

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in  
Malattie Osteometaboliche e Disordini del Metabolismo  
Idroelettrolitico e Acido-Base

Ciclo XXIV

Effetti della Vitamina D sul sistema immunitario:  
reazione di fase acuta dopo somministrazione di  
Acido Zoledronico

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Paolo Sansoni

Tutor:  
Chiar.mo Prof. Paolo Sansoni

Dottoranda: Dott.ssa Francesca Magalini

## Indice

<b>Riassunto.....</b>	<b>4</b>
-----------------------	----------

<b>Introduzione.....</b>	<b>6</b>
--------------------------	----------

Vitamina D.....	6
<i>Produzione e metabolismo.....</i>	6
<i>Regolazione della vitamina D.....</i>	9
<i>Vitamina D e laboratorio.....</i>	10
<i>Il recettore della vitamina D (VDR).....</i>	11
<i>Effetti classici della vitamina D.....</i>	12
<i>Effetti non classici della vitamina D.....</i>	13
<i>Vitamina D e sistema immunitario.....</i>	14
<i>Vitamina D e cellule dendritiche.....</i>	15
<i>Vitamina D e immunità innata.....</i>	16
<i>Vitamina D e immunità acquisita.....</i>	19
<i>Vitamina D e Linfociti T <math>\gamma\delta</math>.....</i>	20
<i>Riscontri clinici.....</i>	22
<i>Assunzione giornaliera di vitamina D.....</i>	23
<i>Cause di ipovitaminosi.....</i>	23
<i>Effetti collaterali della vitamina D.....</i>	25
<i>Bisfosfonati.....</i>	26
<i>Chimica.....</i>	26
<i>Meccanismo d'azione.....</i>	28
<i>Uso clinico.....</i>	29
<i>Effetti immunomodulatori degli Amino-bisfosfonati.....</i>	29
<i>Effetti collaterali dei bisfosfonati e in particolare dell'acido zoledronico.....</i>	31
<i>Acido zoledronico.....</i>	33

<b>II. Scopo dello studio.....</b>	<b>34</b>
------------------------------------	-----------

<b>III. Materiali e Metodi.....</b>	<b>35</b>
-------------------------------------	-----------

1. Soggetti.....	35
2. Disegno dello studio e indagini biochimiche.....	36
3. Analisi citofluorimetriche .....	38
<i>Anticorpi monoclonali .....</i>	38
<i>Marcatura in immunofluorescenza e analisi multiparametrica al citofluorimetro.....</i>	38
<i>Acquisizione citofluorimetrica.....</i>	39
<i>Analisi statistica.....</i>	40

<b>IV. Risultati</b> .....	<b>41</b>
Osservazioni cliniche e biumorali .....	41
Analisi citofluorimetrica .....	44
<b>V. Discussione</b> .....	<b>50</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>53</b>

## Riassunto

Numerosi dati della letteratura recente confermano l'azione regolatoria della vitamina D sul sistema immunitario.

Il nostro studio ha riguardato la correlazione tra livelli sierici di vitamina D e l'insorgenza di una reazione di fase acuta (APR) in pazienti sottoposti a una prima infusione di acido zoledronico, un amino-bifosfonato ampiamente usato non solo nel trattamento delle osteolisi tumorali con ipercalcemia, ma anche nell'osteodistrofia pagetica e nell'osteoporosi.

A tal fine sono stati studiati 10 pazienti valutati sia prima che dopo 72 ore dall'infusione con acido zoledronico. I soggetti in esame sono stati seguiti dal punto di vista clinico nei tre giorni successivi alla somministrazione del farmaco e dal punto di vista laboratoristico e immunitario sia prima dell'infusione di acido zoledronico (T0) sia dopo 72 ore (T1).

Lo stato vitaminico dei pazienti è stato classificato, in base ai livelli ematici di 25-idrossivitamina D, in stato carenziale, stato di insufficienza e stato di sufficienza.

Clinicamente i 10 soggetti sono stati valutati attraverso la misurazione della temperatura corporea e l'eventuale comparsa di una sintomatologia attribuibile ad reazione di fase acuta (APR) quale affaticamento, dolori osteo-muscolari e disturbi gastro-intestinali.

Attraverso la determinazione degli esami di laboratorio (VES, PCR e fibrinogeno) è stato valutato l'andamento degli indici di flogosi.

L'analisi dell'immunofenotipo ha riguardato le principali popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie periferiche, compresi i linfociti T  $\gamma\delta$ , i linfociti T regolatori CD25++ e le cellule Natural Killer (NK).

In base alla clinica e ai risultati degli esami di laboratorio 6 pazienti sono stati classificati come APR+ e 4 pazienti come APR-. Correlando la prevalenza di APR con i livelli sierici di 25 OH vitamina D, abbiamo osservato un'evidente associazione tra i livelli di vitamina D e la comparsa di reazione di fase acuta con una maggiore occorrenza di APR nei soggetti con stato vitaminico carente e/o insufficiente rispetto ai soggetti che presentano valori sufficienti della vitamina D.

Relativamente all'immunofenotipo, prima dell'infusione con acido zoledronico non erano presenti significative differenze nella distribuzione delle popolazioni linfocitarie nei pazienti APR+ e APR-. Confrontando tuttavia, i valori al tempo T0 con quelli registrati al T1, abbiamo osservato che l'infusione ha indotto variazioni di specifiche popolazioni linfocitarie nei due gruppi di pazienti.

In particolare, nel gruppo dei pazienti APR+ è stata osservata una diminuzione statisticamente significativa del numero assoluto dei linfociti T  $\gamma\delta$  circolanti e dei linfociti T CD8+. Tali variazioni non sono state osservate nel gruppo dei pazienti APR- dove è stato invece evidenziato un trend in aumento per il numero assoluto dei linfociti NK dopo infusione di bisfosfonato.

Nonostante lo studio sia preliminare e limitato a un numero ristretto di pazienti, si può affermare che la prevalenza di APR e le variazioni delle popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie riscontrate a seguito di una prima infusione di acido zoledronico, sembrano essere correlate ai livelli di 25-idrossivitamina D.

Questi risultati suggeriscono un possibile controllo dell'insorgenza di APR, attraverso la supplementazione con colecalciferolo, al fine di ottenere livelli ematici di 25-idrossivitamina D sufficienti (>75 nmol/L) prima di intraprendere la terapia con acido zoledronico.

Questo studio sembra inoltre ulteriormente confermare gli effetti pleiotropici che la vitamina D esplica sul sistema immunitario ed in particolare la relazione tra vitamina D, amino-bisfosfonati e sistema immunitario.

# I. Introduzione

## **Vitamina D**

### *Produzione e metabolismo*

Le azioni della vitamina D sono da attribuire al suo metabolita attivo, 1,25-diidrossicolecalciferolo [1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> o calcitriolo] che viene prodotto grazie ad una serie di passaggi enzimatici a partire dal colecalciferolo o vitamina D<sub>3</sub>. L'ergocalciferolo, o vitamina D<sub>2</sub>, segue le stesse tappe metaboliche, per cui sia la vitamina D<sub>3</sub> che la vitamina D<sub>2</sub> possono essere assunte con la dieta anche se la quota preponderante di vitamina D<sub>3</sub> deriva dalla conversione del 7-deidrocolesterolo (provitamina D) dopo l'esposizione della cute alle radiazioni ultraviolette (UVB, lunghezza d'onda 290-315 nm). La luce solare è caratterizzata dalla presenza di queste radiazioni solo per un numero limitato di ore variabili in relazione alla stagione ed alla latitudine. Poiché un eccesso di previtamina D<sub>3</sub> o vitamina D<sub>3</sub> viene distrutto dai raggi solari un'eccessiva esposizione agli UVB non causa intossicazione di vitamina D<sub>3</sub>. Altri fattori che condizionano la sintesi vitaminica sono l'età (la produzione si riduce con l'avanzare dell'età), la superficie e lo spessore della cute esposta al sole ed il tempo di irradiazione [1].

Gli alimenti più ricchi di vitamina D<sub>3</sub> sono i pesci marini (specie il salmone, le sardine, l'aringa e l'olio di fegato di merluzzo), il fegato, il tuorlo delle uova e i funghi; latte, burro, olio, succo d'arancia ed altri alimenti vengono talvolta addizionati con vitamina D.

Il dosaggio di vitamina D viene espresso in milligrammi di colecalciferolo (1 mg di colecalciferolo corrisponde a 40 unità internazionali, UI).

Da sottolineare che gli alimenti forniscono poche unità di vitamina D se paragonate alla quantità prodotta dalla pelle in risposta alla luce solare. Ad esempio 15 ml di olio di fegato di merluzzo contiene 1630 UI di vitamina D<sub>3</sub> mentre l'esposizione alla luce solare del corpo per 15 minuti, a mezzogiorno d'estate, determina la produzione di 10000 UI di vitamina D<sub>3</sub>.

La vitamina D è liposolubile e viene assorbita a livello duodenale e digiunale e successivamente distribuita attraverso la circolazione linfatica quasi totalmente al tessuto adiposo da cui viene poi rilasciata in piccole quantità. Quindi una maggiore massa adiposa “diluisce” la vitamina D e questo chiarisce il motivo per cui la carenza di vitamina D risulti più elevata nei soggetti obesi [1].

La vitamina D costituisce un pro-ormone e rappresenta un precursore per vari metaboliti fisiologicamente attivi (ne sono stati identificati 33) [2]; essa è inizialmente idrossilata a livello epatico da parte del citocromo P450 25 idrossilasi a 25-idrossivitamina D (25[OH]D). Risulta importante sottolineare che questo processo metabolico avviene anche nei pazienti affetti da insufficienza epatica anche se, recentemente, è stata documentata un’elevata prevalenza di ipovitaminosi D nei malati affetti da epatite cronica HCV correlata [3].

La 25 [OH] D è il principale metabolita circolante della vitamina D, si lega nel plasma ad una proteina specifica di trasporto (alfa-globulina), “proteina legante la vitamina D”, e le sue concentrazioni sieriche rappresentano l’indice biochimico più attendibile dello stato di replezione vitaminica [4], la sua emivita è di 12-18 giorni pertanto, i pazienti con ipovitaminosi, devono assumere periodicamente la terapia onde evitare rapida riduzione dei livelli sierici.

Successivamente la 25[OH]D viene metabolizzata, a livello dei tubuli renali, in 1,25-diidrossivitamina D (calcitriolo o 1,25[OH]<sub>2</sub>D) per opera della 1-alfa idrossilasi (CYP27B1) o in 24,25-diidrossivitamina D dall’enzima 24-idrossilasi (CYP24A1) [figura 1].

I soggetti affetti da insufficienza renale presentano dunque una progressiva compromissione della trasformazione anche se questo avviene solamente quando l’ insufficienza renale è di stadio avanzato (stadio III-IV) e solo in questi pazienti risulta infatti giustificata la somministrazione di vitamina D come metabolita idrossilato (Calcifediolo). Del resto il trattamento con metaboliti attivi finali della vitamina D potrebbe risultare potenzialmente rischioso poiché la 1-idrossilazione è il gradino limitante del processo di sintesi della vitamina D attiva costituendo dunque un meccanismo di protezione nei confronti di un eventuale intossicazione. Risulta necessario sottolineare che oltre ad essere trasformata nel fegato e nel rene, la vitamina D può essere metabolizzata da molte altre cellule, in particolare

da quelle del sistema immunitario e dei cheratinociti [1,5,6], ma anche da enterociti, cellule prostatiche, mammarie, endometriali, dell'epitelio cervicale e polmonare.

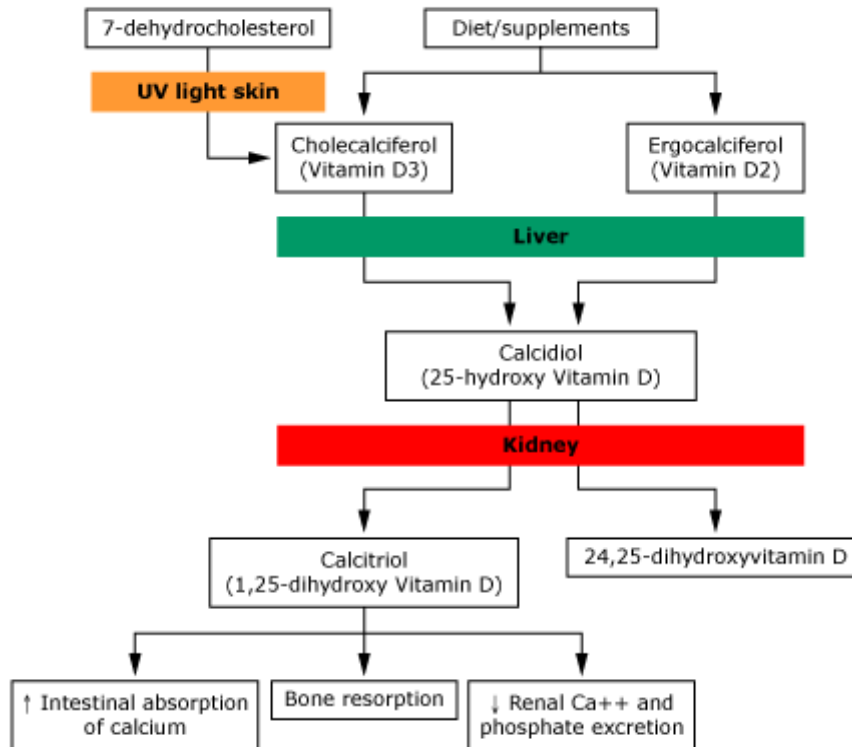


Figura 1: metabolismo vitamina D

Nell'ambito del sistema immunitario l'1,25-diidrossivitamina D è concentrata nel microambiente linfoide, aumentandone l'azione specifica e limitandone i potenziali effetti collaterali sistemici.

La cellule T attivate (probabilmente anche le cellule B) possiedono solamente il corredo enzimatico necessario per convertire la 25-idrossivitamina D in 1,25-diidrossivitamina D mentre i macrofagi ed alcune cellule dendritiche esprimono tutti gli enzimi necessari per convertire la vitamina D in 1,25-diidrossivitamina D [7]. I cheratinociti possiedono CYP24A1 e CYP27B1 e grazie agli UVB sono quindi le uniche cellule in grado di produrre vitamina D3 a partire da 7-deidrocolesterolo.



A livello delle cellule dendritiche i livelli di CYP27B1 aumentano proporzionalmente alla maturazione di queste cellule, mentre nei linfociti T e B l'espressione di tale enzima aumenta dopo l'attivazione.

La produzione di RNA messaggero per CYP27B1 risulta marcatamente aumentata nei macrofagi attivati e nelle cellule dendritiche spiegando la patogenesi dell'ipercalcemia e dell'iper calciuria in malattie associate all'attivazione del sistema immunitario come sarcoidosi, tubercolosi, artriti infiammatorie, morbo di Crohn e disordini linfoproliferativi delle cellule T [7].

