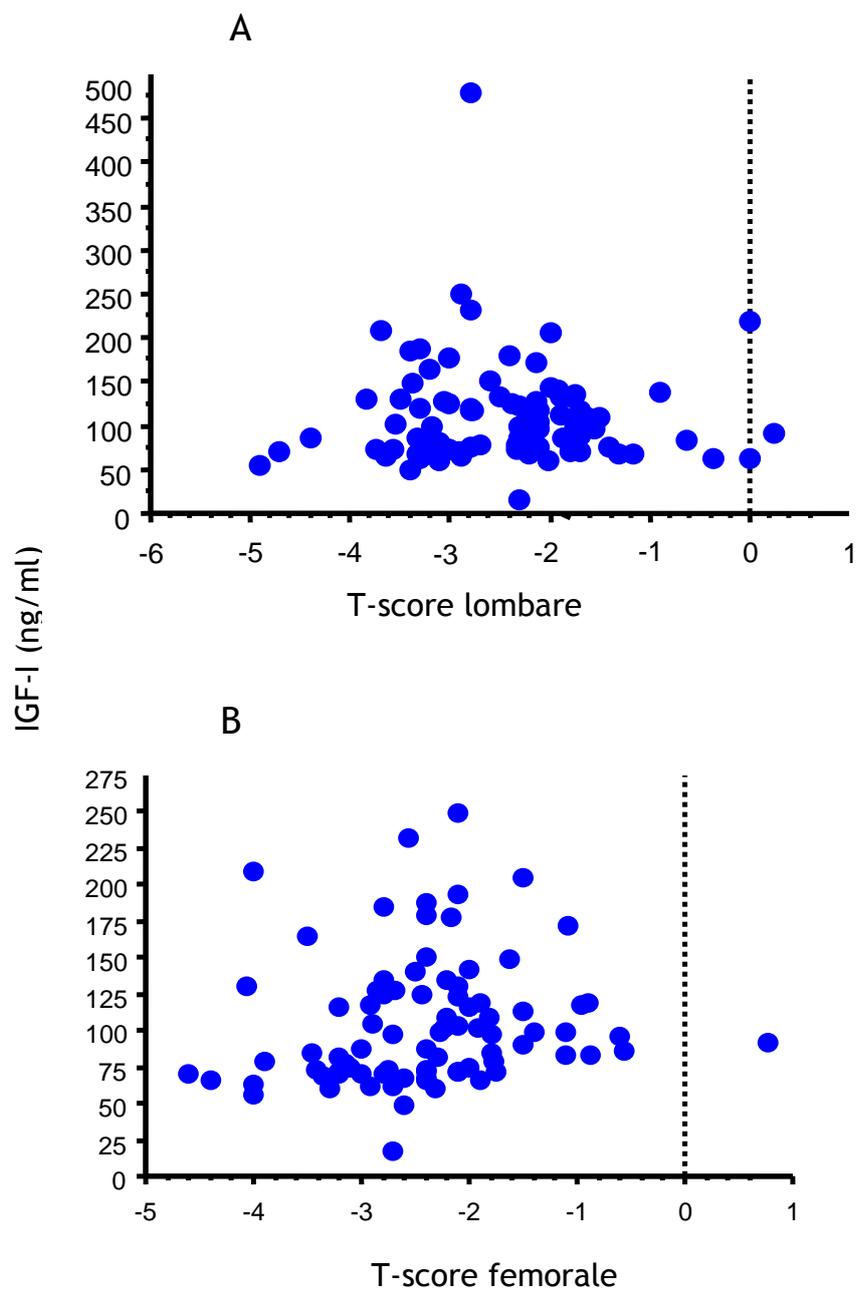
I livelli di IGF-I risultavano positivamente correlati con picco di GH ($p < 0.01$), osteocalcina (Fig. 2A), CTx (Fig. 2B) e NTx (Fig. 2C), e negativamente correlati con l'età ($p < 0.0001$).

Figura 2



D'altro canto i livelli di IGF-I non appaiono correlati con i T-score femorale e lombare (Fig. 3A e B).

Figura 3



Non sono state osservate correlazioni fra IGF-II e alcuno dei citati parametri (Fig. 4A, B e C; Fig. 5A e B), fatta eccezione per l'età (correlazione negativa, $p < 0.05$) (Fig 6).

