

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E
SPERIMENTALE**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE**

Ciclo XXII (Anni 2006-2009)

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

Tesi di Dottorato

**TURNOVER OSSEO E SISTEMA BIOLOGICO
RANKL/OSTEOPROTEGERINA NELL'OSTEOMALACIA
ONCOGENICA: STUDIO LONGITUDINALE DI 5 CASI**

Relatore

Candidato

Ch.mo Prof.

Dr.

Pasquale Strazzullo

Domenico Rendina

Anno Accademico 2008-2009

Indice

Introduzione	pag. 4
Il fosforo	pag. 6
Il paratormone	pag. 8
Il sistema vitamina D/VDR	pag. 8
Il fibroblast growth factor 23	pag. 9
Il sistema RANK/RANKL/Osteoprotegerina	pag. 11
L'isoenzima osseo della fosfatasi alcalina	pag. 12
L'idrossiprolina	pag. 13
Il telopeptide C-terminale del collagene di tipo I	pag. 13
La catepsina K	pag. 14
Obiettivi dello studio	pag. 16
Pazienti e Metodi	pag. 17
Protocollo di studio	pag. 17
Saggi biochimici	pag. 19
Determinazione della densità minerale ossea e delle fratture	pag. 20
Determinazione del dolore muscolo-scheletrico e della debolezza muscolare	pag. 20
Analisi genetiche	pag. 21
Analisi statistica	pag. 22
Risultati	pag. 24
Valutazione al tempo 0	pag. 24
Valutazione longitudinale	pag. 25

Discussione e Conclusioni	pag. 28
Bibliografia	pag. 32
Tabelle e Figure	pag. 40

Introduzione

L'osteomalacia oncogenica (TIO - Tumor Induced Osteomalacia) è una rara patologia paraneoplastica nella quale il tumore causale, in genere di origine mesenchimale, produce un fattore circolante che è in grado di determinare un quadro clinico di osteomalacia o rachitismo vitamina D – resistente [1-3].

Nella letteratura scientifica internazionale sono descritti al momento circa trecento casi di TIO [1-9]. Sebbene possa insorgere a qualunque età, oltre la metà dei soggetti affetti da TIO ha un'età superiore ai 60 anni [1-9].

Il *primum movens* patogenetico della sindrome è la produzione, da parte della neoplasia, di un fattore fosfaturico che agisce a livello del tubulo renale determinando una riduzione del riassorbimento tubulare di fosfati con conseguente perdita renale di fosfati (renal phosphate leak) [1-9]. Il primo fattore fosfaturico ad essere identificato è stato il Fibroblast Growth Factor 23 (FGF 23), al quale si sono successivamente aggiunti il Fibroblast Growth Factor 7 (FGF7), la Secreted Frizzled Related Protein (sFRP4), la Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE): queste proteine nel loro insieme sono state definite fosfatone [3, 10, 11]. Altre condizioni cliniche associate a perdita renale di fosfati sono alcune rare sindromi genetiche come il rachitismo ipofosforemico X-linked (XLH), rachitismo ipofosforemico autosomico dominante (ADHR) e l'ipofosforemia associata ad ipercalciuria (HHRH) [5]. Una condizione di perdita renale di fosfati si riscontra tuttavia anche in circa un quinto dei pazienti affetti da nefrolitiasi recidivante e un ventesimo dei soggetti affetti da osteoporosi postmenopausale [9, 12, 13].

A livello biochimico l'alterazione patognomonica della TIO è l'ipofosforemia (livelli serici di fosfati inferiori a 0.80 mmol/L o 2.5 mg/dl in età adulta), associata a normali livelli circolanti di calcio, paratormone (PTH), magnesio, 25OHD₃ e 1,25(OH)₂D₃ [1-5].

A livello osseo, si osserva un'aumentata deposizione di matrice ossea non sufficientemente mineralizzata ed una riduzione della resistenza al carico meccanico [1-5, 14].

Clinicamente i soggetti affetti da TIO presentano dolore muscolo-scheletrico, astenia marcata ed aumentata incidenza di fratture. In età evolutiva, l'impatto dell'ipofosforemia sull'accrescimento delle cartilagini epifisarie determina la comparsa di deformità ossee e causa una compromissione staturale [1-5].

Sebbene la TIO sia stata descritta in associazione a differenti istotipi tumorali, la maggior parte dei tumori causali la TIO è di origine mesenchimale (angioma sclerosante, emangiopericitoma, angiofibroma benigno e maligno, condrosarcoma, tumore osseo a cellule giganti). Per la capacità comune di indurre una fosfaturia patologica, l'insieme di questi tumori viene classificato con la denominazione di PMTMCT (Phosphaturic Mesenchimal Tumor Mixed Connective Tissue variant) [1, 2, 5, 6]. Si tratta generalmente di tumori a lenta crescita, poco invasivi e di piccole dimensioni. Nella maggioranza dei casi, il tumore è localizzato a livello delle ossa lunghe o dello splancnocranio, ma non rara è l'evenienza in cui non sia possibile localizzare la neoplasia, nonostante un approfondito iter diagnostico. Nelle osservazioni riportate in letteratura, l'intervallo temporale tra l'esordio della sindrome e la scoperta della neoplasia causale è mediamente di 5-7 anni [1-5].

Il trattamento d'elezione della TIO è la rimozione chirurgica della neoplasia che determina la regressione completa del quadro clinico [1-6]. Nei casi in cui la neoplasia causale non venga identificata o risulti non operabile, la somministrazione *per os* di 1,25(OH)₂D₃ e sali di fosforo si è dimostrata una terapia maneggevole ed efficace, in grado di aumentare i livelli serici di fosfati e di ridurre la sintomatologia clinica [1-5].