L'espressione di CYP27B1 nei macrofagi e nelle cellule dendritiche non pare essere soppressa dalla 1,25-diidrossivitamina D dimostrando dunque lo stato di ipervitaminosi D riscontrato in tali patologie [8].

#### *Regolazione della vitamina D*

I meccanismi regolatori del metabolismo della vitamina D sono complessi (Figura 2): il calcio, il fosforo ed alcuni ormoni, tra i più importanti abbiamo paratormone (PTH) e calcitonina, vi sono interessati [2]. Il PTH è prodotto dalle cellule principali delle paratiroidi dove si trovano i chemocettori e la sua secrezione avviene in risposta a bassi livelli di calcemia e provoca ipercalcemia, ipofosforemia, iper calciuria e iperfosfaturia. Le sue azioni possono essere così sintetizzate:

- a livello osseo promuove la mobilizzazione del calcio dallo scheletro stimolando gli osteoclasti e gli osteociti;
- a livello renale diminuisce il riassorbimento del fosforo (tubulo contorto prossimale) ed aumenta il riassorbimento del calcio (tubulo contorto distale); stimola l'idrossilazione della 25(OH)D3 a 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 che risulta essere il metabolita più attivo ed agisce a livello intestinale aumentando il riassorbimento di calcio e fosforo.

La calcitonina viene prodotta dalle cellule parafollicolari (cellule C) della tiroide e la sua secrezione è stimolata da elevati livelli di calcemia determinando ipocalcemia ed iper calciuria. Le sue azioni possono essere così sintetizzate:

- a livello osseo inibisce il riassorbimento periosteocitario e previene l'osteolisi indotta dal PTH;

- a livello renale determina un aumento della clearance renale del calcio e del fosforo;
- stimola l'enzima 1alfa-idrossilasi renale per garantire la presenza in circolo di vitamina D.

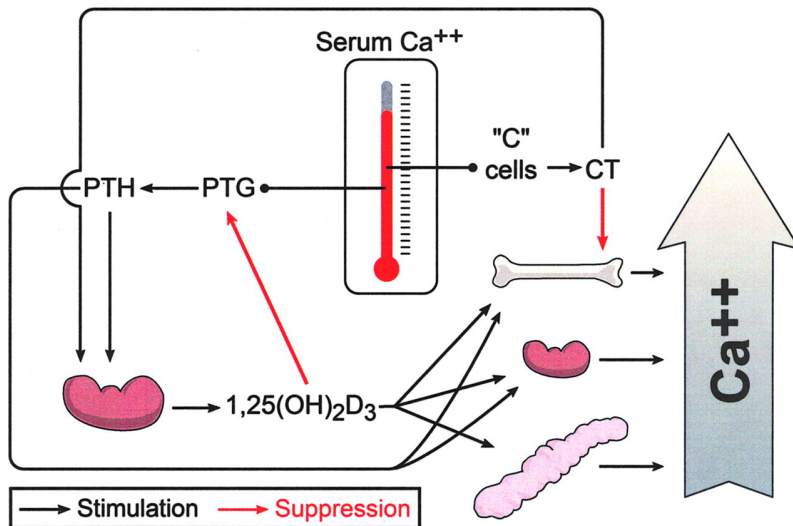


fig 2: Regolazione del metabolismo della Vitamina D[2]

### *Vitamina D e laboratorio*

Nonostante 1,25-diidrossivitamina D sia la forma biologicamente attiva di vitamina D non può essere considerata un indice attendibile, a causa della breve emivita (< di 4 ore), al contrario la 25-idrossivitamina D, con un'emivita di circa 2 settimane, risulta essere affidabile ed il suo valore viene utilizzato per monitorare i livelli di vitamina D del nostro organismo.

Recentemente sono stati modificati i parametri per valutare lo status vitaminico D, con la determinazione dei seguenti livelli:

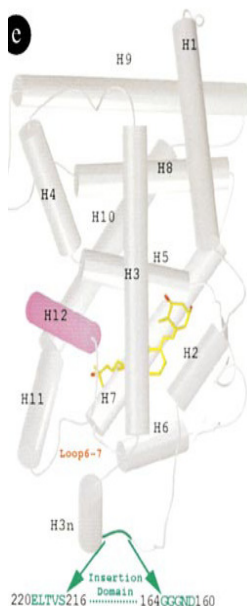
- sufficienza: > 30 ng/ml (>75 nmol/L)
- insufficienza: 21-29 ng/ml (51-74 nmol/L)
- carenza: < 20 ng/ml (<50 nmol/L) [5]

Il valore di laboratorio può essere rappresentato in ng/mL oppure in nmol/L, esiste un fattore di conversione che correla i 2 valori nel seguente modo:

- ng/mL  $\longrightarrow$  nmol/L = moltiplicare per 2,5
- nmol/L  $\longrightarrow$  ng/mL = dividere per 2,5

Purtroppo le metodiche d'analisi (assay) disponibili in commercio portano a risultati dei livelli di vitamina D, su uno stesso campione, ampiamente diversi l'uno dall'altro, come è stato rilevato da diversi studi [2].

### Il recettore della vitamina D (VDR)



Tutte le funzioni della vitamina D sembrerebbero essere svolte attraverso il legame con il suo unico recettore, VDR (Figura 3). Sono stati identificati due tipi di recettori, il primo, localizzato nel nucleo, appartiene alla famiglia dei recettori degli ormoni steroidei di classe 2, strettamente legato al recettore dell'acido retinoico ed a quello dell'ormone tiroideo. Esso è un fattore di trascrizione nucleare, ha un dominio legante il DNA (dominio C), un dominio legante il ligando (dominio E) e un dominio attivante (dominio F). Il VDR umano è un

Fig3: il VDR e il suo ligando

peptide di 427 aminoacidi [2]. Il VDR nucleare si eterodimerizza con RXR (recettore X retinoide) e insieme si legano ai VDREs (vitamin Response Elements) nei promotori dei geni, stimolando direttamente la trascrizione di geni e la sintesi ex-novo di proteine (meccanismo genomico). L'altro recettore è localizzato sulla membrana cellulare ed agisce inducendo la formazione di secondi messaggeri cellulari (cAMP, diacilglicerolo, inositolo trifosfato, acido arachidonico) o fosforilando alcune proteine cellulari. Tale meccanismo d'azione non è genomico e questa forma

recettoriale giustifica gli effetti rapidi che si inducono usando 1,25-diidrossivitamina D e suoi derivati.

I recettori per la vitamina D sono praticamente ubiquitari pertanto hanno un ruolo fisiologico non solo nel metabolismo minerale ma anche in numerose altre funzioni dell'organismo. L'affinità del recettore della vitamina per 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> è mille volte maggiore rispetto a quella per la 25 (OH)D o per altri metaboliti.

### *Effetti classici della vitamina D*

La carenza di vitamina D, durante la vita fetale e l'infanzia, può causare rachitismo e aumento di fratture patologiche dell'osso nel corso della vita, mentre l'ipovitaminosi D nella vita adulta, può esacerbare o precipitare una situazione di osteopenia o osteoporosi, causare osteomalacia e debolezza muscolare, aumentando i rischi di frattura.

Il meccanismo d'azione dei metaboliti della vitamina D è oggetto di ricerca. La 1,25-diidrossivitamina D è un ormone fondamentale per il mantenimento di un adeguato metabolismo osseo e per l'omeostasi di calcio e fosfato.

Esso aumenta la concentrazione sierica di calcio e fosfato attraverso tre meccanismi (Figura 4):

1. Induce la sintesi a livello intestinale delle proteine coinvolte nell'assorbimento di calcio e fosfato. Ciò è confermato dal fatto che in assenza di vitamina D soltanto il 10-15 % di calcio e il 60% di fosfato contenuti nella dieta sono assorbiti, diventando rispettivamente, il 30- 40% e l'80% in presenza di essa.
2. Stimola il RANK ligando negli osteoblasti attivando l'osteoclastogenesi e gli osteoclasti a riposo accelerando il riassorbimento osseo [2].
3. Infine interviene, a livello dei tubuli distali renali, aumentando il riassorbimento di calcio e fosfato. In questo agisce sinergicamente col PTH, solo nei confronti del calcio, mentre per quanto riguarda il fosfato i due ormoni hanno un azione opposta [2].

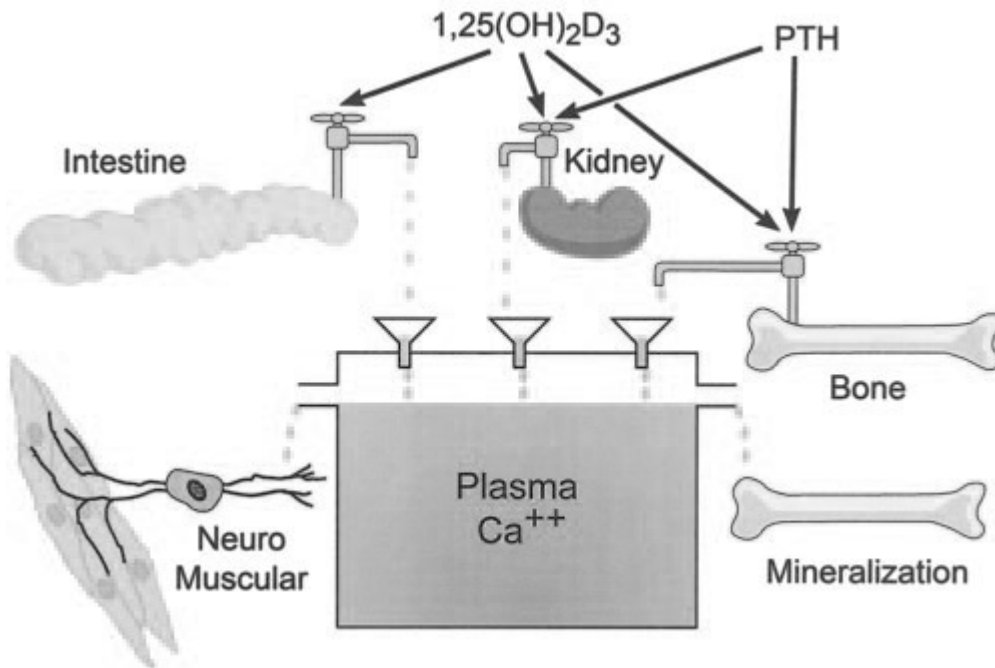


Fig 4: meccanismi regolatori della Vitamina D e del PTH sulla concentrazione plasmatica di  $\text{Ca}^{++}$  [2].

I metaboliti 25-idrossivitamina D e 24,25-diidrossivitamina D rappresentano fattori di stimolazione meno potenti per il trasporto intestinale di calcio e fosfato e per il loro riassorbimento osseo. La forma 25-idrossivitamina D, peraltro, comporta una più potente stimolazione, rispetto alla forma 1,25-diidrossivitamina D, ai fini del riassorbimento renale di calcio e fosfato e può rappresentare il mediatore maggiormente attivo nella regolazione dei flussi di calcio e della contrattilità a livello muscolare. Nei tessuti bersaglio esistono recettori specifici per la forma 1,25-diidrossivitamina D. La funzione e la stessa esistenza di recettori cellulari per la forma 25-idrossivitamina D e 24,25-diidrossivitamina D restano dubbi [1].

#### *Effetti non classici della vitamina D*

La vitamina D svolge importanti funzioni anche al di fuori del tessuto muscolo scheletrico. E' stata infatti osservata la presenza di recettori per la vitamina D in vari tipi cellulari ed è stata documentata l'espressione della 1 $\alpha$ idrossilasi nei macrofagi attivati, negli osteoblasti, nei cheratinociti e a livello di prostata, colon e

mammella. La produzione locale di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  non contribuisce al mantenimento dell'omeostasi calcemica e lo dimostra il fatto che i pazienti nefrectomizzati o con grave insufficienza renale presentano livelli indosabili; la produzione locale invece sarebbe implicata nei meccanismi di regolazione paracrina della crescita cellulare, compresa quella tumorale [9,10]. L'identificazione del VDR nel tessuto renale e la correlazione negativa tra i livelli di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  e renina suggeriscono un possibile ruolo della vitamina D anche nella regolazione della pressione arteriosa [11].

### Vitamina D e sistema immunitario

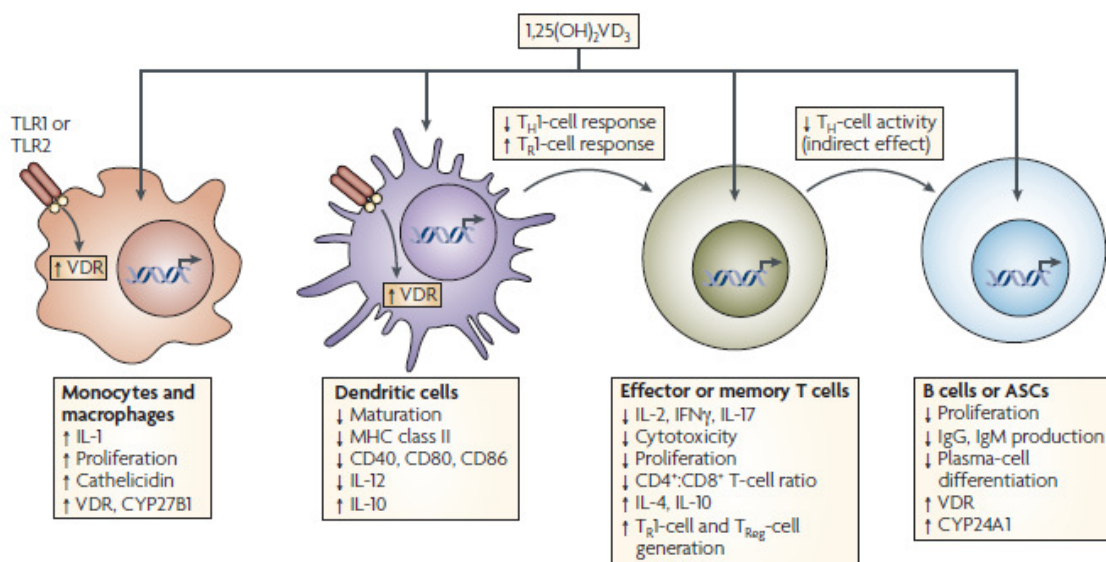


Fig 5: effetti della vitamina D sul sistema immunitario. [6]

La consapevolezza di un ruolo della vitamina D nella regolazione delle risposte immunitarie è stata raggiunta con la scoperta che il VDR è presente in quasi tutte le cellule del sistema immunitario tra cui i linfociti T attivati CD4 e CD8, i linfociti B, i neutrofili, le APCs (cellule presentanti l'antigene), i macrofagi. [8]

### Vitamina D e cellule dendritiche

Le cellule dendritiche sono APCs altamente specializzate che catturano, processano e presentano l'antigene alle cellule T. Le cellule dendritiche immature promuovono la tolleranza cellulare, mentre quelle mature attivano le cellule T naive [12,13].