Figura 4

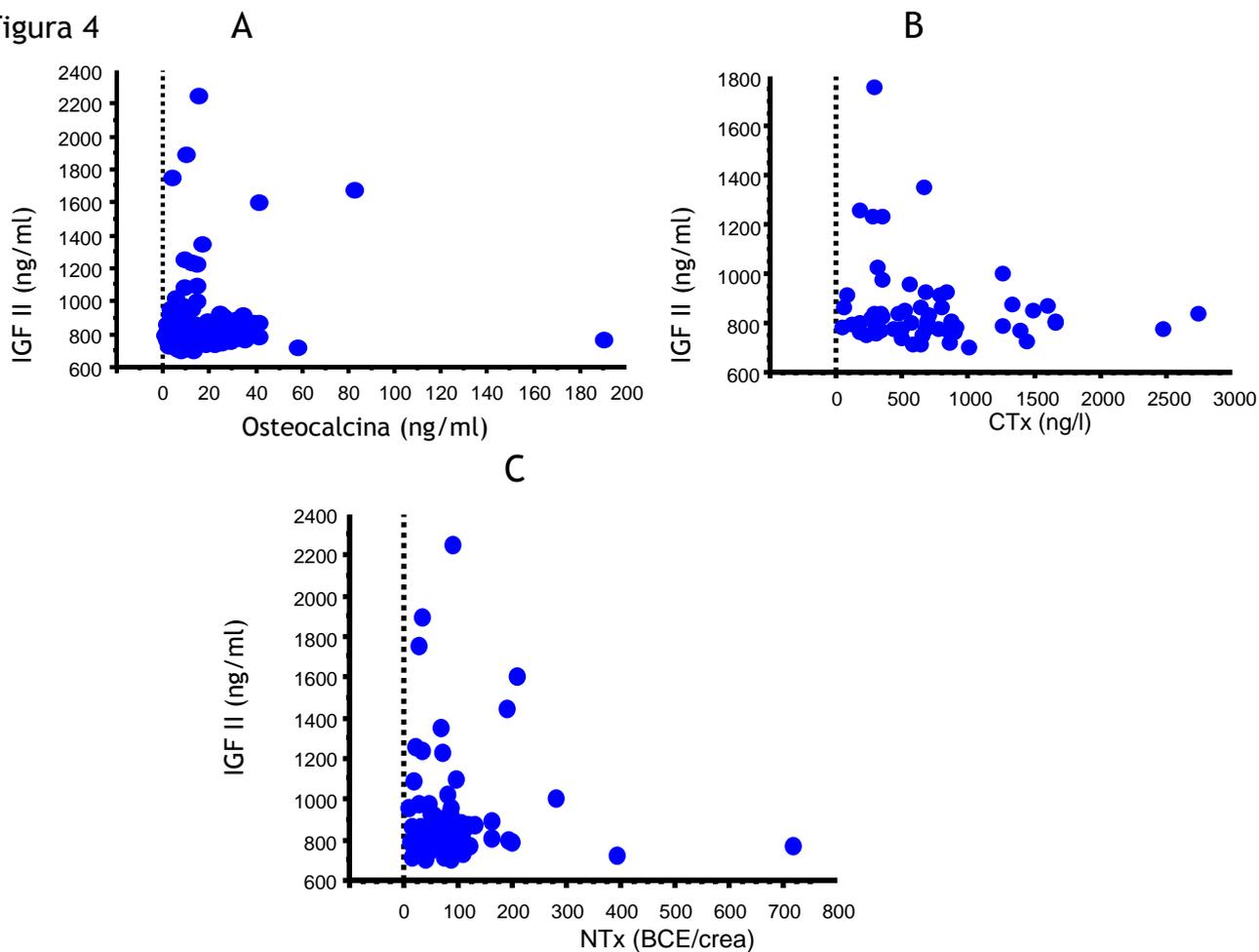


Figura 5

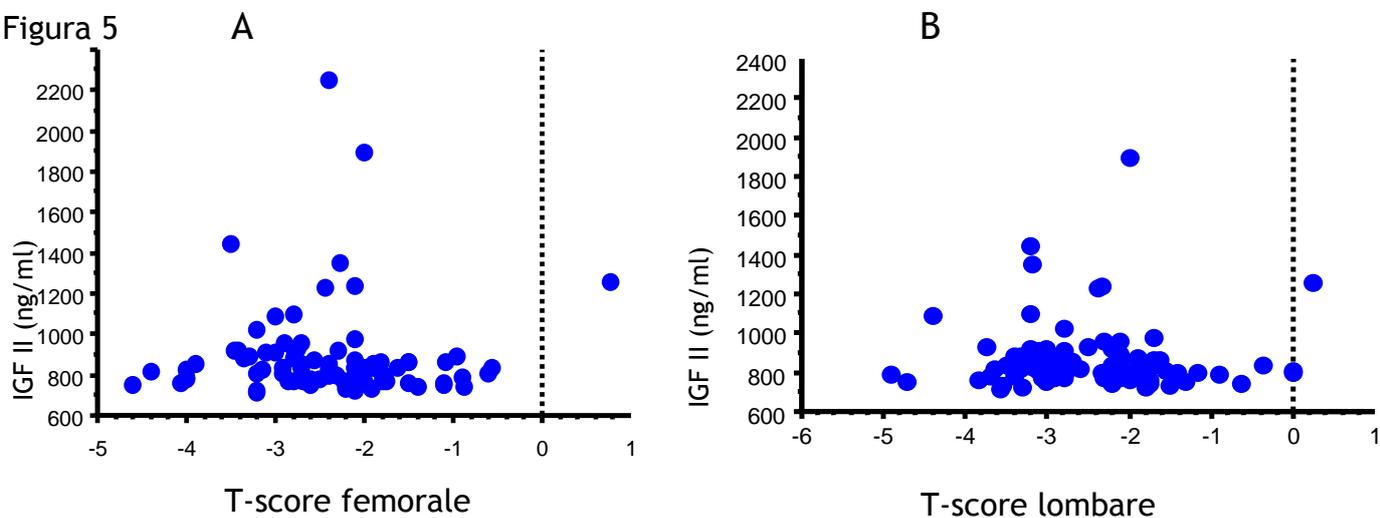
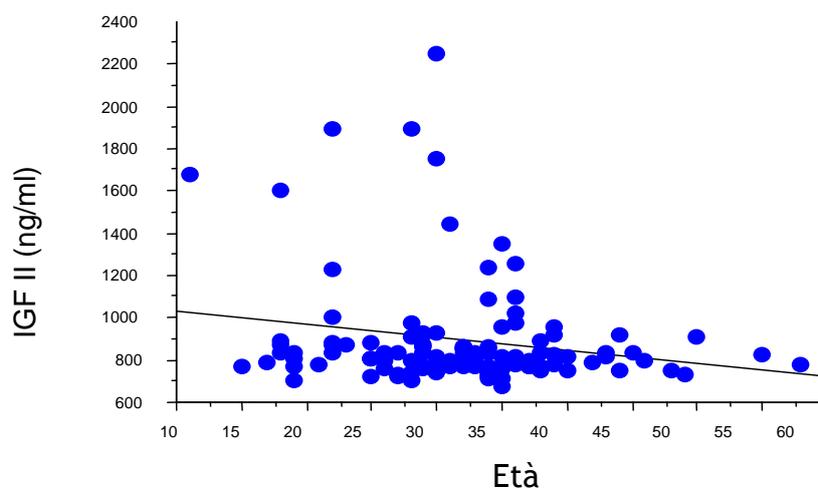
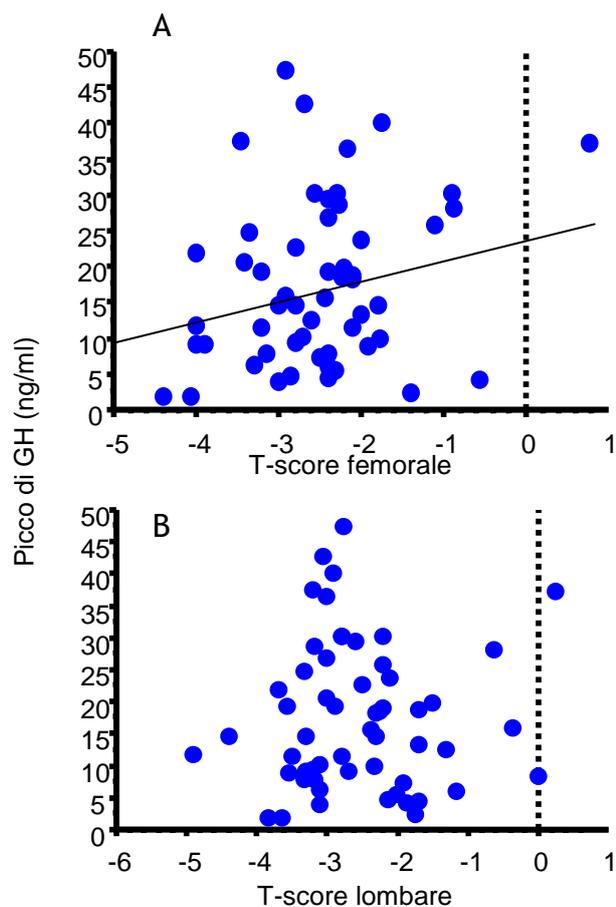