Lo studio dei disordini da perdita renale di fosfati e della TIO in particolare ha permesso l'identificazione e la caratterizzazione funzionale di una nuova classe di ormoni, le fosfatone [10]. L'identificazione delle fosfatone ha completamente rivoluzionato le conoscenze riguardanti la regolazione endocrina e paracrina dell'omeostasi dei fosfati e le relazioni intercorrenti tra omeostasi dei fosfati, turnover osseo e sistema biologico vitamina D-PTH-calcio.

Il fosforo

Il fosforo è un non metallo del gruppo dell'azoto, con numero atomico 15, e costituisce l'1% del peso corporeo totale. Nel corpo umano è presente per circa l'80% nel tessuto osseo, combinato con il calcio e l'acqua in forma di idrossiapatite cristallina; il restante 20% è distribuito tra i visceri (10%), il tessuto muscolare scheletrico (9.9%) e l'ambiente extracellulare (0.1%) [15].

Nell'ambiente intracellulare il fosforo si trova in concentrazioni di circa 1-2 mmol/L (3.09-6.18 mg/dl), in parte integrato in numerose molecole organiche [composti energetici come l'adenosintrifosfato (ATP), proteine, metaboliti intermedi di carboidrati e lipidi] ed in parte come anione libero (HPO₄⁻ e H₂PO₄⁻).

Gli anioni liberi del fosforo sono presenti anche nel sangue, in concentrazioni di 0.75-1.45 mmol/L (2.32-4.49 mg/dl) ed in condizioni di sostanziale equilibrio con

il compartimento intracellulare. Gli anioni liberi del fosforo presenti nel sangue vengono identificati generalmente come fosfati [15].

La gran parte (~90%) dei fosfati plasmatici è legata a calcio, magnesio e sodio, ed in quanto tali sono filtrati a livello del glomerulo renale; solo il 10% circa dei fosfati plasmatici è legato alle proteine ematiche, dunque non è filtrabile [15].

I livelli circolanti di fosfati presentano una marcata variabilità circadiana, con il nadir tra le ore 7:00 e le 10:00, e sono significativamente influenzati dalla assunzione di fosfati con gli alimenti. L'apporto alimentare giornaliero di fosfati nei paesi industrializzati è di 800-900 mg/die, ed il loro assorbimento avviene in particolare nel digiuno attraverso due diversi meccanismi: uno passivo, sodio-indipendente, paracellulare e saturabile, che permette l'assorbimento del 70% dei fosfati assunti con la dieta; l'altro attivo, vitamina D-dipendente, sodio-dipendente e non saturabile [15].

Il controllo dei livelli serici di fosfati si realizza principalmente nel tubulo renale prossimale, dove viene riassorbito circa il 90 % del carico filtrato di fosfati (4-6 gr/die) [16].

Il trasporto attivo attraverso la membrana apicale delle cellule digiunali e tubulari è regolato dall'espressione e dall'attività biologica di tre specifici co-trasportatori di membrana sodio-dipendenti, tutti membri della famiglia SLC (SoLute Carrier): SLC34A1 e SLC34A3 sono espressi a livello del tubulo renale prossimale, mentre SLC34A2 è espresso a livello digiunale; SLC34A1 e SLC34A2 co-trasportano sodio e fosfati con un rapporto stechiometrico 3:1 mentre SLC34A3 co-trasporta gli stessi ioni con rapporto stechiometrico 2:1 [15-17].

A livello osseo, il fosforo ha un ruolo regolatore dei processi di mineralizzazione ossea: studi recenti dimostrano, infatti, che esso agisce attraverso la via del RANK (Receptor Activator of NF- κ B)/RANKL(RANK Ligand)/OPG (Osteoprotegerina) ed è in grado di regolare la differenziazione cellulare e l'attivazione metabolica degli osteoclasti [15-17].

Il paratormone

Il PTH è stato considerato per anni il principale regolatore del metabolismo calcio-fosforo. Prodotto dalle paratiroidi, il PTH aumenta il riassorbimento tubulare del calcio filtrato, stimola l'attività biologica dell'1 α -idrossilasi renale e riduce il riassorbimento tubulare dei fosfati presenti nel filtrato glomerulare.

A livello osseo il PTH appare come un regolatore del processo di rimodellamento osseo, con proprietà sia cataboliche sia anaboliche. Gli effetti di stimolazione del riassorbimento osseo sono mediati dal sistema biologico RANK/RANKL/OPG e sono secondari al reclutamento dei precursori degli osteoclasti, ed alla loro successiva differenziazione ed attivazione metabolica. Al contrario, gli effetti anabolici del PTH sono dovuti alla sua azione di stimolo del processo di differenziazione degli osteoblasti, mediata dall'attivazione delle vie delle protein-chinasi A (PKA) e C (PKC) [18].

Il sistema vitamina D/VDR

La vitamina D è presente in natura in due isoforme: quella animale (vitamina D₃, colecalciferolo) e quella vegetale (vitamina D₂, ergosterolo). Il nostro organismo è in grado di sintetizzare la vitamina D₃, sfruttando l'energia elettromagnetica della luce solare, in particolare la banda ultravioletta, per trasformare il 7-deidrocolesterolo in colecalciferolo. Questo pro-ormone subisce due

idrossilazioni, una epatica in posizione 25 e l'altra renale in posizione 1, con conseguente biosintesi della forma attiva della vitamina, l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Una fonte alternativa di colecalciferolo è rappresentata da alcuni alimenti, come i pesci "grassi" (salmone, sardina, aringa, sgombro, anguilla) e le uova [19].

L' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ha attività biologiche endocrine e paracrine sistemiche e presenta due differenti modalità d'azione entrambe mediate dal suo recettore (VDR - vitamin D receptor): una genomica a lungo termine, legata alla proprietà del sistema biologico $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR di regolare la trascrizione di oltre il 3% del genoma umano, ed una non-genomica a breve termine [19, 20].

L' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta il riassorbimento renale e l'assorbimento intestinale di calcio e fosfati, inibisce la biosintesi di PTH e promuove i processi di differenziazione e proliferazione degli osteoblasti, favorendo in questo modo la mineralizzazione ossea.

La sua produzione viene stimolata dal PTH, dall'ipocalcemia e dall'ipofosforemia, attraverso la 1α -idrossilasi renale, e dagli estrogeni, attraverso la 25-idrossilasi. È stato recentemente descritto un meccanismo di feedback negativo FGF23- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Una volta in circolo, essa viene trasportata dalla vitamin D Binding Protein (DBP) [19, 20].

Il Fibroblast Growth Factor 23

FGF23 è un fattore di crescita per i fibroblasti di 251 amminoacidi, codificato da un gene posto sul braccio corto del cromosoma 12 (12p13.3); la sua biosintesi avviene principalmente a livello dell'osso, ed ha come sito d'azione preferenziale (ma non unico) il tubulo prossimale del rene, dove regola il riassorbimento tubulare attivo dei fosfati [8].

Due co-trasportatori, uno attivo e l'altro passivo, assicurano il riassorbimento di fosfati, a livello del tubulo prossimale renale: l'FGF23 regola l'espressione di SLC34A1, il co-trasportatore attivo che scambia sodio e fosfati in rapporto stechiometrico 3:1. L'FGF23 inibisce anche la funzione della 1 α -idrossilasi renale, diminuendo le concentrazioni circolanti di vitamina D attiva con un meccanismo PTH-indipendente [8].

Le azioni biologiche di FGF23 sono mediate dall'interazione con recettori di membrana specifici per il componenti della famiglia FGF (FGFR). Sono stati identificati 4 tipi di FGFR, denominati con i numeri arabi da 1 a 4, e diversi sottotipi, indicati da una lettera minuscola dell'alfabeto greco: FGF23 attiva principalmente il tipo 4 ed i sottotipi "γ" delle altre classi di recettori. Questi recettori posseggono una porzione extracellulare costituita da 3 domini immunoglobulino-simili, responsabili dell'attivazione e dell'avvio del signaling intracellulare [8].

FGF23 presenta una bassa affinità di legame con i vari FGFR. Per aumentare la specificità del legame FGF23-FGFR è necessaria l'interazione di questo sistema con il co-fattore Klotho, una proteina di 1014 amminoacidi con una piccola porzione transmembranaria ed un unico dominio extracellulare. Questo dominio interagisce con la porzione amino-terminale dell'FGF23, che con la propria coda carbossi-terminale lega, invece, il recettore FGFR. Il sistema FGF23-FGFR-Klotho determina la trasmissione intracellulare del segnale di FGF23 [21, 22].

FGF23 viene inattivata tramite clivaggio tra l'amminoacido 179 ed il 180 ad opera di specifiche endopeptidasi che riconoscono la sequenza arginina176-X-X-arginina179; il clivaggio viene regolato dallo stato di glicosilazione della proteina.

La produzione ossea di FGF23 sembra essere regolata dai livelli circolanti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con un meccanismo di feedback negativo mentre sembra essere indipendente dall'apporto dietetico di fosfati [7, 8].

L'FGF23 è attualmente considerato, insieme al PTH, il principale ormone di regolazione del metabolismo dei fosfati [7, 8, 21].

Il sistema biologico RANK/RANKL/OPG

Il sistema biologico RANK/RANKL/OPG è il mediatore ultimo di molti dei fattori endocrini e paracrini che regolano il processo di rimodellamento osseo [23, 24].

Il RANK è un membro trimetrico della superfamiglia dei recettori del Tumor Necrosis Factor (TNF), il cui mRNA è espresso in differenti tessuti ed organi (osso, midollo osseo, milza, muscolo scheletrico, cervello, cuore, fegato, polmone, ghiandola mammaria, cute). In particolare, nel tessuto osseo, l'attivazione di RANK è fondamentale nel processo di differenziazione degli osteoclasti. L'attivazione di RANK è iniziata dal legame con il suo ligando, il RANKL: l'attivazione trasmette il segnale tramite il secondo messaggero TNF Receptor Associated Factor 6 (TRAF6), che provoca l'attivazione del sistema nuclear factor (NF)- κ B; questo, traslocando nel nucleo promuove la trascrizione dei geni fondamentali nei processi di proliferazione e di differenziazione degli osteoclasti [25].

Il RANKL esiste almeno in tre isoforme, due delle quali posseggono domini trans-membrana: queste ultime possono rimanere ancorate alla membrana citoplasmatica, oppure essere clivate e funzionare come recettore solubile (sRANKL). La biosintesi di sRANKL può avvenire anche per splicing alternativo

dell'mRNA di RANKL. RANKL è espresso sulla membrana cellulare degli osteoblasti, suggerendo un'interazione diretta tra queste cellule ed i progenitori degli osteoclasti [26].

L'effetto di RANKL si esplica principalmente a livello del midollo osseo; qui sono presenti le colonie progenitrici dei monociti/macrofagi, dalle quali derivano gli osteoclasti: l'interazione di RANKL con RANK causa il reclutamento dei progenitori degli osteoclasti, la loro fusione a formare le cellule multinucleate, la loro differenziazione, la loro interazione con l'interfaccia ossea e la loro sopravvivenza, grazie all'attività anti-apoptosica [26].