Durante il loro differenziamento le cellule dendritiche, diminuiscono l'espressione del marker monocitico CD14, mentre aumentano quella del marker dendritico CD1a. Somministrando 1,25-diidrossivitamina D si è osservata un'inibizione completa della differenziazione delle cellule dendritiche CD1a+, mentre è sostenuta l'espressione dei markers monocitici [8]. La 1,25-diidrossivitamina D, inibendo NF-kB, un fattore di trascrizione cruciale per le risposte infiammatorie e in questo caso coinvolto nella differenziazione mieloide delle cellule dendritiche, va a bloccare l'espressione del MHC di classe 2 e delle molecole costimolatorie CD40, CD80 e CD86, diminuendo così la loro capacità di presentare l'antigene e attivare i linfociti T [7,13,14]; ciò è confermato dal fatto che topi con deficit di VDR hanno un aumentato numero di cellule dendritiche mature all'interno dei linfonodi drenanti dalla cute [15]. Questi effetti della 1,25-diidrossivitamina D portano come conseguenza a un'alterazione della produzione di citochine da parte delle cellule dendritiche: diminuisce infatti la sintesi di IL-12 e IL-23, mentre aumenta quella di IL-10, causando una diminuzione della risposta dei linfociti TH1 e TH17 e un aumento dei linfociti TR1 (cellule T regolatrici di tipo 1) produttori di IL-10. Aumenta anche la produzione della chemochina MIP-3 $\alpha$ , anche conosciuta come CCL2, che interviene attivamente nel reclutamento dei linfociti T regolatori, che esprimono il CCR4 [8]. Da quanto detto, la vitamina D, attraverso l'inibizione della maturazione e differenziazione delle cellule dendritiche, sembrerebbe portare alla formazione di cellule dendritiche coinvolte in meccanismi di tolleranza cellulare ed inibire la formazione di cellule dendritiche coinvolte in meccanismi di difesa.

In contrasto con questi effetti inibitori sulle cellule dendritiche, essa sembra giocare un ruolo importante nell'avvio della risposta immunitaria, aumentando l'espressione del recettore per il mannosio, una molecola coinvolta nella cattura dell'antigene e correlata con un aumento della capacità di endocitosi.

Come per i macrofagi, le cellule dendritiche mostrano da un lato un aumento dell'espressione dell'1 $\alpha$ -idrossilasi, dall'altro una diminuzione del VDR, durante

la loro maturazione. Questa organizzazione reciproca dell'espressione dell'1 alfa-idrossilasi e del VDR ha il potenziale effetto positivo di assicurare che le cellule dendritiche mature siano relativamente insensibili all'1,25-diidrossivitamina D, mantenendo la loro capacità di favorire una risposta T iniziale e stimolare l'immunità acquisita. Allo stesso tempo, l'1,25-diidrossivitamina D generata da queste cellule sarà in grado di agire sul VDR espresso sulle cellule dendritiche immature, limitandone l'ulteriore maturazione, che comporterebbe una conseguente sovra stimolazione di cellule T.

Le cellule dendritiche possono essere divise in due gruppi, mieloidi (mDCs) e plasmocitoidi (pDCs), che sono caratterizzate da un diverso profilo citochinico e chemochinico. Oltretutto esse sembrano esercitare effetti complementari sulle cellule T, infatti mentre le mDCs sono efficienti APCs, le pDCs sono più legate alla tolleranza immunitaria. L'effetto della 1,25-diidrossivitamina D su questi due gruppi non è equivalente, si è visto infatti che essa regola, in modo preferenziale, mDCs, con conseguente soppressione dell'attivazione delle cellule T naive. L'assenza di una risposta da parte delle pDCs non preclude un ruolo della vitamina D su di esse, potrebbe infatti essere che la produzione locale, invece che l'addizione esogena, sia più efficace su queste, oppure che l'espressione dell'1alfa-idrossilasi, da parte di queste possa favorire gli effetti paracrini della 1,25-diidrossivitamina D sulle cellule T esprimenti il VDR [16].

### Vitamina D e immunità innata

L'immunità innata funge da prima barriera di difesa nei confronti di microrganismi patogeni come batteri, virus, protozoi, funghi.

Le cellule dell'immunità innata esprimono recettori per il riconoscimento dei PAMPs (profili molecolari dei microbi); l'LPS (lipopolisaccaride), la flagellina, proteine virali e RNA a singola e doppia elica ne rappresentano gli elementi principali.

Un ruolo importante è svolto da una sottoclasse di recettori di riconoscimento dei PAMPs: i TLRs (Toll Like Receptors), espressi primariamente sulla membrana cellulare o negli endosomi. La risposta ai segnali trasmessi dai TLR include la



produzione di peptidi antimicrobici, di citochine e l'apoptosi dell'ospite attraverso altre risposte.

Ci sono tre famiglie maggiori di peptidi antimicrobici prodotti dagli esseri umani: la catelicidina e le alfa- e beta- defensine [16].

La vitamina D stimola la proliferazione in vitro dei monociti oltre ad aumentare la produzione del peptide batterico catelicidina (hCAP), da parte di monociti e macrofagi.

L'attivazione da parte di antigeni patogeni di TLRs su monociti e macrofagi, porta a una sovraregolazione del VDR e di altri geni target del VDR e alla produzione di catelicidina e di altri peptidi antimicrobici.

La Catelicidina, che per essere attivata deve essere clivata per formare il suo peptide maggiore LL-37, esegue innumerevoli compiti nell'immunità innata oltre alle sue ben note proprietà antimicrobiche: esso stimola l'aumento di citochine come IL-6 ,IL-10, IL-18; stimola il recettore del fattore di crescita epidermico, portando all'attivazione di STAT-1 e STAT-3; induce la chemiotassi di neutrofili, monociti, macrofagi e cellule T nella cute; promuove la proliferazione e migrazione cheratinocitaria. La catelicidina funge dunque da ponte tra immunità innata e acquisita [7]. L'aumento della sua espressione da parte della 1,25-diidrossivitamina D avviene in molte linee cellulari, oltre ai monociti e macrofagi tra cui quelle di derivazione cutanea, neutrofila, polmonare, intestinale.

Recentemente si è visto che 1,25-diidrossivitamina D è un induttore diretto del gene codificante NOD2/CARD15/IBD1, nelle cellule di origine monocitaria e epiteliale. Questo recettore riconosce il dipeptide muramile (MDP), un prodotto del catabolismo lisosomiale di un peptidoglicano batterico comune ai gram-negativi e ai gram-positivi. L'attivazione del NOD-2 indotta dal MDP stimola il fattore di trascrizione NF-kB, che induce l'espressione del gene della defensina beta2 [8].

È stato identificato un VDRE anche a livello del promotore del gene DEFB4, codificante per la beta-defensina 4, ma la sua stimolazione da parte del VDR non è sufficiente a indurre il gene, che necessita di un secondo segnale, dato dal fattore di trascrizione NFkB, indotto dal legame tra l'IL-1 e il suo recettore [16].

Per quanto riguarda la regolazione da parte della vitamina D della ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) ci sono dati contrastanti: mentre in una linea cellulare di

macrofagi umani e stata dimostrata l'induzione da parte della 1,25-diidrossivitamina D di questa, in altri studi sembrerebbe avere effetti inibitori [8]. Sorprendentemente, mentre la vitamina D promuove l'attività antimicrobica delle cellule mieloidi, essa inibisce l'espressione di TLR2 e TLR4 sui monociti, inducendo uno stato di iporesponsività ai PAMPs. Questo effetto, che raggiunge l'apice dopo circa 72 ore, sembrerebbe svolgere un ruolo di feedback negativo, per prevenire un'eccessiva attivazione dei TLR e quindi flogosi in uno stadio tardivo di infiammazione.

I monociti differenziandosi sia in macrofagi, sia in cellule dendritiche, diminuiscono la loro espressione di VDRs, diventando meno sensibili alla 1,25-diidrossivitamina D con il processo maturativo [8].

Per quanto riguarda la produzione citochinica da parte delle cellule monocitarie: la 1,25-diidrossivitamina D sembrerebbe da un lato aumentare la produzione di IL-1, dall'altro diminuire la produzione sia del TNF- $\alpha$  [17], sia dell'IL-6, quest'ultimo attraverso la down-regolazione del TLR-9 [18].

L'attività della 1,25-diidrossivitamina D sui Natural Killer (NK) non è del tutto compresa, i risultati sono contrastanti: mentre in un gruppo di studi (sia in vitro, che in vivo) essa sembrerebbe avere effetti soppressivi indiretti sull'attività dei NK, attraverso l'interazione con altre cellule immunitarie, come i macrofagi [19], in altri è stata rilevata una stimolazione diretta dose dipendente da parte della 1,25-diidrossivitamina D sulla citotossicità dei NK, attraverso l'attivazione di una proteina chinasi C [20].

La 1,25-diidrossivitamina D sembrerebbe ridurre non soltanto la citotossicità, ma anche la proliferazione dei NK, indotte dall'IL-2, la cui produzione da parte dei linfociti T è a sua volta inibita dalla stessa 1,25-diidrossivitamina D [21].

Nonostante tutto ciò, si è osservato che topi con deficit di VDR presentano una normale composizione della popolazione delle cellule immunitarie e rigettano, allo stesso modo dei topi VDR positivi, il trapianto allogenico e xenogenico [15]

## Vitamina D e immunità acquisita

La 1,25-diidrossivitamina D agisce sia direttamente sulle cellule T sia indirettamente andando a regolare la produzione di citochine determinanti per il differenziamento linfocitario. Indirettamente, l'effetto complessivo della vitamina D sulle cellule T è quello da un lato di bloccare la produzione di citochine promuoventi i linfociti Th 1, in particolare IFN- $\gamma$  e IL-12, dall'altro di promuovere le risposte dei linfociti Th 2 sia indirettamente diminuendo IFN- $\gamma$  e IL-12, sia direttamente aumentando la produzione di IL-4, IL-5 e IL-10.

Inoltre la 1,25-diidrossivitamina D diminuendo la produzione di IL-6 e IL-23, inibisce la risposta dei linfociti Th 17 (un sottogruppo delle cellule T CD4+, coinvolte nell'autoimmunità organo specifica e che svolgono un ruolo nel mantenimento dell'infiammazione), mentre induce la differenziazione e/o l'espansione dei linfociti T reg CD4+ CD25++ (cellule fondamentali nell'induzione della tolleranza immunitaria), che esprimono alti livelli di CTLA-4 e FoxP3 [7,15,22]. La 1,25-diidrossivitamina D interviene anche direttamente inibendo la capacità dei linfociti TH17 di produrre IL-17 e dei linfociti T FH (cellule che stimolano i linfociti B nei centri germinativi) di produrre IL-21 [22].

Poiché l'espressione del VDR nelle cellule T è drammaticamente aumentata durante la loro attivazione, l'azione diretta sulle cellule T sembrerebbe rappresentare per la vitamina D una via aggiuntiva di intervenire nel loro differenziamento. L'aumentata espressione di VDR può essere influenzata da vari stimoli, tra questi anti-CD3/anti-CD28, due segnali fondamentali per la completa attivazione cellulare T.

Tuttavia, i livelli e la cinetica del VDR sembrano variare tra i diversi stimoli di attivazione, questo potrebbe essere il motivo dei risultati spesso conflittuali, ottenuti in diversi studi sugli effetti della vitamina D sulla proliferazione delle cellule T.

La 1,25-diidrossivitamina D inibisce la produzione da parte dei linfociti T di IL-2, bloccando la formazione del fattore di trascrizione NF-AT, e dell'IFN- $\gamma$ , attraverso l'interazione del complesso VDR-ligando con un VDRE, posto nel promotore di questa citochina [13].

Gli effetti inibitori diretti della 1,25-diidrossivitamina D sono più pronunciati a livello delle cellule T della memoria, in quanto queste come anche quelle effettrici hanno un maggior numero di VDR rispetto alle cellule naive [8].

La 1,25-diidrossivitamina D influisce sulle proprietà di homing delle cellule T inducendo l'espressione del recettore chemochinico CCR10, del recettore per CCL27 (citochina specifica per i cheratinociti [16]), inibendo, invece, l'espressione di CCR9, recettore di homing intestinale.

D'altro canto essa inibisce l'espressione sulla superficie cellulare dei linfociti T dell'antigene cutaneo associato ai linfociti (CLA), un altro recettore, col compito di dirigere i linfociti T alla cute. In accordo con questo si è visto che un analogo della vitamina D alterava profondamente i segnali di migrazione delle cellule T umane, non solo intervenendo sulle proprietà di homing cutaneo di queste, ma anche inducendo un profilo dei recettori di homing favorente la migrazione nei luoghi di flogosi [8].

Per quanto riguarda i linfociti B, la 1,25-diidrossivitamina D ne diminuisce la proliferazione, la differenziazione e la produzione anticorpale e ne aumenta l'apoptosi, con ogni probabilità secondariamente ai suoi effetti sulle APC e sui linfociti T, mentre non è ancora chiaro se essa possa agire direttamente su di esse, infatti esistono pareri discordanti sulla presenza o meno del recettore VDR su queste ultime.

### Vitamina D e Linfociti T $\gamma\delta$

I linfociti T  $\gamma\delta$  rappresentano una piccola percentuale (1-5%) sul totale delle cellule linfocitarie T del sangue periferico. Essi sembrano rispondere a piccoli antigeni fosforici, espressi da alcuni organismi potenzialmente patogeni, tra cui l'isopentenilpirofosfato (IPP). La loro attivazione porta alla rapida produzione di citochine, in particolare del tipo Th1 e chemochine, coinvolte nelle risposte infiammatorie e immunitarie, così come nella generazione di cellule T con attività citotossica.

La vitamina D sembrerebbe svolgere molteplici attività su queste cellule. In un importante studio [23], si è infatti visto che a seguito dell'attivazione da parte di IPP, c'è una sovra-regolazione del VDR all'interno dei LT  $\gamma\delta$ , attraverso una via coinvolgente la PKC (proteina chinasi C).

Questa sovra-regolazione del VDR e l'interazione col suo ligando, riduce la produzione di INF- $\gamma$ , inibisce l'attivazione delle cellule  $\gamma\delta$  da parte di antigeni fosforici, diminuendo l'espressione del CD25, il recettore ad alta affinità per l'IL-2, in modo dose dipendente. A concentrazioni molto elevate la 1,25-diidrossivitamina D sembrerebbe addirittura potenziare la morte cellulare antigene-indotta, probabilmente sempre attraverso la riduzione dell'espressione di CD25.

L'inibizione della produzione di IFN- $\gamma$  tanto a livello delle  $\gamma\delta$ , quanto dei linfociti T CD4+, avviene attraverso l'interazione dell'eterodimero formato da VDR-RXR e due diversi siti del promotore dell' INF- $\gamma$ .

La diminuzione dei livelli di  $\gamma\delta$  sembra determinare effetti protettivi nei confronti dell'encefalite allergica sperimentale sui topi, dove si è visto che l'attività proinfiammatoria di questi diminuirebbe la soglia di attivazione dei linfociti Th1, facilitando l'accumulo di cellule T antigene-specifiche nel SNC.