Figura 6



E' stata osservata una correlazione positiva tra picchi di GH valori di T-score femorale ma non lombare (Fig. 7A e B).

Figura 7



Lo stesso quadro di correlazioni è stato confermato nell'ampio sottogruppo di pazienti osteoporotici.

CONCLUSIONI

Il presente studio ha confermato l'elevata prevalenza sia di osteoporosi e che di deficit di GH/IGF-I in un ampio gruppo di pazienti talassemici.

Nel corso dell'ultimo decennio è stata ampiamente descritta l'elevata prevalenza di osteopenia e osteoporosi, fino al 50%, in pazienti talassemici adeguatamente⁹¹ trattati. Di fatto la presenza di una ridotta densità minerale sembra essere solo un aspetto della patologia ossea nella talassemia; pregressi studi hanno documentato una discordanza tra gli indicatori di mineralizzazione rilevati con la metodica DEXA e con la QCT (quantitative computed tomography) così come della loro correlazione con i parametri del metabolismo fosfocalcico^{92, 93}. La QCT è l'unica tecnica che fornisce una misura di densità minerale ossea volumetrica (v-BMD) selettiva dell'osso trabecolare, pertanto la discrepanza tra i risultati ottenuti con le due metodiche potrebbe essere spiegata con un diverso coinvolgimento della porzione corticale rispetto alla trabecolare. Il danno dell'osso talassemico sembrerebbe in realtà prevalentemente a carico della porzione corticale, a conferma di uno studio bioptico sull'osso iliaco condotto su un vasto gruppo di pazienti, che mostrava infatti alterazioni preferenzialmente a carico dell'osso corticale⁹⁴. Un recente studio sembra tuttavia screditare l'affidabilità della QCT per la determinazione del grado di mineralizzazione scheletrica, documentando valori di BMD vertebrale incrementati in pazienti affetti da talassemia non adeguatamente chelati rispetto a soggetti sani⁹⁵. Tale osservazione potrebbe derivare dall'influenza del deposito marziale sul segnale radiografico rilevato e farebbe riconsiderare la DEXA quale metodica adeguata alla valutazione della mineralizzazione scheletrica anche nella popolazione talassemica.

Dalla disamina dei diversi aspetti clinici che potenzialmente contribuiscono all'evoluzione della malattia ossea nella talassemia, appaiono evidenti la multifattorialità e la complessità dei meccanismi eziopatogenetici coinvolti tra i quali le possibili anomalie dell'asse somatotropo. Gli effetti di GH e IGF sul sistema scheletrico sono modulati da complesse interazioni tra somatomedine circolanti, loro proteine di legame e fattori di crescita localmente espressi. Peraltro, sulla base delle attuali conoscenze sembrerebbe che i livelli di IGF I così

come una normale funzione gonadica e la presenza di ipoparatiroidismo abbiano un ruolo protettivo nei confronti dello sviluppo di osteoporosi^{91,98} in diversi modelli di popolazioni studiate.