OPG è un fattore solubile prodotto dagli osteoblasti strutturalmente simile a RANK. OPG agisce da falso recettore RANK: lega il RANKL prima della sua interazione con il RANK e di fatto ne blocca le attività biologiche [23-27].

L'isoenzima osseo della fosfatasi alcalina

I geni che codificano per la fosfatasi alcalina (ALP) umana sono quattro. Tre di questi geni codificano per enzimi tessuto-specifici, in particolare per la ALP placentare, placenta-like e per la forma intestinale; l'ultimo, invece, genera per splicing alternativo e per un differente numero di glicosilazioni post-traduzionali le rimanenti varianti tissutali, come quella ossea, epatica, renale.

L'isoenzima osseo dell'ALP (bALP) è un glico-peptide di 507 amminoacidi localizzato sulla porzione extracellulare della membrana cellulare, dove idrolizza gli esteri fosforici per ottenerne prodotti utili alla mineralizzazione, facilita il trasporto del fosforo grazie alla propria attività fosfotransferasica e metabolizza i pirofosfati, noti inibitori della mineralizzazione.

La sua attività enzimatica, misurata nel siero, viene considerata un affidabile marcatore di attività osteoblastica [28-30].

L'idrossiprolina

L'idrossiprolina (Hp) è un amminoacido derivato della idrossilazione post-traduzionale della prolina che costituisce circa il 13% del totale degli aminoacidi costituenti il collagene.

Con la degradazione del collagene tissutale, essa viene rilasciata in circolo, dov'è presente in forma libera, non legata alle proteine plasmatiche, per circa il 90%: questa frazione non può essere riutilizzata per la sintesi de novo del collagene, viene filtrata a livello del glomerulo renale, parzialmente riassorbita a livello tubulare ed escreta con le urine.

Dato l'elevato grado di turnover osseo in tutte le fasi della vita umana, l'escrezione urinaria di Hp, corretta per la creatininuria (UHp/Crea), viene considerata un marcatore del catabolismo osseo. Purtroppo una parte del pool urinario di Hp appartiene ad altre molecole, come per esempio la frazione C1q del complemento, inficiando così, in parte, il significato clinico di tale marcatore di rimaneggiamento osseo [29].

Il telopeptide C-terminale del collagene di tipo I

Il telopeptide C-terminale del collagene di tipo I (ICTP), insieme alla piridinolina ed alla desossipiridinolina, fa parte di un gruppo di marcatori chiamati crosslinks idrossipiridinici del collagene di tipo I, che si formano durante la maturazione extracellulare dei collagene fibrillari, rilasciati dalle molecole di collagene mature.

L'ICTP è un frammento del collagene che viene prodotto per azione di specifiche metalloproteinasi ed è dosabile nel siero. I livelli serici di ICTP sono

sostanzialmente indipendenti dall'introito alimentare di collagene e rappresentano il marcatore più specifico e sensibile per una valutazione quantitativa del processo di riassorbimento osseo [30].

La catepsina K

La catepsina K (CathK) è una proteasi papaina-simile, codificata da un gene di circa 1.21 kb, strutturato in otto esoni e sette introni, che mappa sul cromosoma 1, in regione 1q21.

La CathK si può accumulare in alcuni organelli endocellulari (fagosomi, endosomi e lisosomi) e può essere rilasciata all'interno del citoplasma.

L'mRNA della CathK è stato identificato in molteplici tessuti, come quello osseo, nelle ovaie, nel cuore, nella placenta, nel polmone, nel muscolo scheletrico, nel colon e nel piccolo intestino.

Questo enzima specifico degli osteoclasti è attivo al pH acido tipico delle lacune di riassorbimento osseo, ed ha la funzione di degradare la tripla elica collagenica in piccoli polipeptidi, alcuni dei quali possono essere dosati nel sangue e nelle urine (come i frammenti C- ed N- terminali del collagene di tipo I), oltre ad una serie di altre proteine non collageniche (osteocalcina, osteopontina, fibronectina, trombospondina) caratteristiche della matrice proteica ossea.

L'espressione della CathK viene stimolata da una numerosa serie di fattori promuoventi il riassorbimento osseo [PTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $\text{TNF}\alpha$, glucocorticoidi, interleuchina (IL)-1, IL-11, ormoni tiroidei, prostaglandina E2, Fibroblast Growth Factor 2, istamina, Insulin-like growth factor (IGF)-1, riduzione del carico gravitatorio], mediante l'interazione con la via RANK/RANKL, ed inibita da fattori riducenti la funzionalità osteoclastica [come OPG e interferone (INF)- γ].

La CathK rappresenta un marcatore specifico del numero e dell'attività metabolica degli osteoclasti [31].

Obiettivi dello studio

La TIO rappresenta un modello sperimentale unico per la caratterizzazione funzionale *in vivo* della relazione esistente tra i vari parametri del turnover osseo (parametri di neoapposizione e di riassorbimento), il sistema biologico RANK/RANKL/OPG, la densità minerale ossea valutata tramite densitometria ossea (DXA) ed il sistema integrato di regolazione dell'omeostasi calcio-fosfati (vitamina D, PTH ed FGF23). Nonostante la TIO sia caratterizzata istologicamente da una condizione di grave osteomalacia e clinicamente da severi sintomi di pertinenza ossea (dolore, deformità e fratture), al momento non sono presenti in letteratura dati che prendano in esame queste correlazioni in pazienti con TIO in fase acuta o valutazioni longitudinali degli stessi dopo terapia.

Pazienti e Metodi

Sono stati studiati cinque pazienti con diagnosi di TIO (3 Maschi, 2 Femmine, età media 56.6 ± 3.7 anni, indice di massa corporea 25.8 ± 1.3 kg/m²) ricoverati presso il Dipartimento Assistenziale di Clinica Medica dell'Azienda Universitaria Policlinico dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" tra il 1998 ed il 2004.