IL-2 è un indispensabile fattore di crescita per i  $\gamma\delta$ : la 1,25-diidrossivitamina D, oltre a ridurre l'espressione del suo recettore su di essi, ne diminuisce anche la produzione da parte delle cellule T.

La 1,25-diidrossivitamina D sembrerebbe ancora una volta controllare l'ampiezza della risposta immunitaria. È comunque importante sottolineare che i linfociti  $\gamma\delta$ , oltre a essere coinvolti in risposte immunitarie aberranti, hanno un importante effetto protettivo nei confronti di infezioni batteriche, in particolare micobatteriche [23], e neoplasie. È infatti proprio attraverso la stimolazione dei linfociti T  $\gamma\delta$ , che gli amino-bifosfonati sembrerebbero esercitare effetti antineoplastici [24].

Questa stimolazione degli amino-bifosfonati sui linfociti  $\gamma\delta$ , produce tuttavia un effetto collaterale: la reazione di fase acuta, che molti pazienti sperimentano dopo la prima somministrazione.

### Riscontri clinici

Visti i molteplici effetti a livello del sistema immunitario e la vasta presenza del VDR non sorprende che in numerosi studi sia stata riscontrata una correlazione inversa fra i livelli di vitamina D e l'incidenza di alcune malattie come: patologie infettive (tubercolosi, influenza, HIV), malattie autoimmuni (sclerosi multipla, diabete mellito tipo I, malattie reumatiche, psoriasi, malattie infiammatorie croniche intestinali), asma, patologie cardiovascolari e neoplasie. (tabella 1).

Ciò nonostante per molte di queste patologie il dibattito è ancora aperto, con risultati contrastanti tra uno studio e l'altro, soprattutto per quanto riguarda la correlazione tra vitamina D e neoplasie [25,26].

<b>Patologia</b>	<b>Meccanismo d'azione della vitamina D</b>
Tubercolosi	Peptidi antimicrobici [13, 24]
Infezioni: influenza, HIV [25], infezioni delle alte vie respiratorie	Peptidi antimicrobici [13]
Malattie autoimmuni:	
• Sclerosi multipla [4,10]	T Helper 1, T Helper 17, T Reg [26], $LT\gamma\delta$ [22]
• Diabete mellito tipo 1 [27]	T Helper 1, T Helper 17, T Reg
• Malattie reumatiche	T Helper 1, T Helper 17, T Reg [28]
• Psoriasi	IL-17, defensine- beta, T Reg
• Malattie infiammatorie croniche intestinali	Defensina- beta 2 [29]
Asma	T Reg [30]
Rigetto di trapianto	T Reg, T Helper 1, chemochine,
Malattie cardiovascolari (ipertensione, scompenso cardiaco, IMA) [31]	Renina-angiotensina-aldosterone, insulina, citochine infiammatorie, compliance vascolare, rimodellamento miocardico
Neoplasie (linfomi Hodgkin, colon, pancreas [32], prostata, ovaio, seno [33]) [34], [35]	Geni per proliferazione, differenziazione, detossificazione, gestione energetica cellulare [10]

Tabella 1: patologie correlate all'ipovitaminosi D

### *Assunzione giornaliera di vitamina D*

Abbiamo dati ancora insufficienti per stabilire una dose giornaliera raccomandata, ciò nonostante negli Stati Uniti sono stati fissati questi valori:

- 200 UI dall'infanzia fino ai 50 anni
- 400 UI dai 51 ai 70 anni
- 600 UI dai 71 in su
- 1000 UI nei soggetti con fattori di rischi per ipovitaminosi D, come pelle nera, scarsa esposizione solare, età avanzata, BMI > 30
- Recentemente è stato portato a 400 UI in adolescenti e bambini che non hanno un'assunzione adeguata di cibi addizionati con vitamina D.

### *Cause di ipovitaminosi*

Molti degli effetti “non classici” della vitamina D sembrano verificarsi solo a concentrazioni di 25-idrossivitamina D ben più alte di quelle riscontrate nella popolazione generale, soprattutto nelle regioni temperate.

Le cause di questa ipovitaminosi sono:

1. produzione cutanea compromessa;
2. farmaci: antiepilettici, glucocorticoidi, rifampicina, iperico, HAART (terapia anti-retrovirale);
3. obesità (sequestro di vitamina D nel tessuto adiposo);
4. insufficienza epatica;
5. nefropatie:
  - IRC: diminuita sintesi di 1,25-diidrossivitamina D
  - Sindrome nefrosica: perdita con le urine di 25-idrossivitamina D, legata alla sua proteina trasportatrice.
6. malassorbimento (malattia celiaca, morbo di Crohn, malattia di Whipple, fibrosi cistica, epato-pancreatopatie, bypass chirurgici, terapie che riducono il riassorbimento di colesterolo);
7. allattamento al seno (scarso contenuto di vitamina D nel latte umano);

8. disordini genetici ereditabili: come la mutazione dei geni codificanti CYP27B1, il VDR [31], il fattore di crescita dei fibroblasti 23;

9. disordini acquisiti:

- produzione ectopica neoplastica di FGF 23
- iperparatiroidismo primario, con aumentata trasformazione di 25-idrossivitamina D in 1,25-diidrossivitamina D
- sarcoidosi, tubercolosi, linfomi: per aumentata conversione di 25-idrossivitaminaD in 1,25-diidrossivitamina D, da parte dei macrofagi
- ipertiroidismo: aumentato metabolismo del 25-idrossivitaminaD.

Soffermandoci sul primo punto si può capire l'entità del problema, in quanto molteplici e soprattutto subdole possono essere le cause di una compromissione della produzione cutanea:

- invecchiamento
- uso di protezioni solari (SPF 15)
- pigmento cutaneo
- stagione invernale a latitudini superiori a 35 N

La melanina difende la cute dell'uomo dagli effetti nefasti dei raggi UVB, purtroppo però essa, attraverso l'azione schermante, riduce la produzione della vitamina D.

Per questo, con la migrazione dall'equatore, poiché l'incidenza dei raggi UV non era più così diretta, l'uomo ha perso parte della sua pigmentazione, tuttavia alle latitudini temperate, durante la stagione invernale, la produzione cutanea di vitamina D non è sufficiente e andrebbe integrata con la dieta. La razza nera è ancora più soggetta a questo problema, in quanto la vitamina D è sintetizzata sei volte più lentamente di quanto non avvenga per i soggetti di razza caucasica [5,6,27]. Diversi studi condotti per valutare lo status vitaminico D nella popolazione generale, pur mettendo in risalto percentuali molto variabili tra uno e l'altro, sembrano confermare l'elevata incidenza di ipovitaminosi D [14,28,29]. Dunque non sorprende il fatto di una correlazione diretta tra l'aumento della latitudine e l'aumentata incidenza di molteplici malattie, soprattutto di natura autoimmune, come la sclerosi multipla [5].



Per maggiore precisione è giusto sottolineare che alla stessa latitudine c'è una differente produzione di vitamina D attraverso l'esposizione ai raggi solari a seconda dell'altitudine: altitudine e produzione di vitamina D sembrerebbero infatti legate da una correlazione diretta [30].

Un altro ostacolo alla produzione cutanea di vitamina D risiede nell'uso di creme ad alto schermo solare, che sono diventate necessarie per l'alta incidenza di neoplasie cutanee attribuibili ai raggi UV, frutto di una errata esposizione alla luce solare, come melanoma, basalioma, tumore spinocellulare.

Pare che i filtri solari, se applicati correttamente riducano la produzione di vitamina D del 98% [5]. Ci sono comunque pareri discordanti al riguardo, non vi sono basi per affermare che gli schermi solari contribuiscano a dare ipovitaminosi D [6]. Per quanto riguarda l'invecchiamento, si è visto che con l'aumentare dell'età, diminuisce la capacità della cute di sintetizzare vitamina D, a causa della diminuzione dei livelli di 7-deidrocolesterolo [6].

Un'altra causa di ipovitaminosi, che epidemiologicamente ha senz'altro rilievo, è l'obesità: è emersa una correlazione inversa tra livelli di 25-idrossivitamina D e BMI (indice di massa corporea), dovuta ad un sequestro di questa nel tessuto adiposo [31,32]. Inoltre sembrerebbe che la 1,25-diidrossivitamina-D abbia un ruolo nell'apoptosi degli adipociti. I bassi livelli di 25-idrossivitamina D nella popolazione obesa sembrerebbero quindi partecipare attivamente alla patogenesi della malattia e non solo esserne la conseguenza. [33].

### *Effetti collaterali della vitamina D*

Nonostante i suoi molteplici effetti positivi, non bisogna dimenticare che la vitamina D può dare seri effetti avversi, come l'ipercalcemia e problemi a livello del riassorbimento osseo. Per questo si sta cercando di trovare analoghi della vitamina D che agiscano come immunomodulatori senza causare una rilevante ipercalcemia.

L'intossicazione da vitamina D, che si ha per livelli ematici di 25-idrossivitamina D superiori a 150 ng/ml (374 nmol/l), attraverso la supplementazione della dieta è

sicuramente possibile, ma rara in quanto per raggiungere livelli tossici è necessario assumerne almeno 40000 UI tutti i giorni per un esteso periodo. L'intossicazione da produzione cutanea è ancora più improbabile, poiché, come già detto, gli UVB oltre a sintetizzare la vitamina D provvedono anche alla sua inattivazione [5].

Pazienti con malattie granulomatose sono più sensibili ad alti livelli di 25-idrossivitamina D a causa della produzione da parte dei macrofagi di 1,25-diidrossivitamina D, che può causare ipercalcemia e ipercalciuria. In questi pazienti tuttavia i livelli di 25-idrossivitamina D devono essere mantenuti approssimativamente a 20-30 ng/ml per prevenire l'insorgenza di iperparatiroidismo secondario.

## Bisfosfonati

### Chimica

I bisfosfonati (BF) sono degli analoghi del pirofosfato [figura 6], sostanza presente nei liquidi biologici capace di inibire l'aggregazione e la dissoluzione dei cristalli di fosfato di calcio e la calcificazione ectopica.

Nei BF il ponte P-O-P è stato sostituito con un ponte P-C-P non idrolizzabile, pertanto come l'analogo sono in grado di chelare cationi divalenti (es.: calcio) ed avere come bersaglio l'osso inoltre avendo una struttura non idrolizzabile e grazie alla stereochimica della catena R2 sono in grado di inibire gli osteoclasti.

### Structure of bisphosphonates and pyrophosphate



The bisphosphonates share a P-C-P structure compared to the P-O-P structure of pyrophosphate. The different bisphosphonates vary at the two R groups.

Figura 6: struttura dei bifosfonati e del pirofosfato

In base alla presenza o meno di un gruppo amminico [NH<sub>2</sub>] a livello della catena R<sub>2</sub> possiamo distinguere [figura 7]:

- amino-bisfosfonati: alendronato, risedronato, neridronato, ibandronato e zolendronato
- non amino-bisfosfonati: clodronato, etidronato

Inoltre, da sottolineare che il risedronato e l'acido zoledronico hanno un gruppo amminico nell'anello eterociclico e questo dona loro una attività 10000 volte più potente rispetto agli altri.

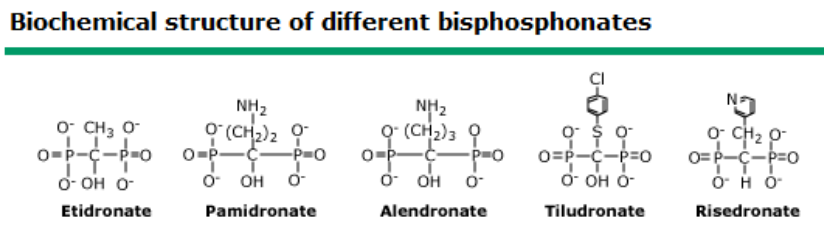


Figura 7: struttura biochimica dei bifosfonati

In base alle caratteristiche chimiche ed alla potenza relativa i BF sono stati raggruppati in tre gruppi [tabella 2]:

- a) I generazione: *etidronato e clodronato*, il radicale laterale (R<sub>2</sub>) dell'atomo di carbonio è rappresentato da una radicale alchilico e da un atomo di cloro; sono dotati di una debole attività antiriassorbitiva.
- b) II generazione: *ibandronato, alendronato, pamidronato e neridronato*, il radicale laterale R<sub>2</sub> è costituito da gruppi amino alchilici; sono dotati di maggiore attività antiriassorbitiva rispetto ai BF di I generazione.
- c) III generazione: *risedronato e acido zoledronico (in Italia)*, il radicale R<sub>2</sub> è sostituito da un gruppo contenente un anello aromatico; hanno un'attività antiriassorbitiva molto potente [34].

	<b>Catena laterale R1</b>	<b>Catena laterale R2</b>
<b>Etidronato (I)</b>	OH	CH3
<b>Clodronato (I)</b>	C1	C1
<b>Pamidronato (II)</b>	OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
<b>Neridronato (II)</b>	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>
<b>Alendronato (II)</b>	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>
<b>Ibandronato (II)</b>	OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )
<b>Risedronato (III)</b>	OH	CH <sub>2</sub> -3-pyridine
<b>Zoledronato (III)</b>	OH	CH <sub>2</sub> -imidazole

Tabella 2: differenze nelle catene laterali R1 e R2 tra i diversi bisfosfonati (amino e non)

#### *Meccanismo d'azione*

I non amino-bisfosfonati vengono incorporati in nucleotidi di adenina, internalizzati in un analogo non idrolizzabile dell'ATP pertanto tossico, provocando rapida lisi cellulare e necrosi degli osteoclasti.

Gli amino-bisfosfonati inibiscono la via del mevalonato [figura 8] bloccando la sintesi di farnesil-pirofosfato (FPP) e di geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP) determinando la prenilazione di proteine (Ras, Rac e Rho). L'effetto finale è l'apoptosi degli osteoclasti [24].

L'azione dei BF sugli osteoclasti non è solo l'apoptosi ma agiscono anche determinando la perdita dell'orletto a spazzola e dei vacuoli citoplasmatici, riducendo la produzione dell'acido lattico e diminuendo la sintesi degli enzimi lisosomiali, delle prostaglandine, di pirofosfatasi e della fosfatasi acida (enzimi fondamentali per l'attività fagocitica).

I BF vengono adsorbiti dalla superficie ossea, letteralmente "sepolti" all'interno della matrice mineralizzata dove possono rimanere per lunghi periodi determinando un'inibizione prolungata del turnover osseo (*osso congelato*).

L'affinità di legame con l'idrossiapatite influenza le proprietà biologiche dei farmaci e dunque la capacità di diffondere nell'osso, l'effetto antiapoptotico, la

quantità di farmaco adsorbita dall'osso e la persistenza dell'effetto antiassorbitivo. I BF a bassa affinità si distribuiscono più efficacemente in tutti i siti ossei e raggiungono maggiormente l'osso corticale rispetto ai BF ad alta affinità. Questo spiega il motivo per cui tutti i BF sono efficaci contro le fratture vertebrali ma solo alcuni sono efficaci contro le fratture non vertebrali.