Da alcuni autori, in uomini affetti da osteoporosi è stata riscontrata una correlazione positiva tra i livelli di IGF-I e la BMD lombare^{99,100} non confermata da altri studi¹⁰¹. D'altro canto, in un campione di donne in età avanzata con una frattura vertebrale, i livelli di IGF I sono stati descritti significativamente inferiori rispetto a quelli in donne senza fratture¹⁰². Inoltre, è stata dimostrata una correlazione positiva tra IGF I circolante e i valori di BMD sia femorale che vertebrale in donne in età post-menopausale¹⁰³; in tali pazienti le donne con IGF I nel range basso di normalità presentavano una peggiore prognosi della demineralizzazione scheletrica¹⁰⁴. Infine, la somministrazione combinata di alendronato e MK-677, una molecola sintetica in grado di potenziare il rilascio endogeno di somatotropina, si è dimostrata superiore al solo alendronato nel migliorare la BMD femorale in un ampio gruppo di donne in post-menopausa affette da osteoporosi¹⁰⁵, sebbene l'utilizzo di rhGH come agente anabolico in pazienti osteoporotici abbia dato effetti^{106,107}.

In un precedente studio condotto dal nostro gruppo è stata documentata la presenza di ridotti livelli di IGF I nell'80% di una popolazione talassemica in età adulta⁹⁶ e successivamente abbiamo descritto la presenza di correlazione positiva tra riserva somatotropa e mineralizzazione ossea a livello femorale⁸¹.

Pregressi studi hanno documentato la presenza di una correlazione positiva tra i livelli di IGF I e BMD in un gruppo di pazienti talassemici adulti^{108,109}.

Il riscontro di una correlazione positiva fra picchi di GH e valori di IGF-I suggerisce come lo stato secretorio somatotropinico mantenga, in questa condizione clinica, un ruolo determinante nel controllo della produzione epatica di IGF-I. Al contrario, la mancanza di correlazione fra secrezione stimolata di GH e IGF-II circolante conferma, in tale patologia, il concetto ampiamente riconosciuto della sostanziale indipendenza della sintesi epatica di IGF-II dal GH.

Per quanto riguarda eventuali contributi delle somatomedine circolanti, IGF-I ma non IGF-II, sembra influenzare il turnover osseo nella talassemia.

A nostra conoscenza questo è il primo studio che prende in considerazione i livelli di entrambi i fattori di crescita insulino-simili in relazione alla patologia ossea nella talassemia, tuttavia in donne in età post-menopausale Seck et al. hanno documentato un significativo declino del contenuto di IGF I ma non di IGF-II a livello dell'osso trabecolare, in assenza di correlazione con la densità minerale ossea ⁹⁷.

Infine, si conferma l'influenza dello stato secretorio somatotropinico sulla mineralizzazione femorale nel paziente talassemico, con un effetto verosimilmente mediato dall'IGF-I locale piuttosto che dalle IGF circolanti.

In conclusione, il presente studio pone le basi per ulteriori indagini che prendano in considerazione altri fattori potenzialmente coinvolti nei meccanismi eziopatogenetici dell'osteoporosi in pazienti talassemici, quali le proteine di legame delle somatomedine (IFGBP), eventuali anomalie di bioattività dei fattori di crescita o della loro produzione locale.

Una più approfondita conoscenza del coinvolgimento dell'asse somatotropo permetterebbe una rivalutazione critica della patologia osteometabolica eventualmente modificando l'attuale approccio terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Castaldi G., Liso V.. *Malattie del sangue e degli organi ematopoietici*. Mc Graw-Hill, 3^a Ed.: pag.78-91
- ² Schwarz Tiene, *Manuale di Pediatria*. Casa Editrice Ambrosiana, 3^a Ed. pag. 828-837
- ³ Rugarli C.. *Medicina interna sistematica*. Masson, 4^a Ed. (2000): 791-799, Vol.2
- ⁴ Orzincolo C., Castaldi G., et al. *Effetti dell'evoluzione della terapia sulle lesioni scheletriche nella β -talassemia*. *La Radiologia Medica* 1994; 87:381-384. Edizioni Minerva Medica-Torino
- ⁵ Cacciari E., Cao A., Cavazzuti G.B., Guaraldi G.P., Guglielmi M., Panizon F., Segni G., Zacchello F., Zanesco L.. *Principi e Pratica di pediatria*. Munduzzi Editore, 3^a Ed. (1999): pag.114-119
- ⁶ Silvestroni E., Bianco I.. *Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years*. *American Journal of Human Genetics* 1975; 27(2): 198-212
- ⁷ Modiano G., Rossimori A. *Distribuzione teorica e frequenza del morbo di Cooley in Italia*. *VI Congressi Internazionale su "Prevenzione delle microcitemie"*-Roma 1980 Minerva Medica pag 61
- ⁸ Nancy F. Olivieri, M.D. *The β -thalassemias*. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341(2): 99-109
- ⁹ Stanley L. Schrier, Emanuele Angelucci. *New strategies in the treatment of the thalassemias*. *Annual Review of Medicine* 2005; 56:157-71
- ¹⁰ Brittenham G.M., Griffith P.M., Nienhuis A.W., McLaren C.E., Young N.S., Tucker E.E., Allen C.J., Farrell D.E., Harris J.W.. *Efficacy of Deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia Major*. *The New England Journal of Medicine* 1994; 331(9):567-573
- ¹¹ Fischer R., Longo F., Nielsen P., Engelhardt R., Hider RC., Piga A. *Monitoring long-term efficacy of iron chelation therapy by deferiprone and desferrioxamine in patients with beta-thalassaemia major: application of SQUID biomagnetic liver susceptometry*. *British Journal of Haematology* 2003; 121(6):938-48
- ¹² Aessopos A., Farmakis D., Tsironi M., Deftereos S., Tassiopoulos S., Konstantopoulos K., Rombos J., papalambros E.. *Hemodynamic assessment of splenomegaly in β -thalassemia patients undergoing splenectomy*. *Annals of Hematology* 2004; 83(1): 775-778