Contemporaneamente, stati reclutati 40 controlli sani, paragonabili per sesso, età ed indice di massa corporea (23 Maschi e 17 Femmine, età media 53.6 ± 7.4 anni, indice di massa corporea 25.3 ± 5.7 kg/m²).

Nessuno dei 45 soggetti arruolati era stato trattato con corticosteroidi, estrogeni o qualsiasi altro farmaco noto per influenzare il turnover osseo o il sistema immunitario nei sei mesi precedenti lo studio e tutti presentavano normali parametri biochimici di funzionalità tiroidea, paratiroidea e renale. In tutti i soggetti arruolati l'anamnesi personale e familiare era negativa per disordini ereditari da perdita renale di fosfati, deformità scheletriche nell'infanzia e nell'adolescenza e bassa statura patologica da adulto. Tutti i soggetti arruolati hanno firmato un atto di consenso informato al momento dell'arruolamento nello studio. Lo studio è stato condotto in accordo con il protocollo di Helsinki sulle sperimentazioni cliniche nell'uomo e ha ricevuto l'approvazione del Comitato Etico di Facoltà.

Protocollo di studio

La valutazione dei parametri biochimici e clinico-radiologici è stata effettuata al momento della diagnosi di TIO (tempo 0) e 30, 60, 180 e 360 giorni dopo l'inizio della terapia consistente nella rimozione chirurgica del tumore causale la TIO in 2

pazienti o nel trattamento farmacologico con calcitriolo (1-3 $\mu\text{g}/\text{die}$) e fosfati (2g/die, in quattro somministrazioni) nei 3 pazienti nei quali il trattamento chirurgico non era praticabile [1].

A tutti i soggetti arruolati è stato chiesto di seguire una dieta standard che prevedesse un introito giornaliero di 300 gr di carboidrati, 70 gr di proteine, 1 gr di calcio, 900 mg di fosforo e 100 mEq di sodio, per un totale di 2200 kcal/die, nei sette giorni precedenti ogni valutazione clinica; questa misura dietetica ha consentito di stabilizzare i principali parametri biochimici valutati [32-33].

Dopo i sette giorni di dieta standard, è stato chiesto ai soggetti studiati di praticare una raccolta delle urine delle 24h, e su campioni della stessa sono stati valutati i livelli di fosfati, creatinina ed idrossiprolina. La mattina dell'ottavo giorno successivo all'inizio della dieta, a digiuno, a tutti i soggetti è stato inoltre praticato un prelievo di sangue venoso periferico nel quale sono stati valutati i livelli di calcio ionizzato, magnesio, creatinina, fosfati, PTH intatto, 25OHD₃, 1,25(OH)₂D₃, bALP, ICTP, CathK, OPG, RANKL ed FGF23.

I campioni di siero ed urine sono stati divisi in aliquote e conservati alla temperatura di -80°C (aliquote seriche) e di -20°C (aliquote urinarie). Ogni parametro biochimico è stato misurato in duplicato e tutte le determinazioni biochimiche sono state effettuate contestualmente per pazienti e controlli.

Il riassorbimento tubulare dei fosfati è stato stimato attraverso il calcolo della soglia massima del riassorbimento tubulare di fosfati, corretta per il valore del filtrato glomerulare stimato tramite la clearance della creatinina ($Tm_{\text{Pi}}/\text{GFR}$), secondo i criteri proposti da Walton e Bijvoet [34] (Figura 1).

Saggi biochimici

Il dosaggio dell'FGF23 è stato effettuato con un Kit ELISA specifico per il frammento C-terminale della molecola umana (hFGF-23 C-term Immutopics, Inc., San Clemente, CA, USA, coefficienti di variazione intra- ed inter-saggio di 5.0% e 7.3% rispettivamente) [35]; per la bALP è stato utilizzato un kit ELISA (Osteia Octase BAP, IDS Inc, Fountain Hills, AZ85268, USA, coefficienti di variazione intra- ed inter-saggio <6.5 ed <6.4%).

L'ICTP è stato dosato tramite un kit ELISA (Serum CrossLaps, Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Denmark, coefficienti di variazione intra- ed inter-saggio <5.45% ed <8.1%). Il PTH è stato dosato con saggio immunometrico (Immulite iPTH, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA, coefficienti di variazione intra- ed inter-saggio <7% e <5.5%).

I livelli di 25OHD₃ sono stati valutati mediante saggio immunoenzimatico (Vitamin D3 screen, Buhlmann Laboratories AG; Allschwill, Switzerland, coefficienti di variazione intra- ed inter-saggio <9.8% e <11.6%). Per il dosaggio dell' 1,25(OH)₂D₃ è stato utilizzato un kit RIA (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA, coefficienti di variazione intra- ed inter-saggio <8% ed <10%).

I saggi di CathK, OPG e sRANKL sono stati eseguiti mediante l'utilizzo di specifici Kit ELISA (Biomedica Gruppe, Wien, Austria, coefficienti di variazione intra- ed inter-saggio <10%).

La creatinina ed il fosforo urinari sono stati misurati con saggi enzimatici colorimetrici; l'idrossiprolina urinaria è stata determinata con il metodo descritto da Prockop e Underfriend [36], modificato secondo Clery e Sanders [37].

Determinazione della densità minerale ossea (BMD) e delle fratture

I valori di BMD sono stati determinati con metodica DXA utilizzando un densitometro Hologic QDR 1000 (Waltham, MA, USA; coefficiente di variabilità dell'1%), tramite una proiezione postero-anteriore delle vertebre lombari (L₂-L₄). Tutte le determinazioni sono state effettuate dal medesimo operatore.