I bisfosfonati sembra abbiano come bersaglio anche l'osteoblasta e tramite esso producono effetti sugli osteoclasti, infatti riducono la secrezione osteoblastica di alcuni fattori solubili in grado di regolare sia l'osteoclastogenesi che l'attività osteoclastica.

### *Uso clinico*

I BF sono farmaci che grazie alla loro capacità di inibire il riassorbimento osseo sono utilizzati nel trattamento di numerose malattie del metabolismo fosfo-calcico come la malattia di Paget, l'iperparatiroidismo primitivo e secondario, l'osteoporosi primitiva e secondaria. Vengono anche impiegati in oncologia per il trattamento delle ipercalcemie maligne e delle metastasi ossee al fine di rallentare o inibire il riassorbimento osseo degli osteoclasti attivati dalle cellule tumorali; recenti studi hanno inoltre dimostrato che molecole più recenti, come l'acido zolendronico, hanno effetti diretti come l'induzione dell'apoptosi, l'inibizione della proliferazione, dell'adesività e dell'invasività delle cellule neoplastiche ed effetti antitumorali diretti come l'inibizione dell'angiogenesi ed attività immunomodulatoria.

### *Effetti immunomodulatori degli Amino-Bisfosfonati*

L'effetto degli amino-bisfosfonati a livello del sistema immunitario è principalmente rivolto ai linfociti T  $\gamma\delta$  e in particolar modo alla sottopopolazione V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

La percentuale di questi linfociti è del 1-5% rispetto a tutte le cellule T linfocitarie del sangue periferico. Rispetto ai linfociti T  $\alpha\beta$ , essi non necessitano della processazione dell'antigene e della presentazione attraverso il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) da parte delle APC per il riconoscimento

antigenico e questo meccanismo permette di aggirare l'escamotage ideato da alcuni tumori di non esporre l'MHC, pertanto la stimolazione delle cellule T  $\gamma\delta$  potrebbe essere un potente approccio nella terapia antitumorale.

Alla base della stimolazione dei linfociti T  $\gamma\delta$  da parte degli amino-bisfosfonati sembra esserci l'accumulo di isopentenil pirofosfato (IPP) e di dimetilallil-pirofosfato (DMPP), conseguente al blocco da parte degli amino-bisfosfonati della via metabolica del mevalonato nel passaggio da geranil-pirofosfato a farnesil-pirofosfato [figura 8].

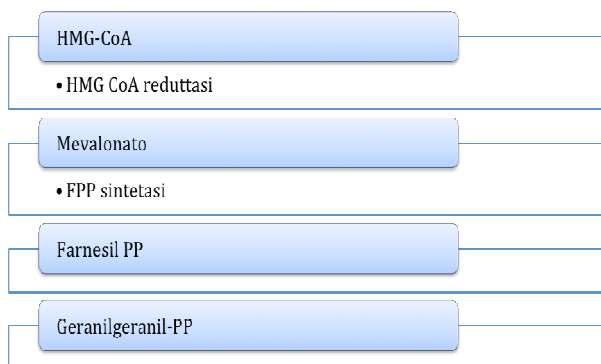


figura 8: via metabolica del mevalonato

Interrompendo la via del mevalonato anche all'interno delle cellule neoplastiche si blocca la prenilazione proteica con conseguente inibizione di numerose funzioni cellulari tra cui l'adesione, la migrazione, l'invasione, la proliferazione e l'apoptosi (in vitro). Potenzialmente, pertanto, se gli aminobisfosfonati, in particolar modo l'acido zoledronico, venissero somministrati negli stati precoci della malattia neoplastica il processo di metastatizzazione potrebbe essere prevenuto o ridotto [24].

IPP e DMPP hanno un effetto stimolante diretto sulle cellule T  $V\gamma9V\delta2$  con conseguente secrezione di citochine come IL6,  $TNF\alpha$ ,  $INF\gamma$  (effetto antitumorale), inoltre la liberazione dell' $INF\gamma$  determina la stimolazione dell'attività delle cellule NK, dei macrofagi e dei linfociti T  $\alpha\beta$ .

Recentemente sono stati descritti gli effetti in vivo dei bisfosfonati su sottopopolazioni di linfociti T  $V\gamma9V\delta2$  con diversa attività funzionale: le cellule naive ( $CD45RA^+, CD27^+$ ) e le cellule memoria ( $CD45RA^-, CD27^+$ ) proliferano abbondantemente ma perdono la funzionalità, mentre le cellule citotossiche

(CD45RA-, CD27-) proliferano scarsamente ma producono INF $\gamma$  ed esercitano attività citotossica. Dopo la somministrazione endovenosa di acido zolendronico in paziente con metastasi ossee causate da neoplasia mammaria e prostatica si osserva l'espansione della sottopopolazione effettrice di cellule V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 con contemporanea riduzione di cellule memoria e naive, tuttavia il numero percentuale delle cellule della sottopopolazione rimane invariato. Pertanto il trattamento con acido zolendronico sembra indurre le cellule V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 a maturare verso un fenotipo effettrice che produce INF $\gamma$ , più attivo verso le cellule tumorali [24].

Altro ruolo importante è giocato dal potenziale antiangiogenico degli aminobisfosfonati in grado di inibire le funzioni delle cellule endoteliali sia in vivo che in vitro [24].

#### *Effetti collaterali dei bisfosfonati specie dell'acido zolendronico*

L'effetto collaterale più rilevante causato dalla somministrazione endovenosa dei bisfosfonati è la comparsa di una reazione di fase acuta (APR) caratterizzata da affaticamento, disturbi gastro-intestinali, febbre e dolori muscolo-scheletrici che compare generalmente dopo 24-36 ore dall'infusione. I sintomi, che da alcuni autori vengono anche definiti sindrome simil influenzale, compaiono più frequentemente dopo la prima somministrazione, sono transitori e tendendo a risolversi spontaneamente entro 1-3 giorni dall'esordio.

APR è attribuita all'attivazione indiretta di cellule T  $\gamma\delta$  che secernono INF $\gamma$  e TNF, in effetti gli aminobisfosfonati inibiscono il riassorbimento osseo bloccando il farnesil pirofosfato sintetasi, un enzima della via del mevalonato che induce la sintesi del colesterolo. Questa inibizione, determinando un accumulo nei monociti di isopentenildifosfato e dimetilallil difosfato, stimola indirettamente l'attivazione delle cellule T  $\gamma\delta$  con successivo rilascio di INF- $\gamma$  e TNF.

I soggetti più giovani e che utilizzano FANS sono maggiormente predisposti a sviluppare una reazione di fase acuta mentre i pazienti fumatori, diabetici e che

sono già stati sottoposti a terapia con vitamina D e bifosfonati sono meno esposti. APR si manifesta più comunemente nei pazienti giovani in relazione al fatto che il numero delle cellule T  $\gamma\delta$  si riduce con l'età [35].

La proporzione di linfociti T  $\gamma\delta$  circolanti, insieme con l'età, correla dunque con la risposta di fase acuta [35].

Tuttavia non si conoscono ancora tutte le variabili coinvolte nella risposta di fase acuta né il motivo per cui solo alcuni soggetti sviluppano APR, ma vista l'elevata frequenza di ipovitaminosi D e le azioni inibitorie della 1,25 diidrossivitamina D sui  $\gamma\delta$  è lecito sostenere che vi sia una correlazione inversa fra livelli di 25-idrossivitamina D ed incidenza di reazione di fase acuta [36].

Altri effetti collaterali scatenati dalla somministrazione di bisfosfonati sono:

- Esofagite: limitata alla somministrazione orale ed agli amino-bisfosfonati; tale effetto collaterale risulta, tuttavia, legato all'errata assunzione del farmaco. In effetti la terapia andrebbe assunta rigorosamente a digiuno, mantenendo una posizione eretta per almeno 30 minuti dopo l'assunzione
- Tossicità renale: la somministrazione per via endovenosa di etidronato ad alte dosi o di amino-bisfosfonati può essere associata ad insufficienza renale acuta e va evitata nei pazienti affetti da malattia renale cronica con elevati valori di creatinina ed azotemia [34]
- Osteonecrosi della mandibola: riscontrata specie nella somministrazione endovenosa di pamidronato e di acido zolendronico anche se sono stati registrati dei casi anche dopo l'assunzione di bisfosfonati per via orale. Nonostante l'incidenza di questo effetto collaterale sia molto bassa viene raccomandata una attenta pulizia orale ed una visita specialistica odontoiatrica prima di intraprendere la terapia nei pazienti con fattori di rischio concomitanti (cancro, chemioterapia, radioterapia, steroidoterapia)
- Fibrillazione atriale: anche se in percentuale molto bassa e non confermato in tutti gli studi sembrerebbe esserci un aumento nell'incidenza di fibrillazione atriale in pazienti che assumono bisfosfonati (soprattutto alendronato ed acido zolendronico)



### *Acido zoledronico*

L'acido zoledronico appartiene alla famiglia dei bisfosfonati contenenti nitrogeno ed agisce riducendo il riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti. Come altri bisfosfonati ha elevata affinità per l'osso mineralizzato e lega il calcio fosfato e l'idrossiapatite con preferenza per i siti ad elevato turnover osseo. Il target enzimatico dell'acido zoledronico è il farnesil pirofosfato sintetasi (FPP), un enzima che appartiene alla via del mevalonato. Il farmaco inibisce FPP provocando secondariamente inibizione del riassorbimento osteoclasto mediato e l'apoptosi degli osteoclasti.

Dopo la somministrazione per via endovenosa il farmaco si lega alle proteine plasmatiche; acido zoledronico non è metabolizzato e viene escreto intatto attraverso la via renale. Nel paziente con insufficienza renale lieve/moderata (clearance > 35 ml/min) il dosaggio non va ridotto ma se la clearance della creatina risulta < di 35 ml/min la somministrazione di tale farmaco non è raccomandata.

Nelle prime 24 ore l'escrezione renale è pari al 39%, il resto del farmaco si lega all'osso e viene rilasciato nella circolazione molto lentamente [37].

L'acido zoledronico nel trattamento delle ipercalcemie di natura neoplastica si è dimostrato in grado, in misura maggiore rispetto ad altri bisfosfonati (es: Pamidronato), di controllare l'ipercalcemia e di ridurre altre complicanze legate alle osteolisi tumorali, quali le fratture patologiche e la compressione midollare e anche di ridurre la frequenza di ricorso alla radioterapia ed alla chirurgia riparativa.

La sua efficacia nelle malattie neoplastiche ha stimolato altri studi con il risultato che tale farmaco, attualmente, viene somministrato anche nell'osteodistrofia pagetica e nell'osteoporosi post-menopausale.

Nell'osteoporosi il farmaco viene somministrato al dosaggio endovenoso di 5 mg ogni 12 mesi ed ha dimostrato un significativo aumento di densità minerale ossea (BMD) sia a carico del rachide lombare che del collo femorale [37].

## II. Scopo dello studio

Il nostro studio si pone due obbiettivi:

- Il primo è quello di valutare se esiste una correlazione tra i livelli ematici di vitamina D e l'insorgenza di una reazione di fase acuta in pazienti sottoposti a una prima infusione di acido zoledronico. Per questa valutazione saranno eseguiti:
  - un monitoraggio clinico di ogni paziente nei tre giorni successivi l'infusione, per rilevare l'eventuale comparsa di sintomi attribuibili alla reazione di fase acuta secondo la tabella 3.
  - L'esecuzione di alcuni esami biochimici tra cui emocromo e alcuni indici di flogosi (PCR, VES, fibrinogeno), prima e tre giorni dopo l'infusione e livelli ematici di 25-idrossivitamina D prima dell'infusione.
  
- Il secondo è quello di valutare, attraverso la tipizzazione linfocitaria eseguita prima e tre giorni dopo l'infusione, la presenza di eventuali variazioni significative delle popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie da correlare con i livelli di vitamina D e l'insorgenza o meno di reazione di fase acuta.

### III. Materiali e Metodi

#### 1. Soggetti

Lo studio è stato condotto su un gruppo di 10 pazienti valutati prima dell'inizio della terapia con un'infusione di acido zoledronico.

Questi pazienti necessitavano di un trattamento con amino-bifosfonati a causa delle seguenti patologie:

- **Paziente 1 (72 anni/sexo maschile):** importante osteoporosi secondaria a malassorbimento, conseguente a duodenocefalopancreasectomia effettuata per carcinoma pancreatico.
- **Paziente 2 (72 anni/sexo maschile):** morbo di Paget monostotico ad estensione limitata, ma in sede critica (cranio) con lesione parietale destra.
- **Paziente 3 (69 anni/sexo maschile):** mieloma multiplo con deterioramento delle condizioni generali e dolori ossei diffusi e frattura patologica dell'arco medio della III costa a destra.
- **Paziente 4 (86 anni/sexo femminile):** osteoporosi primitiva post-menopausale.
- **Paziente 5 (78 anni/sexo femminile):** carcinoma mammario con secondarismo ossei e fratture costali traumatiche.
- **Paziente 6 (81 anni/sexo femminile):** osteoporosi primitiva post-menopausale con crolli vertebrali multipli e presenza di vertebroplastica D11-D12.
- **Paziente 7 (72 anni/sexo femminile):** mieloma multiplo con crolli vertebrali multipli con vertebroplastica L3-L4; in anamnesi fibrillazione atriale in terapia con anticoagulante orale e ipertensione arteriosa.
- **Paziente 8 (37 anni/sexo maschile):** sarcoidosi in terapia steroidea, grave osteoporosi e crollo vertebrale della prima vertebra lombare.
- **Paziente 9 (80 anni/sexo femminile):** mieloma multiplo e dolori ossei diffusi
- **Paziente 10 (65 anni/sexo maschile):** neoplasia all'ipofaringe con metastasi ossee e polmonari

## 2. Disegno dello studio e indagini biochimiche

I soggetti sono stati sottoposti a un'infusione endovenosa della durata di 30 minuti di acido zoledronico: 4 mg, diluiti in 100 ml di soluzione salina sterile allo 0,9%.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti al tempo 0 (T0), prima dell'infusione, e al tempo 1 (T1), 72 ore dopo l'infusione, a prelievo di sangue venoso periferico per l'esecuzione di esame emocromocitometrico e dosaggio dei seguenti parametri biochimici: Emoglobina (g/dL), Leucociti ( $\times 10^3/uL$ ), Calcio (mg/dL), Fosforo (mg/dL), Albumina (g/dL), Velocità di Eritrosedimentazione (mm alla prima ora), Proteina C Reattiva (mg/L) e Fibrinogeno (mg/dL).

Sono stati analizzati al solo T0: 25-idrossivitamina D (nmol/L) e paratormone (pg/ml) nel siero.