-
- ¹³ Graziev, Javid M.D., Lucarelli, Guido MD. *Stem cell transplantation for hemoglobinopathies*. *Current Opinion in Pediatrics* 2003; 15(1): 24-31
- ¹⁴ May C., Rivella S., Chadburn A., Sedalain M. *Successful treatment of murine β -thalassemia intermedia by transfer of the human β -globin gene*. *Blood* 2002; 99(6): 1902-1908
- ¹⁵ Deborah Rund, Eliezer Rachmilewitz. *New trends in the treatment of β -thalassemia*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2000; 33:55-118
- ¹⁶ Livrea MA, Tesoriere L., Piantaudi A.M., Calabrese A., Maggio A., Freisleben H.J., D'Arpa D., D'Anna R., Bongiorno A.. *Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassaemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants*. *Blood* 1996; 88(9): 3608-14
- ¹⁷ Adams P.C., Deugnier Y., Moirand R., Brissot P.. *The relationship between iron overload, clinical symptoms, and age in 410 patients with genetic hemochromatosis*. *Hepatology* 1997; 25:162-66
- ¹⁸ Kremastinos D.T, Tiniakos G, Theodorakis G., Demosthenes G.K., Toutouzas P.K.. *Myocarditis in β -thalassemia major. A cause of heart failure*. *Circulation* 1995; 91:66-71
- ¹⁹ Erfurth E.M., Holmer H., Nilsson P.G., Kornhall B.. *Is growth hormone deficiency contributing to heart failure in patients with beta-thalassaemia major?* *European Journal of Endocrinology*. 2004; 151(2): 161-166
- ²⁰ Ehlers K, Levin A, Markenson A et al. *Longitudinal study of cardiac function in thalassaemia major*. *Annals of the New York Academy of Science*. 1980; 344:397-404
- ²¹ Abdulmohsen H. Al-Elq, Hussain H. Al-Saeed. *Endocrinopathies in patients with thalassaemias*. *Saudi Medicinal Journal* 2004; 25(10): 1347-1351
- ²² Grundy R.G., Woods K.A., Savage M.O., Evans J.P.M.. *Relationship of endocrinopathy to iron chelation status in young patients with thalassaemia major*. *Archives of Disease in Childhood* 1994; 71: 128-132.
- ²³ Argyropoulou M.I., Kiortsis D.N., Metafratzi Z., Bitsis S., Tsatouilis A., Efremidis S.C.. *Pituitary gland height evaluated by MR in patients with β -thalassaemia major: a marker of pituitary gland function*. *Neuroradiology* 2001; 43: 1056-1058.
- ²⁴ De Sanctis V., Pintor C., et al. *Multicentre study on prevalence of endocrine complications in thalassaemia major*. *Clinical Endocrinology* 1995; 42: 581-586.

-
- ²⁵ Nancy C. Andrews, M.D., Ph. D. *Disorders of iron metabolism*. The New England Journal of Medicine 1999; 341: 1986-1995
- ²⁶ Mariotti S., Loviselli A., Murenu S., Sau F., Valentino L., Mandas A., Vacquer S., Martino E., Balestrieri A., Lai M.E.. High prevalence of thyroid dysfunction in adult patients with β -thalassemia major submitted to amiodarone treatment. Journal of Endocrinological Investigation 1999; 22: 55-63
- ²⁷ Zervas A., Katopodi A. Protonotariou A., et al.. *Assessment of thyroid function in two hundred patients with β -Thalassemia Major*. Thyroid 2002; 12(2): 151-154
- ²⁸ Tiosano D., Hochberg Z.. *Endocrine complications of thalassemia*. Journal of Endocrinological Investigation 2001; 24: 716-723.
- ²⁹ Wu K.H., Tsai F.J., Peng C.T. *Growth hormone (GH) deficiency in patients with β -thalassemia major and the efficacy of recombinant GH treatment*. Annals of Hematology 2003; 82: 637-640
- ³⁰ De Sanctis V. *Growth and puberty and its management in thalassemia*. Hormone Research 2002; 58(1): 72-79
- ³¹ Raiola G., Galati M.C., De Sanctis V., Caruso-Nicoletti M., Pintor C., De Simone M., Arcuri V.M., Anastasi S.. *Growth and Puberty in Thalassemia Major*. Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism 2003 ; 16: 259-266
- ³² Caruso-Nicoletti M., De Sanctis V., Cavallo L., Raiola G., Ruggiero L., Skordis N., Wpnke B.. *Management of puberty for optimal auxological results in β -Thalassaemia major*. Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism 2001; 14: 939-944
- ³³ Monge L., Pinach S., Caramellino L., Bertero M.T., Dall'Omo A., Carta Q.. *The possibile role of autoimmunity in the pathogenesis of diabetes in β -thalassemia major*. Diabetes & Metabolism 2001; 27: 149-154
- ³⁴ Massolo F., Forese S., Gallinelli A., Bergomi A., Cellini M., Iori M., Leoni S., Amarri S.. *Secrezione β -cellulare nei pazienti con thalassemia major*. Minerva Pediatrica 1995;47: 57-64
- ³⁵ Abdulmohsen H. Al-Elq, Hussain H. Al-Saeed. Endocrinopathies in patients with thalassemias. Saudi Medicinal Journal 2004; 25(10): 1347-1351
- ³⁶ Pasqualetti P., Colantonio D., Collacciani A., Casale R., Natali G.. *Circadian pattern of circulating plasma ACTH, cortisol, and aldosterone in patients with β -thalassemia*. Acta Endocrinologica 1990; 123: 174-178