La presenza di fratture a livello delle vertebre esaminate è stata esclusa tramite morfometria quantitativa, secondo le linee guida del US National Osteoporotic Foundation Working Group on Vertebral Fractures [38].

Non è stato possibile inserire nella valutazione dei paziente affetti da TIO la valutazione della BMD a livello femorale, in quanto due pazienti presentavano fratture in tale sede già prima dell'inizio dello studio: il paziente numero 4 presentava una frattura femorale bilaterale (Figura 2).

Determinazione del dolore muscolo-scheletrico e della debolezza muscolare

Ad ogni controllo medico, è stato chiesto al paziente di compilare un questionario appositamente strutturato per ottenere una valutazione semiquantitativa del dolore, riportando la presenza o l'assenza di dolore muscolare e la sua intensità. Secondo i criteri proposti da Tong e colleghi [39], il punteggio assegnato al dolore è stato determinato dal prodotto tra la severità del dolore (assente, media, moderata e severa) e la frequenza del dolore (assente, occasionale, intermittente e costante). Ad ogni grado della scala adottata corrisponde un numero intero compreso nell'intervallo 0-3; in tal modo, un punteggio di 0 denota l'assenza di

dolore, mentre un punteggio di 9 denota la presenza di un severo dolore costante nel tempo.

Analogamente, è stata quantificata anche l'eventuale terapia analgesica praticata dal soggetto in esame: è stato assegnato un punteggio da 0 a 3 al tipo di farmaco analgesico utilizzato (nessuno, analgesico ad azione periferica, analgesico ad azione centrale non-oppioidi e oppioidi) ed un analogo punteggio da 0 a 3 alla frequenza con la quale avveniva l'assunzione del farmaco analgesico (mai, meno di una volta al giorno, una volta al giorno, più di una volta al giorno): un punteggio uguale a 0 indica la mancata assunzione di farmaci analgesici, mentre un punteggio uguale a 9 indica che il paziente assume più di una volta al giorno farmaci analgesici oppioidi [39].

Insieme al dolore muscolo-scheletrico, ad ogni visita medica sono stati valutati tono, il trofismo e la forza muscolare usando criteri standardizzati [40, 41]; in particolare, sono stati esaminati i gruppi muscolari degli arti superiori (bicipite, deltoide, tricipite, dorsali interossei ed avambraccio-mano) ed inferiori (tibiale anteriore, psoas, estensore lungo dell'alluce, quadricipite e gastrocnemio) bilateralmente. Il parametro valutato è la capacità di vincere la resistenza opposta dall'esaminatore al movimento attivo [40, 41]. Tale parametro è stato quantificato con punteggio compreso tra 0 e 3 (forza normale, mediamente persa, severamente persa, completamente persa) per ogni gruppo muscolare esaminato: i punteggi più alti sono associati alla maggiore perdita di tono, trofismo e forza muscolare.

Analisi genetiche

Sia nei pazienti con TIO sia nei controlli sani, sono state ottenute le sequenze delle regioni codificanti e regolatorie del gene *FGF23*. Il DNA è stato estratto dal

sangue intero tramite una procedura di “salting out” [42]. Le 1000 paia di basi stericamente precedenti la regione 5' e tutti e tre gli esoni del gene dell'FGF23, incluse le regioni di transizione introne/esone, sono stati amplificati con questa procedura: 1.5 mM di MgCl₂, 1 mM per ogni buffer PCR standard (Fermentas), 0.2 mM di dNTPs (Amersham), 0.5 μM di ogni primer diretto ed inverso, 1 unità di Taq polimerasi (Fermentas), 40 ng di DNA genomico, portato al volume finale di 25 μl con acqua distillata sterile.

Sono stati effettuati: 1 ciclo a 95°C per 3' per l'iniziale denaturazione, seguiti da 35 cicli di denaturazione per 30'' a 94°C, trattamento dei primer per 30'' a temperatura di fusione, estensione dei primer per 45'' a 72°C ed estensione finale a 72° per 10'. I campioni ottenuti sono stati digeriti con ExoSap (Amersham) e sequenziati tramite Big Dye Terminator Ready Reaction Kit (Applied Biosystem). Le reazioni di sequenziamento sono state eseguite con un Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems) tramite Big Dye Terminator Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) per 25 cicli a 95° per 10'', a temperatura di fusione per 5'' ed a 60°C per 2'. Il prodotto di sequenziamento è stato purificato su colonne Amersham per rimuovere l'eccesso di colorante ed è stata eseguita un'analisi con il sistema ABI prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

I polimorfismi sono stati ricercati tramite allineamenti di sequenze multiple utilizzando il programma Autoassembler (Applied Biosystems).

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software statistico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS©), versione 11.5.

Tabelle di contingenza e test del chi quadro sono stati utilizzati per l'analisi dei dati qualitativi, mentre l'analisi della varianza è stata impiegata per confrontare i dati quantitativi.

Le differenze rispetto al tempo 0 dopo trattamento chirurgico o farmacologico sono state valutate utilizzando il t - test di Student per variabili appaiate.

Il test di Pearson è stato utilizzato per rilevare la relazione esistente tra i differenti parametri al tempo 0 ed al tempo 360 e per valutare le relazioni esistenti tra le differenze nel tempo (Δ) di ogni parametro. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard. Tutti i test statistici utilizzati sono a doppia coda.

La significatività statistica è stata fissata ad un valore di p inferiore o uguale a 0.05.