Per ogni soggetto è stata registrata la temperatura corporea, ogni 8 ore, a partire dal tempo 0 fino al tempo 1 ed è stato inoltre richiesto di riferire l'eventuale comparsa di sintomi associabili a una reazione di fase acuta (APR: Acute Phase Response), come: affaticamento, dolori muscolari, febbre, disturbi gastrointestinali secondo le indicazioni riportati in tabella 3.

La presenza di reazione di fase acuta è stata identificata come positiva (APR+) in base all'aumento significativo di almeno 1 dei seguenti parametri biochimici: fibrinogeno, Proteina C Reattiva (PCR), Velocità di Eritrosedimentazione (VES) e/o alla presenza di 1 o più fra i sintomi di APR.

I livelli di 25-idrossivitamina D sono stati considerati come:

- **sufficienti:**  $>75\text{nmol/L}$  ( $>30\text{ ng/mL}$ ),
- **insufficienti:** tra 51 e 74 nmol/L (21-29 ng/mL),
- **carenti:**  $<50\text{ nmol/L}$  ( $<20\text{ ng/mL}$ ).

	<b>PRIMO GIORNO</b>	<b>SECONDO GIORNO</b>	<b>TERZO GIORNO</b>
<b>SINTOMI:</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Malessere generale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Febbre (temperatura)	<input type="checkbox"/> _____	<input type="checkbox"/> _____	<input type="checkbox"/> _____
Brividi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dolori ossei, muscolari	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>USO di FARMACI:</b>			
Tachipirina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Altro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Tabella 3: sintomi di APR rilevati nelle 3 giornate successive l'infusione di Acido Zolendronico.

### 3. Analisi citofluorimetriche

Una aliquota di sangue periferico è stata utilizzata per eseguire la tipizzazione linfocitaria per la determinazione delle percentuali e del numero assoluto delle principali popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie, compresi i linfociti T  $\gamma\delta$ , i linfociti T regolatori CD25++ e le cellule Natural Killer.

#### *Anticorpi monoclonali*

La possibilità di identificare le diverse popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie è da attribuire all'utilizzo di anticorpi monoclonali.

Questi anticorpi sono utilizzati per la marcatura di specifiche molecole di superficie dei linfociti, rendendo possibile la successiva analisi citofluorimetrica.

Essi sono stati utilizzati anticorpi monoclonali coniugati con quattro diversi fluorocromi: istiocianato di fluoresceina (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina associata a cianina 7 (PeCy7) e alloficocianina (APC).

Gli anticorpi coniugati ai fluorocromi e i relativi controlli isotipici (utilizzati per determinare il legame aspecifico) sono stati acquistati dalla Becton Dickinson Immunochemistry System (San José, CA, USA).

#### *Marcatura in immunofluorescenza e analisi multiparametrica al citofluorimetro*

La determinazione del fenotipo linfocitario è stata eseguita mediante acquisizione al citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson) dotato di software CELLQuest, seguendo il metodo standard su sangue intero.

Aliquote di 50-100 $\mu$ l di sangue intero periferico sono state distribuite in provette Falcon (Becton Dickinson) ed incubate con quantità saturanti di anticorpi monoclonali secondo lo schema di marcatura indicato dal pannello di colorazione (tabella 4).

	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PE-Cy7</b>	<b>APC</b>
<b>Provetta1</b>	CD14		CD45	
<b>Provetta2</b>	CD5	CD19		
<b>Provetta3</b>	$\gamma\delta$	CD16	CD3	CD8
<b>Provetta4</b>	CD4	CD25	CD3	CD8

Tabella 4: Pannello di colorazione nella tipizzazione linfocitaria.

L'incubazione è avvenuta alla temperatura di 4 °C per 20 minuti.

Successivamente sono stati aggiunti ad ogni provetta 2ml di Soluzione Lisante FACS (Becton Dickinson) allo scopo di lisare gli eritrociti. E' seguita un'ulteriore incubazione al buio e a temperatura ambiente per 10 minuti.

Le provette sono poi state centrifugate per 10 minuti a 1200 rpm.

Dopo aspirazione del sovrantante, il pellet di leucociti contenuto in ciascuna provetta è stato risospeso in 300 $\mu$ l di soluzione per l'analisi citofluorimetrica. Le provette sono state mantenute a freddo fino al momento dell'acquisizione.

### *Acquisizione citofluorimetrica*

Per ottenere le percentuali e i numeri assoluti delle diverse popolazioni linfocitarie, è stato determinato il numero totale dei linfociti per  $\mu$ L di sangue periferico mediante contaglobuli Coulter Counter.

Per ciascun campione sono stati acquisiti ed analizzati i dati relativi ad almeno 100.000 cellule vitali.

I linfociti sono stati identificati per:

1. caratteristiche fisiche dimensionali (FSC)
2. complessità intracellulare (SSC)

Partendo dal conteggio dei linfociti totali per  $\mu$ L di sangue fornito dal conta globuli e dal gate linfocitario, ottenuto utilizzando anticorpi monoclonali antiCD14 e antiCD45, le percentuali dei linfociti T totali (CD3+), delle sottopopolazioni T CD4+ e CD8+, dei linfociti B (CD19+), delle cellule Natural Killer (CD16+CD3-), dei linfociti T  $\gamma\delta$  hanno permesso di ottenere i rispettivi numeri assoluti.

All'interno della popolazione dei linfociti T CD4+ sono state analizzate le percentuali e i numeri assoluti dei linfociti T regolatori (CD4+ CD25++)

Nella popolazione dei linfociti T CD3+ sono state analizzate le percentuali e i numeri assoluti dei linfociti T doppi positivi CD4+CD8+ e dei linfociti T doppi negativi CD4-CD8-.

### *Analisi statistica*

Le valutazioni eseguite nei pazienti al TO (prima della somministrazione di acido zoledronico) sono state analizzate in maniera descrittiva. Le caratteristiche demografiche, i parametri biochimici e i numeri assoluti dei leucociti e delle sottopopolazioni leucocitarie e linfocitarie sono stati confrontati nei pazienti APR+ e APR-, utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney U. Per l'analisi statistica dei numeri assoluti dei leucociti e delle sottopopolazioni leucocitarie e linfocitarie valutate in ciascun soggetto prima e dopo l'infusione di acido zoledronico è stato utilizzato il test non parametrico di Wilcoxon per dati appaiati. I test sono stati eseguiti con i programmi StatView e SPSS e sono stati considerati significanti valori della  $p$  inferiori a 0,05.



## IV. Risultati

### 1. Osservazioni cliniche e bioumorali

Per stabilire se i pazienti abbiano presentato o meno la reazione di fase acuta (APR) sono stati presi in considerazione sia la comparsa di sintomi post-infusione sia eventuali variazioni degli indici biochimici (VES, fibrinogeno, PCR). Nella nostra casistica abbiamo osservato in 6 pazienti su 10 (60%) la comparsa di reazione di fase acuta (APR+) [tabella 4]. Tra questi quasi tutti (5/6), hanno mostrato sia comparsa di sintomi clinici che aumento di almeno uno degli indici bioumorali (VES, fibrinogeno, PCR), mentre solamente un soggetto ha riferito sintomi senza tuttavia il riscontro di alterazioni degli indici bioumorali.

PAZIENTE	STATO		INDICI	
	VITAMINICO	SINTOMI	BIOUMORALI	APR
1	CARENTE	SI	AUMENTATI	APR +
2	SUFFICIENTE	NO	NON AUMENTATI	APR -
3	SUFFICIENTE	NO	NON AUMENTATI	APR -
4	INSUFFICIENTE	SI	AUMENTATI	APR +
5	CARENTE	SI	AUMENTATI	APR +
6	INSUFFICIENTE	NO	NON AUMENTATI	APR -
7	SUFFICIENTE	NO	NON AUMENTATI	APR -
8	SUFFICIENTE	SI	NON AUMENTATI	APR +
9	CARENTE	SI	AUMENTATI	APR +
10	CARENTE	SI	AUMENTATI	APR +

Tabella 4: classificazione dei pazienti in base alla reazione di fase acuta e correlazione con i livelli di vitamina D.

Quattro pazienti su dieci (40%) non hanno presentato né sintomi né variazioni ematochimiche e sono stati pertanto considerati come APR-.

I pazienti sono stati classificati anche in base ai valori sierici di 25 OH vit D, sulla base dei criteri indicati nei Materiali e Metodi: 4/10 pazienti hanno mostrato livelli sufficienti, 2/10 livelli insufficienti e 4/10 si sono dimostrato carenti

Successivamente i livelli di vitamina D al tempo 0 sono stati correlati con la presenza/assenza di APR [tabella 4].

Tra i pazienti APR+ abbiamo riscontrato che solamente 1 su 6 (17%) presentava livelli sufficienti di vitamina D, 1/6 (17%) aveva livelli insufficienti e 4/6 (66%) presentavano livelli carenti di vitamina D [figura 9].

Tra i pazienti APR-, 3/4 (75%) avevano livelli sufficienti di 25 OH vitamina D, mentre solamente 1/4 (25%) presentava livelli insufficienti [figura 9].

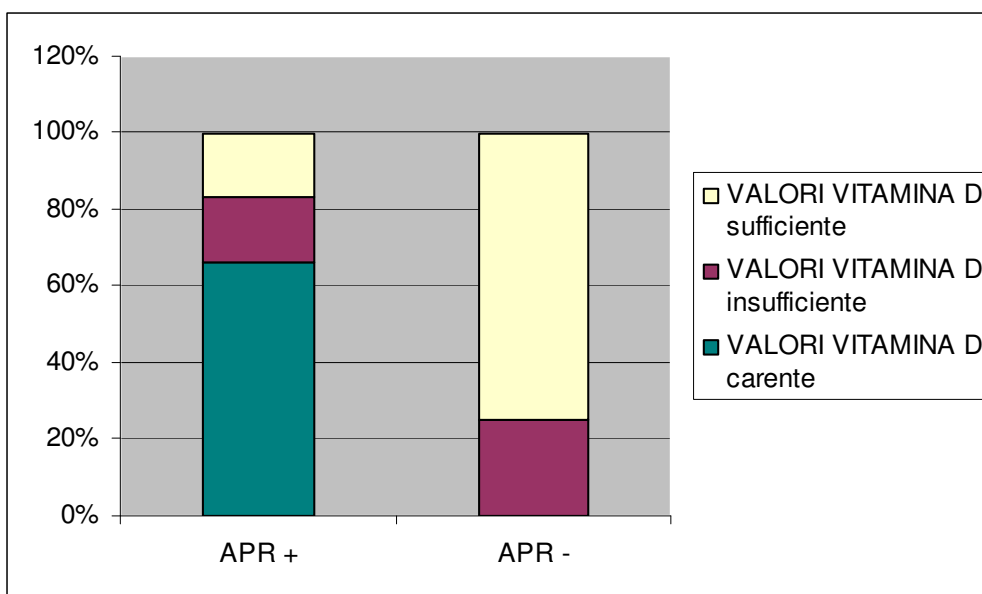


Figura 9: distribuzione percentuale dei pazienti con vitamina D sufficiente, insufficiente o carente tra i pazienti APR+ e i pazienti APR-.

In figura 10, è riassunta la prevalenza di APR osservata nella nostra casistica in base ai livelli di vitamina D.

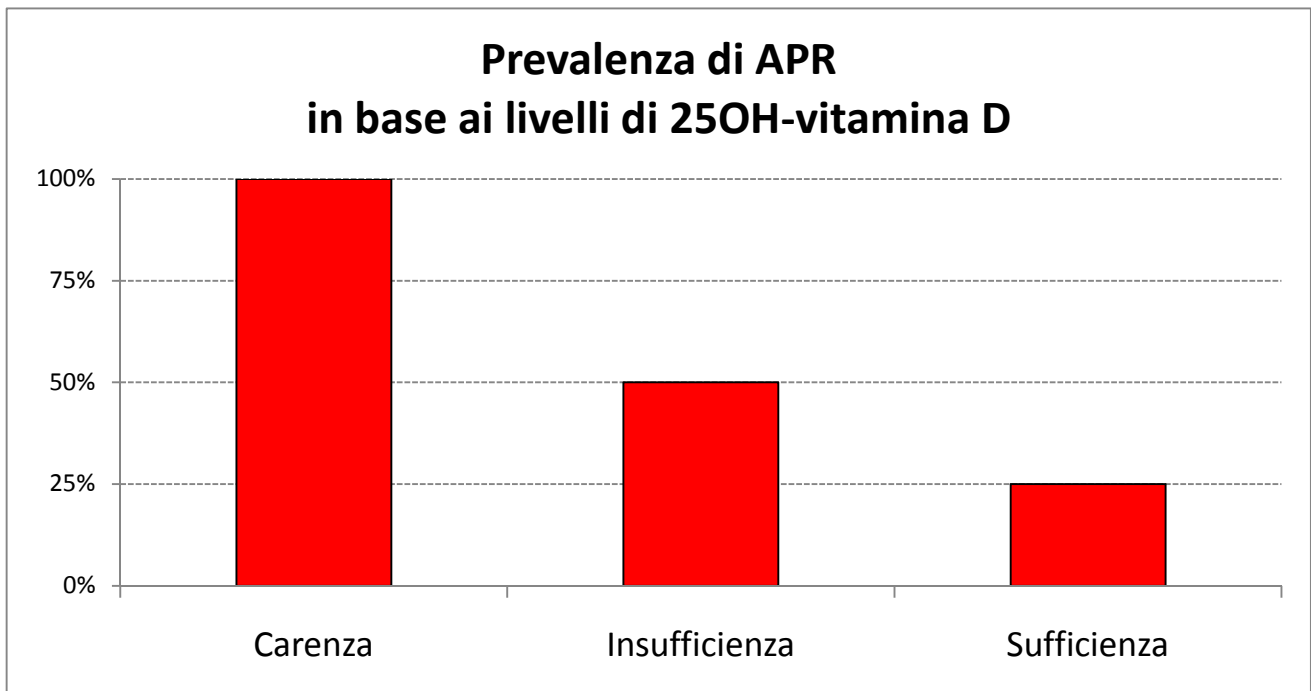


Figura 10: prevalenza di APR in base ai livelli sierici di vitamina D nei pazienti dello studio.

Complessivamente il nostro studio, pur riferito ad una casistica limitata ed eterogenea, mostra una correlazione inversa tra livelli sierici di 25 OH vitamina D e comparsa di reazione di fase acuta indicando un maggior rischio di incidenza di APR nei soggetti con stato vitaminico carente e/o insufficiente rispetto ai soggetti che presentano valori sufficienti.

## 2. Analisi citofluorimetrica

Per ogni paziente sono stati valutati prima della somministrazione di acido zoledronico (T0) e dopo bifosfonato (T1), mediante tipizzazione linfocitaria e successiva analisi citofluorimetrica, i valori sia percentuali (non mostrati) che in numero assoluto dei leucociti, dei monociti, dei linfociti totali e delle sottopopolazioni linfocitarie: linfociti T CD3+, T CD4+, T CD8+, T  $\gamma\delta$ , T regolatori CD4+CD25++, linfociti B CD19+ e le cellule Natural Killer CD16+CD3-.