-
- ³⁷ Chern J.P., Lin K.H.. *Hypoparathyroidism in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia*. Journal of Pediatric Hematology/ Oncology 2002; 24(4): 291-293
- ³⁸ Compston J.E., Cooper C., Kanis J.A. *Bone densitometry in clinical practice*. The British Medical Journal 1995; 310:1507-1510 Review
- ³⁹ Bonjour J.P., Theintz G., Buchs B., Slosman D., Rizzoli R.. *Critical years and stage of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence*. Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism 1991; 72(3): 555-563
- ⁴⁰ Compston J.E., Cooper C., Kanis J.A. *Bone densitometry in clinical practice*. The British Medical Journal 1995; 310:1507-1510 Review
- ⁴¹ Lee L.L., Lee Y.S.C., Waldman S.D., Casper R.F., Grynepas M.D.. *Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause bone loss in an ovariectomized rat model*. Bone 2002; 30(6): 917-23
- ⁴² Liu X.D., Zhu Y.K., Umino T., Spurzem J.R., Romberger D.J., Wang H., Reed E., Rennard S.I.. *Cigarette smoke inhibits osteogenic differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in mono-layer and three- dimensional collagen gel culture*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 2001; 137(3): 208-19
- ⁴³ De Sanctis V., Stea S., Savarino L., Granchi D., Visentin M., Sprocati M., Govoni R., Pizzoferrato A.. *Osteochondrodystrophic lesions in chelated thalassemic patients: an histological analysis*. Calcified Tissue International 2000 (67): 134-140
- ⁴⁴ Kaufmann T., Coleman M., Giardina P., Nisce L.Z.. *The role of radiation therapy in the management of hematopoietic neurologic complications in thalassemia*. Acta Haematologica 1991; 85(3): 156-159
- ⁴⁵ Lawson J.P., Albow R.C., Person A., *The ribs in thalassemia*. Pediatric Radiology 1981;140:663-672.
- ⁴⁶ Soliman A.T., El Banna N., Ansari B.M.. *GH response to provocation and circulating IGF-1 and IGF-binding protein-3 concentrations, the IGF-1 generation test and clinical response to GH therapy in children with beta-thalassemia*. European Journal of Endocrinology 1998; 138(4): 394-400
- ⁴⁷ Voskaridou E., Kyrtsolis M.C., Terpos E., Skordili M., Theodoropoulos I., Bergele A., Diamanti E., Kalovidouris A., Loutradi A., Loukopoulos D.. *Bone resorption is increased in young adults with thalassemia major*. British Journal of Haematology 2001, 112(1): 36-41

-
- ⁴⁸ Giardina S.F.A., Reid D.M., Scheneider R., Lessere M., Simmons B., Rodriguez A., Gerner J. Et al.. *Abnormal bone metabolism in thalassemia*. *Endocrin disorders in thalassemia* 1995; 39-46
- ⁴⁹ Jensen C.E., Tuck S.M., Agnew J.E., Koneru S., Morris R.W., Yardumian A., Prescott E., Hoffbrand A.V., Wonke B.. *High prevalence of low bone mass in thalassemia major*. *British Journal of Haematology* 1998; 103(4): 911-915
- ⁵⁰ Chan Y.L., Li C.K., Pang L.M., Chic K.W.. *Desferoxamine-induced long bone changes in thalassemic patients: radiographic features, prevalence and relations with growth*. *Clinical Radiology* 2000, 55(8): 610-14
- ⁵¹ Notelovitz M.. *Androgen effects on bone and muscle*. *Fertility and Sterility* 2002 Apr; 77(4): 34-41
- ⁵² Manolagas S.C., Kousteni S., Jilka R.L.. *Sex Steroids and bone*. *Recent Progress in Hormone Research* 2002; 57: 385-409
- ⁵³ Anapliotou M.L.G., Kastanias I.T., Psara P., Evangelos A., Liparaki M., Dimitriou P.. *The contribution of hypogonadism to the development of osteoporosis in thalassemia major: new therapeutic approaches*. *Clinical Endocrinology* 1995;42: 279-287
- ⁵⁴ Jensen C.E., Tuck S.M., Agnew J.E., Koneru S., Morris R.W., Yardumian A., Prescott E., Hoffbrand A.V., Wonke B. *High prevalence of low bone mass in thalassemia major*. *British Journal of Haematology* 1998; 103(4): 911-915
- ⁵⁵ Chatterjee R., Katz M.. *Reversible hypogonadotrophic hypogonadism in sexually infantile male thalassaemic patients with transfusional iron overload*. *Clinical Endocrinology* 2000, 53(1): 33-42
- ⁵⁶ Kemink S.A., Hermus A.R., Swinkels L.M., Lutterman J.A., Smals A.G.. *Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology*. *Journal of Endocrinology Investigation*. 2000; 23(5): 295-303
- ⁵⁷ Lopez-Ibarra P.J., Pastor M.M., Escobar-Jimenez F., Pardo M.D., Gonzales A.G., Luna J.D., Requena M.E., Diosdado M.A.. *Bone mineral density at time of clinical diagnosis of adult-onset type 1 diabetes mellitus*. *Endocrine Practice* 2001; 7(5): 346-51
- ⁵⁸ Jensen C.E., Tuck S.M., Agnew J.E., Koneru S., Morris R.W., Yardumian A., Prescott E., Hoffbrand A.V., Wonke B.. *High prevalence of low bone mass in thalassemia major*. *British Journal of Haematology* 1998; 103(4): 911-915