Risultati

Valutazione al tempo 0

In tutti i cinque pazienti la diagnosi di TIO è stata posta in base ai seguenti parametri:

1. Presenza di parametri biochimici patognomonic della sindrome
2. Presenza di una compatibile sintomatologia clinica
3. Anamnesi personale e familiare muta per disordini da perdita renale di fosfati durante l'infanzia e l'adolescenza
4. Normale altezza da adulto
5. Assenza di deformità scheletriche
6. Presenza, in pregresse analisi ematochimiche, di normali livelli di fosfati ematici
7. Assenza di mutazioni del gene *FGF23*

I livelli serici di fosfati (0.60 ± 0.15 vs. 1.16 ± 0.25 mmol/L, $p < 0.001$), RANKL (0.52 ± 0.14 vs. 1.05 ± 0.23 pmol/L, $p = 0.024$), e CathK (1.76 ± 0.17 vs. 3.48 ± 0.87 , pmol/L, $p < 0.001$) così come i valori del TmPi/GFR (0.51 ± 0.08 vs. 1.31 ± 0.35 , mmol/L, $p < 0.001$) erano significativamente inferiori nei pazienti con TIO rispetto ai controlli normali, senza sovrapposizioni tra i due gruppi.

I livelli serici di FGF23 e bALP sono invece risultati significativamente più elevati nei pazienti affetti da TIO rispetto ai soggetti di controllo (830 ± 674 vs. 27.2 ± 11.3 RU/ml, e 44.9 ± 10.8 vs. 17.5 ± 6.7 µg/L, rispettivamente; $p < 0.001$ per entrambi). Gli altri parametri biochimici esaminati, OPG inclusa, non hanno mostrato differenze sostanziali tra pazienti e controlli, anche se nei pazienti con

frattura femorale è stato riscontrato un aumento dei livelli serici di ICTP ed un aumento del rapporto UHp/crea.

Nei pazienti con TIO la BMD a livello delle vertebre L₂-L₄ era significativamente più bassa rispetto ai controlli (0.41 ± 0.17 vs. 1.09 ± 0.04 g/cm²; $p < 0.001$) ed era correlata ai livelli di FGF23 ($r = -0.94$, $p = 0.017$), fosfati ($r = 0.99$, $p = 0.003$) e TmPi/GFR ($r = 0.98$, $p = 0.004$). Simili correlazioni non erano presenti nei soggetti di controllo.

Valutazione longitudinale (Tabella 1 e 2, Figura 3)

Nel paziente n°1 (maschio, 60 anni, indice di massa corporea 26.1 Kg/m²) e nel paziente n°2 (maschio, 51 anni, indice di massa corporea 27.8 Kg/m²) il tumore responsabile della TIO è stato individuato ed rimosso chirurgicamente; in entrambi i casi si trattava di un PMTMCT associato ad elementi vascolari tipo emangiopericitoma (Figure 4 e 5); nelle 24 ore successive alla rimozione chirurgica della neoplasia, i livelli serici di FGF23 sono tornati nei limiti della norma, con concomitante rapido incremento dei livelli serici di fosfati e del rapporto TmPi/GFR. In questi due pazienti, i summenzionati parametri sono rimasti nei limiti degli intervalli di riferimento nell'arco dell'intero periodo di osservazione.

Nel paziente n°3 (femmina, 56 anni, indice di massa corporea 25.8 Kg/m²), sono stati identificati molteplici emangiomi/emangiopericitomi vertebrali, probabilmente causali la sindrome, risultati non suscettibili di rimozione chirurgica a causa della loro localizzazione (Figura 6).

La neoplasia alla base della TIO è rimasta, invece, non identificata nel paziente n°4 (femmina, 56 anni, indice di massa corporea 24.6 Kg/m²) e nel paziente n°5

(maschio, 60 anni, indice di massa corporea 24.8 Kg/m²), nonostante i periodici controlli clinici e strumentali eseguiti, che hanno previsto anche l'esecuzione di una scintigrafia total-body con octreotide. In questi tre pazienti, la terapia medica intrapresa ha determinato al tempo 30 un modesto aumento dei livelli serici di fosfati e del TmPi/GFR, senza modificare i livelli circolanti di FGF23. Anche in questi pazienti i livelli di questi parametri biochimici sono rimasti stabili durante il periodo di osservazione.

Ai tempi 30 e 60, i valori di RANK e del rapporto RANKL/OPG sono risultati ancora significativamente più bassi dei parametri di riferimento in tutti i pazienti. Dal tempo 60, i valori di RANK e del rapporto RANKL/OPG hanno mostrato un progressivo incremento fino a ritornare all'interno dell'intervallo di riferimento al tempo 360.

I livelli serici di calcio e magnesio, nonostante siano rimasti costantemente nell'ambito dei rispettivi intervalli di riferimento, hanno mostrato un lieve decremento ai tempi 30 e 60. Nello stesso lasso di tempo, è stato osservato un aumento dell'attività enzimatica della bALP ed un decremento dei livelli ematici di ICTP e del rapporto UHp/crea; questo decremento è stato maggiore nei pazienti che presentavano fratture. Dal tempo 60, anche i livelli di questi marcatori del turnover osseo sono ritornati progressivamente all'interno dei rispettivi limiti di riferimento.

Durante i primi 60 giorni di osservazione non abbiamo osservato alcuna variazione significativa della sintomatologia clinica associata alla TIO, a dispetto di un obiettivo miglioramento della omeostasi dei fosfati. Dal tempo 60, invece, si

è osservato un progressivo e continuo miglioramento della sintomatologia clinica, in particolare in quei pazienti che sono stati sottoposti ad intervento chirurgico.