La tabella 5 mostra nei due gruppi di pazienti, suddivisi in APR+ e APR-, mediane e range dei valori assoluti delle popolazioni leucocitarie e linfocitarie analizzate al tempo T0. Allo scopo di evidenziare eventuali differenze nella distribuzione di tali popolazioni fra i due gruppi di pazienti (APR+ e APR-) è stata eseguita analisi statistica mediante test non parametrico di Mann-Whitney U. Il confronto non ha mostrato differenze statisticamente significative per nessuna delle sottopopolazioni analizzate non evidenziando nella nostra casistica alcuna correlazione specifica fra occorrenza di reazione di fase acuta e distribuzione delle varie popolazioni linfocitarie.

Nella stessa tabella sono confrontati anche i valori al tempo T0 di vitamina D, PTH e calcemia tra i pazienti APR+ e APR-. Si evidenzia nuovamente una differenza statisticamente significativa della concentrazione sierica di vitamina D tra i pazienti APR+ ed i pazienti APR-.

	APR+		APR-		P
	mediana	range	mediana	range	
Età (anni)	75	(37-86)	72	(69-81)	NS
250H D	36	73	98	111	0,05
PTH	35	174	55	124	NS
Calcemia	10,3	5,5	9,1	2	NS
Globuli bianchi *	7885	3468	6200	3880	NS
Linfociti *	1420	1570	1510	2576	NS
Monociti *	780	2100	550	350	NS
CD3+ *	1066	1141	1114	1396	NS
CD4+ *	815	858	754	766	NS
CD8+ *	284	427	288	571	NS
CD19+ *	90	228	195	335	NS
CD4/CD8 *	1,8	9,8	3	4,4	NS
NK *	182	242	155	868	NS
$\gamma\delta$ *	41	54	60	101	NS
CD25++ *	60	100	65	94	NS

Tabella 5: caratteristiche demografiche, biumorali e numeri assoluti delle popolazioni leucocitarie e linfocitarie nei soggetti studiati suddivisi in APR+ e APR -.

(\*i valori sono espressi come numero di cellule/ $\mu$ L).

Successivamente sono state prese in considerazione le variazioni dei numeri assoluti delle popolazioni leucocitarie e linfocitarie valutati mediante l'immunofenotipo eseguito sia al tempo T0 che T1 per ciascun paziente di entrambi i gruppi (APR+ e APR-). [Tabella 6].

	APR +			APR -		
	T0	T1	P	T0	T1	P
Globuli bianchi*	7885	6700	NS	6200	7100	NS
Linfociti*	1420	1480	NS	1510	1640	NS
Monociti*	780	705	NS	550	520	NS
CD3+*	1066	1033	NS	1114	1169	NS
CD4+*	815	707	NS	754	795	NS
CD8+*	284	227	0,027	288	273	NS
CD19+*	90	82	NS	195	174	NS
CD4/CD8*	1,8	2,1	NS	3	3,4	NS
NK*	182	158	NS	155	207	0,06
$\gamma\delta$ *	41	30	0,046	60	53	NS
CD25++*	60	49	NS	65	64	NS

Tabella 6: numeri assoluti delle popolazioni leucocitarie e linfocitarie nei soggetti studiati suddivisi in APR+ e APR – valutate al tempo T0 (preinfusione) e T1 (post infusione).

(\*i valori sono espressi come numero di cellule/ $\mu$ L).

Dopo somministrazione di acido zoledronico (T1), nel gruppo dei pazienti APR+ è stata osservata in tutti i pazienti (6/6) una diminuzione statisticamente significativa del numero assoluto dei linfociti T CD8+ ( $p= 0,027$ ), con una riduzione percentuale intorno al 25%. Analogamente in 5 su 6 pazienti APR+ è stata osservata una diminuzione statisticamente significativa ( $p= 0,046$ ) del numero assoluto dei linfociti  $\gamma\delta$  circolanti, con una riduzione percentuale intorno al 14%.

Tali variazioni non sono state osservate nel gruppo dei pazienti APR-. In questo secondo gruppo di pazienti è stato invece osservato in tutti i pazienti (4/4) un trend in aumento per il numero assoluto dei linfociti NK con  $p$  vicina alla soglia di significatività ( $p= 0,06$ ). La variazione percentuale del numero assoluto dei linfociti NK è risultata intorno al 26%.

Le figure 11 e 12 mostrano esempi rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica rispettivamente di un paziente APR+ (soggetto numero 8), dove è possibile osservare tra il T0 e il T1 un calo del numero assoluto dei linfociti CD8+,  $\gamma\delta$  e linfociti NK e un paziente APR- (soggetto numero 7), in cui è possibile notare che il numero assoluto dei linfociti CD8+ e dei  $\gamma\delta$  rimangono sostanzialmente immutati mentre il numero assoluto dei linfociti NK aumenta.

Complessivamente i risultati dell'analisi immunofenotipica condotta nei pazienti prima e dopo somministrazione di acido zoledronico suggeriscono il verificarsi di variazioni del numero assoluto di specifiche popolazioni linfocitarie in presenza o meno di reazione di fase acuta.

# Paziente N.8 (APR+)

T0 (preinfusione)

T1 (post infusione)

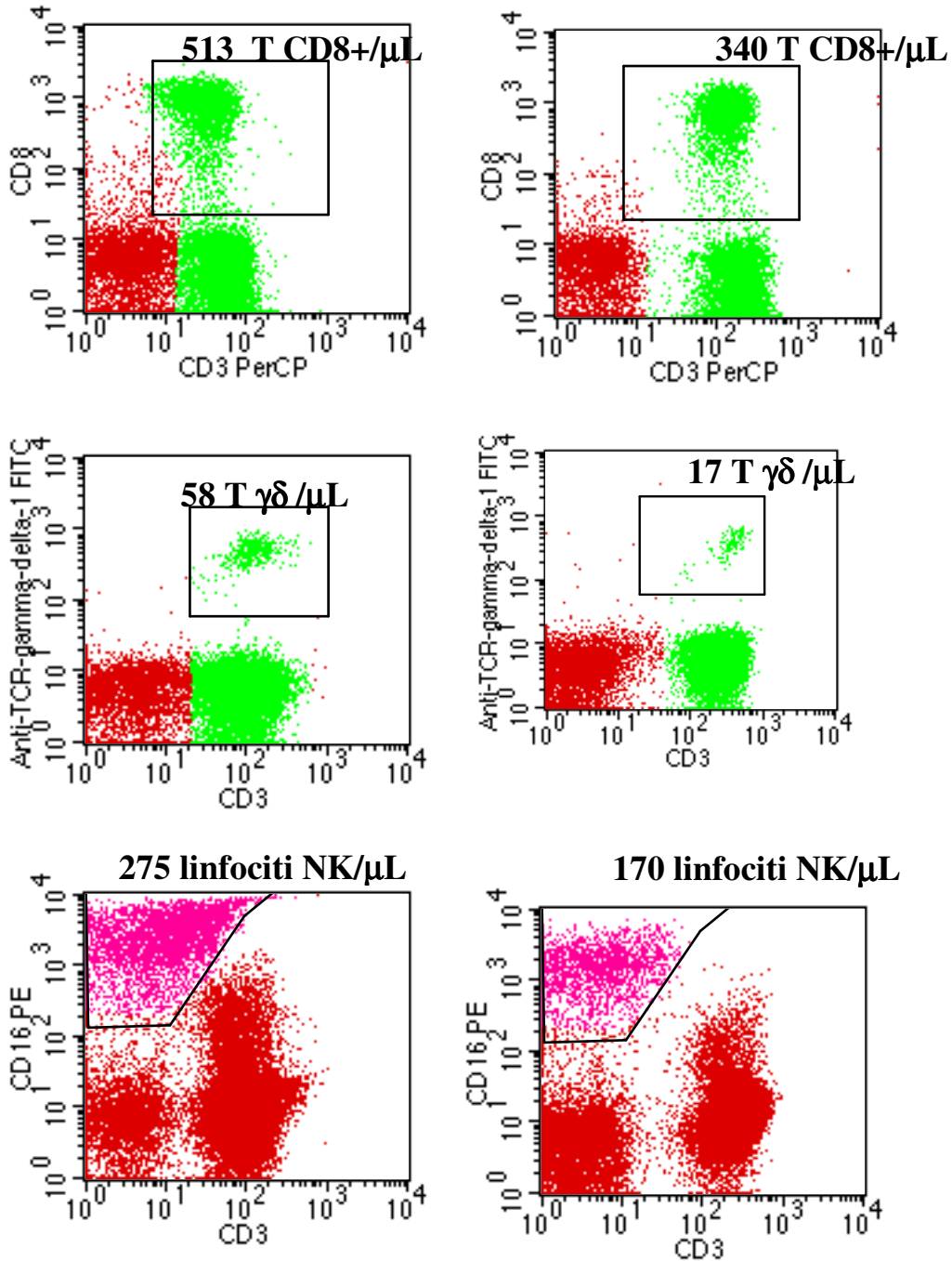


Figura 10: esempi rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica di un paziente APR+.



# Paziente N.7 (APR-)

T0 (preinfusione)

T1 (post infusione)

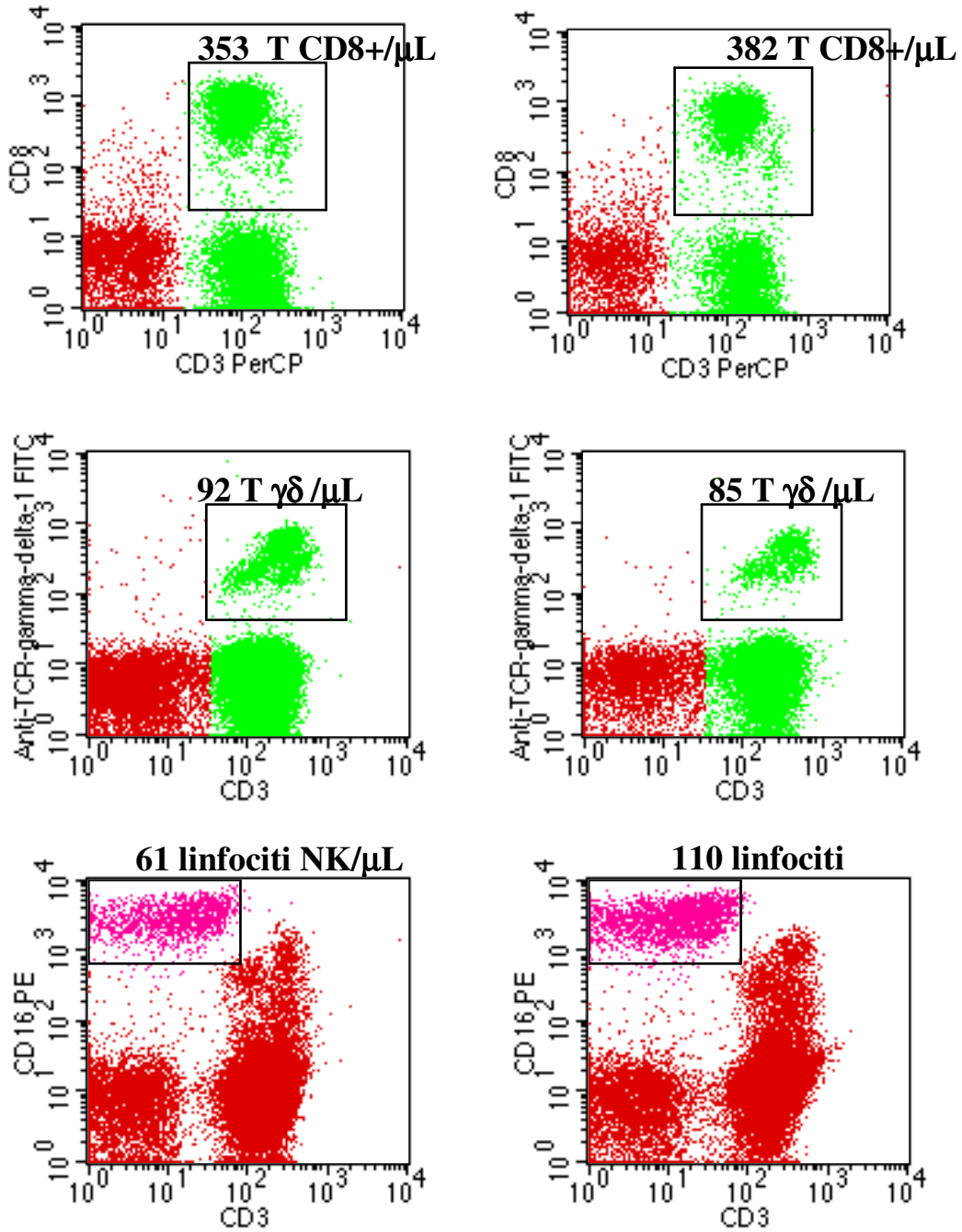


Figura 11: esempi rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica di un paziente APR-.

## V. Discussione

Negli ultimi anni si sono intensificati gli studi sugli effetti “non classici”, cioè extraossei, della vitamina D con particolare riguardo agli effetti sul sistema immunitario.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di indagare la correlazione tra livelli ematici di vitamina D e l'insorgenza di reazione di fase acuta (APR) che viene descritta come l'effetto collaterale più rilevante dovuto alla somministrazione endovenosa dei bisfosfonati. Per tale motivo in un gruppo di dieci pazienti che per patologie differenti hanno necessitato somministrazione di acido zoledronico, abbiamo correlato i livelli ematici di vitamina D con la comparsa o meno di APR identificata come positiva (APR+) in base all'aumento significativo di almeno 1 dei seguenti parametri biochimici: fibrinogeno, Proteina C Reattiva (PCR), Velocità di Eritrosedimentazione (VES) e/o alla presenza di 1 o più fra i sintomi classici di APR. Inoltre ci siamo proposti di valutare attraverso la tipizzazione linfocitaria, eseguita prima e tre giorni dopo l'infusione di acido zoledronico, la presenza di eventuali variazioni delle popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie correlabili con l'eventuale comparsa di APR e i livelli di vitamina D.

Nella nostra casistica abbiamo osservato un'evidente associazione tra livelli sierici di 25 OH vitamina D e comparsa di reazione di fase acuta con una maggiore occorrenza di APR nei soggetti con stato vitaminico carente e/o insufficiente rispetto ai soggetti che presentano valori sufficienti della vitamina. Questo risultato è in accordo con i dati di uno studio precedente [38] condotto su 90 donne osteoporotiche, in cui si evidenziava una correlazione inversa e dose dipendente tra i livelli di 25-idrossivitamina D e l'insorgenza di APR (espressa sia in termini di sintomatologia, che di rialzo dei livelli di PCR) successivamente alla prima infusione di acido zoledronico. Un altro recente studio [39] ha confermato questi risultati in una casistica di bambini sottoposti a terapia con acido zoledronico per osteoporosi associata a disturbi metabolici infantili.