-
- ⁵⁹ De Sanctis V., Pinamonti A., Di Palma A., Sprocati M., Atti G., Galberini M.R., Vullo C. *Growth and development in thalassemia major patients with severe bone lesions due to desferoxamine*. European Journal of Pediatrics 1996; 155:368-372
- ⁶⁰ Garofalo F., Piga A., Lala R., Chiabotto S., Di Stefano M., Isaia G.C.. *Bone metabolism in thalassemia*. Annals of the New York Academy of Science 1998; 850:475-477
- ⁶¹ Han K.O., Moon I.G., Kang Y.S., Chung H.Y., Min H.K., Han I.K. *Nonassociation of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and estrogen responsiveness to hormone replacement therapy in Korean post-menopausal women*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1997; 82(4): 991-995
- ⁶² Grant S.F.A., Reid D.M., Blake G., Herd R., Fogelman I., Ralston S.H.. *Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type 1^α 1 gene*. Nature Genetics 1996; 14: 203-205
- ⁶³ Uitterlinden A.G., Burger H., Huang Q., Yue F., Fiona E.A., McGuig B., Grant S.F.A., Hofman A., Van Leeuwen J.P.T.M., Pols H.A.P., Ralston S.H.. *Relation of alleles of the collagen type 1^α 1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women*. The New England Journal of Medicine 1998; 338(15): 1016-1021
- ⁶⁴ Wonke B., Jensen C., Hanslip J.J., Prescott E., Lalloz M., Layton M., Erten S., Tuck S., Agnew J.E., Raja K., Davies K.. *Genetic and acquired predisposing factors and treatment of osteoporosis in thalassaemia major*. Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism, 1998; 11(3): 795-801.
- ⁶⁵ Dresner-Pollak R., Rachmilewitz E., Blumenfeld A., Idelson M., Goldfarb A.W.. *Bone mineral metabolism in adults with beta-thalassaemia major and intermedia*. British Journal of Haematology 2000, 111(3):902-7
- ⁶⁶ Tricoli, J. V., Rall, L. B., Scott, J., Bell, G. I., and Shows, T. B. (1984). *Nature* 310, 784-786.
- ⁶⁷ Daughaday, W. H. and Rotwein, P. (1989). *Endocr. Rev.* 10, 68-91.
- ⁶⁸ Collett-Solberg, P. and Cohen, P. (1996). *Endocrinol. Metabol. Clin. NA.* 25, 591-614.
- ⁶⁹ Katz, L. E. L., Rosenfeld, R. G., and Cohen, P. (1995). *Endocrinologist* 5, 36-43.
- ⁷⁰ Conover, C. A., Clarkson, J. T., and Bale, L. K. (1995). *Endocrinology* 136, 1403-1410.
- ⁷¹ Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. *Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth*. Cell. 1993 75:73-82.

-
- ⁷² Ohlsson C., Bengtsson B., Isaksson O.G.P., Andreassen T.T., Słotweg M.C.. *Growth hormone and bone*. Endocrine Reviews. 1998, 19(1): 55-79
- ⁷³ Jonsson et al, Biosci Rep 13:297, 1993
- ⁷⁴ Słotweg et al, J Endocrinol 125:271, 1992
- ⁷⁵ Rosen T., Wilhelmsen L., Landin-Wilhelmsen K., Lappas G., Bengtsson B.. *Increased fracture frequency in adult patients with hypopituitarism and GH deficiency*. European Journal of Endocrinology 1997; 137: 240-245
- ⁷⁶ Cavallo L., Guarrado R., Zecchino C., Manolo F., De Sanctis V., Cisternino M., Caruso-Nicoletti M., Galati M.. *Short-term therapy with recombinant growth hormone in polytransfused thalassaemia major patients with growth deficiency*. Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism 1998, 11: 845-849
- ⁷⁷ Sartorio A., Ortolani S., Conti A., Cherubini R., Galbiati E., Faglia G.. *Effects of recombinant growth hormone (GH) treatment on bone mineral density and body composition in adults with childhood onset growth hormone deficiency*. Journal of Endocrinological Investigation 1996, 19: 524-529
- ⁷⁸ Sartorio A., Conte G., Conti A., Masala A., Alagna S., Rovasio. *Effects of 12 months rec-GH therapy on bone and collagen turnover and bone mineral density in GH deficient children with thalassaemia major*. Journal of Endocrinological Investigation 2000; 23(6): 356-61
- ⁷⁹ Danesi L., Scacchi M., Pincelli A.I., Poletti R., Lavezzi E., Cavagnini F. *Trattamento con ormone della crescita biosintetico in un paziente adulto talassemico con deficit somatotropinico*. Cattedra di Endocrinologia, Università di Milano: Ospedale S. Luca IRCCS, Istituto Auxologico Italiano, Milano 2001
- ⁸⁰ Lasco et al., J Endocrinol Invest 25:338, 2002
- ⁸¹ Scacchi M, Danesi L, Cattaneo A, Valassi E, Pecori Giraldi F, Argento C, D'Angelo E, Mirra N, Carnelli V, Zanaboni L, Tampieri B, Cappellini MD, Cavagnini F. *Bone demineralization in adult thalassaemic patients: contribution of GH and IGF-I at different skeletal sites*. Clin Endocrinol (Oxf). 2008 Aug;69(2):202-7. Epub 2008 Jan 21.
- ⁸² Daughaday, W. H. and Rotwein, P. (1989). *Endocr. Rev.* 10, 68-91.
- ⁸³ Efstratiadis G. *Parental imprinting of autosomal mammalian genes*. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4:265-280.
- ⁸⁴ Cohen, P. and Rosenfeld, R. G. (1994). *Curr. Opin. Ped.* 6, 462-467.