Complessivamente emergono forti evidenze che indicano come bassi livelli sierici di 25 OH vitamina D rappresentino, in tutti i contesti clinici osservati, un importante fattore di rischio per comparsa di APR.

In generale la vitamina D agisce sul sistema immunitario inibendo la produzione di citochine fondamentali per innescare la risposta da parte dei macrofagi (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12) e delle cellule NK (IL-12, IL-2, INF- $\gamma$ ), la proliferazione di cellule antigene specifiche (IL-2) e la

differenziazione dei linfociti Th CD4+ naive in linfociti Th1 (IL-12, INF- $\gamma$ ). La vitamina D esplica inoltre un effetto stimolatorio sulla produzione di citochine che inibiscono la risposta dell'ospite (IL-10, IL-4) e di altre che favoriscono la differenziazione dei linfociti Th CD4+ naive in linfociti Th2 (IL-4, IL-5).

La vitamina D ha infine un effetto inibitorio sulla produzione di citochine come TNF- $\alpha$ , IL-6, la cui concentrazione aumenta in corso di APR e che sono note per avere un effetto diretto sulla stimolazione della produzione di proteine di fase acuta da parte del fegato.

Sulla base di questi effetti modulatori della vitamina D non sorprende che livelli sufficienti di vitamina D siano in grado di controllare una reazione immunitaria conseguente a una prima infusione di acido zoledronico limitando variazioni in percentuale e in numero assoluto di popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie e l'aumento di proteine di fase acuta, prodotte dal fegato secondariamente alla stimolazione da parte di TNF- $\alpha$  e IL-6.

Se questi risultati fossero confermati in una casistica più ampia si potrebbe pensare di raggiungere livelli sufficienti (> di 75 nmol/L) di 25-idrossivitamina D attraverso una supplementazione con colecalciferolo, prima di iniziare la terapia con acido zoledronico, allo scopo di prevenire l'insorgenza di APR.

Nel nostro studio, attraverso la tipizzazione linfocitaria eseguita in tutti i pazienti prima dell'infusione di bisfosfonato (T0), è stato possibile valutare i numeri assoluti dei leucociti e delle sottopopolazioni linfocitarie (numero assoluto dei leucociti, dei monociti, dei linfociti totali e delle sottopopolazioni linfocitarie: linfociti T CD3+, T CD4+, T CD8+, T  $\gamma\delta$ , T regolatori CD4+CD25++, linfociti B CD19+ e linfociti Natural Killer CD16+CD3-) e correlarli con la comparsa o meno di APR.

Prima dell'infusione con acido zoledronico non erano presenti differenze significative nella distribuzione delle popolazioni linfocitarie nei pazienti APR+ e APR-. Confrontando tuttavia, i valori al tempo T0 con quelli registrati dopo tre giorni (T1), abbiamo osservato che l'infusione ha indotto variazioni di specifiche popolazioni linfocitarie nei due gruppi di pazienti. In particolare nel gruppo dei pazienti APR + è stata osservata una diminuzione statisticamente significativa del numero assoluto dei linfociti  $\gamma\delta$  e dei linfociti T CD8+ circolanti.

I meccanismi generali che sottendono il verificarsi di reazione di fase acuta sono tuttora sconosciuti. Studi recenti in vitro hanno suggerito che la reazione di fase acuta osservata dopo somministrazione di bifosfonati (in particolare di acido zoledronico) sia mediata da un'aumentata produzione di citochine proinfiammatorie (TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ ) da parte dei linfociti T

$\gamma\delta$  [40,41,42] e in particolare dal subset di  $\gamma\delta$  a funzione effettrice  $V\gamma9V\delta2$ , conseguente all'accumulo di IPP (isopentenil-pirofosfato) e di DMPP(dimetilallil-pirofosfato).

Nel nostro studio pur non avendo identificato tale subset, ma i linfociti T  $\gamma\delta$  totali circolanti, abbiamo osservato una significativa diminuzione dei  $\gamma\delta$  solo nei pazienti con APR+ e non nei pazienti con APR-. Tale risultato può indicare che la cascata di citochine proinfiammatorie innescata dai linfociti  $\gamma\delta$ , nei pazienti APR+, promuova un'attivazione con conseguente extravasazione e migrazione dei linfociti attivati nei tessuti linfonodali periferici. Il calo parallelo del numero assoluto dei linfociti CD8+ circolanti, che analogamente ai  $\gamma\delta$  abbiamo osservato nel nostro studio solo nei pazienti APR+, confermerebbe questa ipotesi di attivazione cellulare di specifiche sottopopolazioni T linfocitarie e conseguente extravasazione.

Il calo dei linfociti  $\gamma\delta$  circolanti da noi osservato è in accordo con altri due studi precedenti [43,44] che hanno descritto, nella post somministrazione di acido zoledronico, una riduzione dei  $V\gamma9V\delta2$  sia in donne in post-menopausa che in bambini con disturbi metabolici associati ad osteoporosi.

Al contrario uno studio [45] in soggetti affetti da mieloma multiplo ha descritto un aumento dei livelli circolanti dei linfociti  $V\gamma9V\delta2$  per oltre 4 settimane dopo l'infusione di bifosfonati (Alendronato, Ibandronato e Pamidronato). Questa discrepanza potrebbe essere giustificata sia dal differente bisfosfonato utilizzato sia da una diversa reattività dei linfociti  $V\gamma9V\delta2$  tra pazienti neoplastici e non.

Nel nostro studio le variazioni linfocitarie osservate nei pazienti APR+ non sono state osservate nel gruppo dei pazienti APR- dove è stato invece evidenziato un trend in aumento per il numero assoluto dei linfociti NK dopo infusione di bisfosfonato. Per quanto riguarda questo dato, la maggior parte degli studi si è soffermata sull'aumento della funzionalità e non sul numero assoluto delle cellule NK post somministrazione di acido zoledronico [46]. Pertanto, al momento attuale, è difficile ipotizzare cause sottostanti tale aumento che comunque sembrerebbe essere protettivo riguardo l'insorgenza di reazione di fase acuta.

In conclusione questo studio conferma ulteriormente i pleiotropici effetti che la vitamina D esplica sul sistema immunitario ed in particolare mostra la stretta relazione tra vitamina D, amino-bifosfonati e sistema immunitario e mette in luce una delle possibili implicazioni cliniche dell'ormai sempre più frequente carenza di 25-idrossivitamina D riscontrabile nella popolazione generale.

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets, *J Clin Invest*, 2006; 116:2062-72.
- 2- DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D, *Am. J. Clinical Nutrition*, 2004; 80(6):1689S-96S.
- 3- Petta S, Cammà C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A. Low vitamin serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C, *Hepatology*, 2010; 51:1158-67.
- 4- Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease, *New England J Med*, 1989; 320:981-91.
- 5- Tavera-Mendoza, Luz E, White, John H. Cell Defenses and the Sunshine Vitamin, *Scientific American*, 2007; 297(5):62-72.
- 6- Miller J, Gallo RL. Vitamin D and innate immunity, *Dermatol. Therapy*, 2010; 23:13-22.
- 7- Bikle DD. Vitamin D and Immune Function: Understanding Common Pathways, *Current Osteoporosis Reports*, 2009; 7:58-63.
- 8- Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C and Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system, *Curr Opin Pharmacol*, 2010;10:1-15.
- 9- McAlindon TE, Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Aliabadi P, Weissman B. Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham study, *Ann Intern Med*, 1996; 125:353-9.
- 10- Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis, *Am J Clin Nutr*, 2004; 79:362-71.
- 11- Li Y, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu S, Cao LP. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a negative endocrine regulator of the rennin-angiotensin system, *J Clin Invest*, 200; 110:229-38.
- 12- Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity, *J Mol Med*, 2010; 88(5):441-50.
- 13- Adorini L, Giarratana L, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells, *Seminars in Immunology*, 2004; 16:127-134.
- 14- Romagnoli E, Caravella P, Scarnecchia L, Martinez P, Minisola S. Hypovitaminosis D in an Italian population of healthy subjects and hospitalized patients, *Br J Nutr*, 1999; 81(2):133-37.
- 15- Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage, *Nature Rev. Immunol*, 2008; 8:685-697.

- 16-Hewinson M. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity, *Mol Cell Endocrinol*, 2010; 321(2):103-11.
- 17-Kuo YT, Kuo CH, Lam KP, Chu YT, Wang WL, Huang CH and Hung CH. Effects of Vitamin D3 on Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Chemokines by Monocytes, *Journal of Food Science*, 2010; 75:H200–H204.
- 18-Dickie LJ, Church LD, Coulthard LR, Mathews RJ, Emery P, McDermott MF. Vitamin D3 down-regulates intracellular Toll-like receptor 9 expression and Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes, *Rheumatology (Oxford)*, 2010; 49(8):1466-71.
- 19-Kaneno R, Duarte AJ, Borelli A. Natural killer activity in the experimental privational rickets, *Immunol Lett*, 2002; 81(3):183-9.
- 20-Balogh G, de Boland AR, Boland R, Barja P. Effect of 1,25(OH)(2)-vitamin D(3) on the activation of natural killer cells: role of protein kinase C and extracellular calcium, *Exp Mol Pathol*, 1999; 67(2):63-74.
- 21-Leung KH. Inhibition of Human Natural Killer Cell and Lymphokine-Activated Killer Cell Cytotoxicity and Differentiation by Vitamin D3, *Scand J Immunol*, 1989; 30:199-208.
- 22-Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LS, Lammas DA, Raza K, Sansom DM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3, *J Immunol*, 2009; 183(9):5457-5467.
- 23-Chen L, Cencioni MT, Angelini DF, Borsellino G, Battistini L, Brosnan CF. Transcriptional profiling of gamma delta T cells identifies a role for vitamin D in the immunoregulation of the V gamma 9V delta 2 response to phosphate-containing ligands, *J Immunol*, 2005; 174(10):6144-52.
- 24-Stresing V, Daubin  F, Benzaid I, Monkkonen H, Cl zardin P. Bisphosphonates in cancer therapy, *Cancer Letters*, 2007; 257:16–35.
- 25-Chlebowski RT, Johnson KC, Kooperberg C, Pettinger M, Wactawski-Wende J, Rohan T, Rossouw J, Lane D, Sullivan MJO, S Yasmeeen, Hiatt RA, Shikany JM, Vitolins M, Janu Khandekar J, Hubbell FA. Calcium Plus Vitamin D Supplementation and the Risk of Breast Cancer, *J Natl Cancer Inst*, 2007; 100:1581-1591.
- 26-Garland CF, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB and Holick MF. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention, *Am J Public Health*, 2006; 96:252–261.

- 27-McCullough LM. Correlates of Circulating 25-Hydroxyvitamin D, *Am J of Epidemiol*, 2010; 172(1):21-35.
- 28-Holick MF et al. Vitamin D Deficiency, *N Engl J Med*, 2007, 357: 266-81.
- 29-Isaia G, Giorgino R, Rini GB, Bevilacqua M, Maugeri D, Adami S. Prevalence of hypovitaminosis D in elderly women in Italy: clinical consequences and risk factors, *Osteoporos Int*, 2003; 14(7):577-82.
- 30-Holick MF, Chen TC, Lu Z, Sauter E. Vitamin D and Skin Physiology: A D-Lightful Story, *J Bone Miner Res*, 2007, Volume 22(2): V28-33.
- 31-Kremer R, Campbell PP, Reinhardt T, Gilsanz V. Vitamin D status and its relationship to body fat, final height, and peak bone mass in young women, *J Clin Endocrinol Metab*, 2009; 94(1):67-73.
- 32-Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity, *Am J Clin Nutr*, 2000; 72(3): 690-3.
- 33-Sergeev IN. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces Ca<sup>2+</sup>-mediated apoptosis in adipocytes via activation of calpain and caspase-12, *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 19, 384(1):18-21.
- 34-Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, *Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11<sup>th</sup> Edition, Mac Graw-Hill, 2006, Pages 1666-1668.
- 35-Rossini M, Adami S, Viapiana O, Ortolani R, Vella A, Fracassi E, Gatti D. Circulating  $\gamma\delta$  T cells and the risk of acute-phase response after zoledronic acid administration, *J bone Min Res*, vol 27, 2012; (1):227-30.
- 36-McCullough LM et al. Correlates of Circulating 25-Hydroxyvitamin D, *Am J of Epidemiol*, 2010; 172(1):21-35.
- 37-Rakel A, Boucher A, Ste-Marie LG. Role of zoledronic acid in prevention and treatment of osteoporosis, *Clin Inv Aging*, 2011; (6):89-99.
- 38-Bertoldo F, Pancheri S, Zenari S. Serum 25-Hydroxyvitamin D levels modulate the acute-phase response associated with the first nitroen-containing 25-Hydroxyvitamin D, *J Bone Min Res*, 2010; (25):447-54.
- 39-Srivastava T, Dai H, Haney CJ, Alon US. Serum 25-hydroxyvitamin D level and acute-phase-reaction following initial intravenous bisphosphonate, *J bone Min Res*, vol 26, 2011; (2):437-38.
- 40-Thompson K, Rogers MJ. Statins prevent bisphosphonate-induced gamma,delta-T-cell proliferation and activation in vitro. *J Bone Miner Res*. 2004 Feb;19(2):278-88.

- 41-Hewitt RE, Lissina A, Green AE, Slay ES, Price DA, Sewell AK. The bisphosphonate acute phase response: rapid and copious production of proinflammatory cytokines by peripheral blood gd T cells in response to aminobisphosphonates is inhibited by statins. *Clin Exp Immunol*. 2005;139(1):101-11.
- 42-Dieli F, Gebbia N, Poccia F, Caccamo N, Montesano C, Fulfaro F, Arcara C, Valerio MR, Meraviglia S, Di Sano C, Sireci G, Salerno A. Induction of gammadelta T-lymphocyte effector functions by bisphosphonate zoledronic acid in cancer patients in vivo. *Blood*. 2003 Sep 15;102(6):2310-1.
- 43-Thompson K, Keech F, McLernon DJ, Vinod K, May RJ, Simpson WG, Rogers MJ, Reid DM. Fluvastatin does not prevent the acute-phase response to intravenous zoledronic acid in post-menopausal women, *Bone*, 2011 (49): 140-45.
- 44- Srivastava T, Haney CJ, Alon US. Atorvastatin may have no effect on acute phase reaction in children after intravenous 25-Hydroxyvitamin D, *J Bone Min Res*, 2009 (24): 334-37.
- 45- Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weibinger F, Tony HP, Wilhelm M. Stimulation of gd T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple mieloma, *Blood*, 2000 (96): 384-92
- 46-Pecherstorfer M, Jilch R, Sauty A, Horn E, Keck AV, Zimmer-Roth I, Thiebaud D, Effect of first treatment with aminobisphosphonates pamidronate and ibandronate on circulating lymphocyte subpopulations, *J Bone Miner Res*, 2000 Jan, 15(1):147-54.