-
- ⁸⁵ Mohan S, Jennings JC, Linkhart TA, et al. *Primary structure of human skeletal growth factor: homology with human insulin-like growth factor II*. *Biochim Biophys Acta*. 1988 961:44-55.
- ⁸⁶ A. Salim, R.P. Nacamuli, E.F. Morgan, A.J. Giaccia, M.T. Longaker, *Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 40007-40016.
- ⁸⁷ T.R. Arnett, D.C. Gibbons, J.C. Utting, I.R. Orriss, A. Hoebertz, M. Rosendaal, S. Meghji, *Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption*, *J. Cell Physiol.* 196 (2003) 2-8.
- ⁸⁸ H. Fukuoka et al. *Hypoxic stress enhances osteoclast differentiation via increasing IGF2 production by non-osteoclastic cells* *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328 (2005) 885-894
- ⁸⁹ DeChiara, T. M., Efstratiadis, A., and Robertson, E. J. (1990). *Nature* 345, 78-80.
- ⁹⁰ Wallander, M., Brismar, K., Ohrvik, J., Ryden, L. & Norhammar, A. (2006) *Insulin-like growth factor I: a predictor of long-term glucose abnormalities in patients with acute myocardial infarction*. *Diabetologia*, 49, 2247-2255.
- ⁹¹ E. Voskaridou and E. Terpos, *New insights into the pathophysiology and management of osteoporosis in patients with B thalassaemia*, *British Journal of Haematology*, vol. 127, no. 2, pp. 127-139, 2004.
- ⁹² Angelopoulos NG, Katounda E, Rombopoulos G, Goula A, Kaltzidou V, Kaltsas D, Ioannis P, Tolis G. *Evaluation of bone mineral density of the lumbar spine in patients with beta-thalassaemia major with dual-energy x-ray absorptiometry and quantitative computed tomography: a comparison study*. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2006 Feb;28(2):73-8.
- ⁹³ Mylona M, Leotsinides M, Alexandrides T, Zoumbos N, Dimopoulos PA. *Comparison of DXA, QCT and trabecular structure in beta-thalassaemia*. *Eur J Haematol.* 2005 May;74(5):430-7.
- ⁹⁴ Rioja L., Girot R., Garabedian M., Cournot-Witmer G.. *Bone disease in children with homozygous beta-thalassaemia*. *Bone and Mineral* 1990; 8(1): 69-86
- ⁹⁵ Bansal D, Venkateshwaran S, Khandelwal N, Marwaha RK. *Quantitative computed tomography is unreliable for measurement of bone mineral density in inadequately chelated adolescent patients with B-thalassaemia major: a case-control study*. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Mar;56(3):409-12.

-
- ⁹⁶ Scacchi M, Danesi L, Cattaneo A, Valassi E, Pecori Giralardi F, Argento C, D'Angelo E, Mirra N, Carnelli V, Zanaboni L, Cappellini MD, Cavagnini F. *Growth hormone deficiency (GHD) in adult thalassaemic patients*. Clin Endocrinol (Oxf). 2007 Nov;67(5):790-5.
- ⁹⁷ Seck T, Scheppach B, Scharla S, Diel I, Blum WF, Bismar H, Schmid G, Krempien B, Ziegler R, Pfeilschifter J. *Concentration of insulin-like growth factor (IGF)-I and -II in iliac crest bone matrix from pre- and postmenopausal women: relationship to age, menopause, bone turnover, bone volume, and circulating IGFs*. J Clin Endocrinol Metab 1998 83:2331-2337
- ⁹⁸ Baldini M, Forti S, Orsatti A, Olivieri FM, Airaghi L, Zanaboni L, Cappellini MD. *Bone disease in adult patients with B-thalassaemia major: a case-control study*. Intern Emerg Med. 2011 Dec 17. [Epub ahead of print]
- ⁹⁹ Ljunghall et al, J Intern Med 232:59, 1992
- ¹⁰⁰ Kurland ES, Rosen CJ, Cosman F, McMahon D, Chan F, Shane E, Lindsay R, Dempster D, Bilezikian JP. *Insulin-like growth factor-I in men with idiopathic osteoporosis*. J Clin Endocrinol Metab. 1997 Sep;82(9):2799-805.
- ¹⁰¹ Gillberg P, Olofsson H, Mallmin H, Blum WF, Ljunghall S, Nilsson AG. *Bone mineral density in femoral neck is positively correlated to circulating insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein (IGFBP)-3 in Swedish men*. Calcif Tissue Int. 2002 Jan;70(1):22-9. Epub 2001 Dec 21.
- ¹⁰² Sugimoto T, Nishiyama K, Kuribayashi F, Chihara K. *Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) I, IGF-binding protein (IGFBP)-2, and IGFBP-3 in osteoporotic patients with and without spinal fractures*. J Bone Miner Res. 1997 Aug;12(8):1272-9.
- ¹⁰³ Muñoz-Torres M, Mezquita-Raya P, Lopez-Rodriguez F, Torres-Vela E, de Dios Luna J, Escobar-Jimenez F. *The contribution of IGF-I to skeletal integrity in postmenopausal women*. Clin Endocrinol (Oxf). 2001 Dec;55(6):759-66.
- ¹⁰⁴ Seck T, Scheidt-Nave C, Leidig-Bruckner G, Ziegler R, Pfeilschifter J. *Low serum concentrations of insulin-like growth factor I are associated with femoral bone loss in a population-based sample of postmenopausal women*. Clin Endocrinol (Oxf). 2001 Jul;55(1):101-6.
- ¹⁰⁵ Murphy et al, JCEM 86:1116-1125, 2001
- ¹⁰⁶ Rosen and Bilezikian, JCEM 86:957, 2001
- ¹⁰⁷ Landin-Wilhelmsen et al, JBMR 18:393-405, 2003

¹⁰⁸ Dresner Pollak et al Br J Haematol 111:902-907, 2000

¹⁰⁹ Lasco et al J Endocrinol Invest 25:338-344, 2002