Un aumento significativo dei valori di BMD è stato ottenuto sia nei pazienti sottoposti ad intervento chirurgico (Δ BMD a 12 mesi = +264% e +139% nei pazienti 1 e 2, rispettivamente) sia nei pazienti trattati farmacologicamente (Δ BMD a 12 mesi = +37%, +76% e +52% nei pazienti 3, 4 e 5, rispettivamente).

La variazione di BMD osservata durante l'intero periodo di osservazione era direttamente correlata alla variazione dei livelli serici dei fosfati ($r = 0.97$, $p = 0.006$) ed alla variazione del TmPi/GFR ($r = 0.97$, $p = 0.006$). Nessun altro parametro tra quelli esaminati è risultato correlato all'aumento della BMD.

Discussione e Conclusioni

Il presente studio rappresenta la prima valutazione dei parametri relativi al metabolismo calcio-fosforico ed al turnover osseo (asse RANK/RANKL/OPG, BMD, marcatori di turnover osseo) in un gruppo di pazienti affetti da TIO. I pazienti arruolati sono stati valutati sia nella fase acuta della malattia sia nel periodo successivo all'inizio della terapia.

Nella TIO attiva è ben documentato un aumento dei livelli serici di FGF23 e di bALP, un marker di neoapposizione ossea [1-6]; questo quadro si associa ad una riduzione dei livelli ematici di RANKL, del rapporto RANKL/OPG e di CathK, un indicatore del numero degli osteoclasti metabolicamente attivi, e a livelli normali di ICTP ed UHp/crea, due marcatori di attività osteoclastica [43]. Questi dati sono fortemente suggestivi di un “disaccoppiamento” dei processi di riassorbimento e neoapposizione ossea che si manifesta nella malattia in fase attiva.

Tale disaccoppiamento del turnover osseo e l'inibizione funzionale del sistema biologico RANK/RANKL/OPG possono essere considerati un meccanismo compensatorio messo in atto dall'organismo, nel tentativo di preservare l'integrità ossea ed evitare un peggioramento dell'osteomalacia durante la fase attiva della TIO; analoghi quadri biumorali sono stati documentati in altre condizioni patologiche ossee, come la malattia di Paget dell'osso e la sindrome da eccesso di glucocorticoidi [44, 45].

Questa ipotesi è supportata anche dai cambiamenti biochimici e strumentali osservati dopo il trattamento chirurgico o farmacologico della TIO e dai rilievi

istologici derivanti da biopsie ossee eseguite sui pazienti affetti da TIO in fase acuta [3, 5, 14, 46].

La valutazione longitudinale dei pazienti affetti da TIO evidenzia che sia i pazienti sottoposti ad intervento chirurgico sia quelli trattati con terapia medica per via enterale presentano un aumento della BMD quale parte integrante del miglioramento del quadro clinico. L'incremento della BMD è direttamente correlato all'aumento dei livelli serici di fosfati ed all'incremento del riassorbimento tubulare dei fosfati, stimato dal $TmPi/GFR$, piuttosto che alla variazione dei livelli circolanti di FGF23. Queste evidenze suggeriscono un ruolo complementare dei fattori summenzionati nella regolazione del turnover osseo in condizioni fisiologiche e patologiche, come dimostrato in modelli sperimentali [47-50]. In topi *Hyp*, modello sperimentale dei pazienti con XLH [51], Hayashibara e colleghi hanno infatti dimostrato un ruolo diretto dei fosfati ematici nei processi di differenziazione ed attivazione metabolica degli osteoclasti, ed un ruolo altrettanto significativo dei bassi livelli ematici di fosfati nella patogenesi delle anomalie scheletriche proprie dei disordini da perdita renale di fosfati [47]. D'altra parte, sempre in modelli sperimentali, elevati livelli di fosfati inorganici inibiscono la differenziazione e l'attivazione metabolica degli osteoclasti, attraverso il blocco post-recettoriale del segnale di RANKL [48]. Anche bassi livelli di fosfati inorganici sono tuttavia in grado di inibire la differenziazione e l'attivazione metabolica degli osteoclasti, attraverso il blocco della biosintesi di RANKL [49]. I bassi livelli di RANKL osservati nei pazienti con TIO confermano questi ultimi risultati.

Un aspetto interessante dell'assetto RANK/RANKL/OPG in corso di TIO è la sostanziale uguaglianza dei livelli di OPG tra pazienti e controlli al tempo 0 e la stabilità dei livelli di OPG durante l'intero periodo di osservazione. Questi dati sembrano indicare, in tutti i pazienti, un grado variabile di ripristino dell'accoppiamento riassorbimento/neoapposizione ossea indotto dal trattamento. Ad ogni modo non è stata trovata alcuna correlazione tra lo stato dell'asse RANK/RANKL/OPG ed i livelli dei marcatori di turnover osseo ma, dato l'esiguo numero di pazienti esaminati nel presente studio, non è possibile trarre alcuna conclusione definitiva circa le relazioni esistenti tra tali elementi.

L'andamento progressivo dei parametri clinici e biochimici nel corso del periodo di osservazione clinica evidenzia l'insorgenza di una sindrome dell'osso affamato "hungry bone like-syndrome" durante i primi 60 giorni di osservazione; in questo lasso di tempo, infatti, è stato osservato: a) un aumento dei livelli serici di bALP, b) un'inibizione protratta del RANKL e della CathK, c) una riduzione dei livelli dei marcatori di attività osteoclastica, d) una modesta riduzione della calcemia e della magnesemia ed, in ultimo, e) una prolungata presenza della sintomatologia clinica TIO correlata, anche nei pazienti trattati chirurgicamente. Una sindrome simile è stata precedentemente descritta in pazienti con osteomalacia dopo l'inizio del trattamento farmacologico con vitamina D₃ attiva [52].

Il maggiore punto debole del nostro studio è sicuramente il ridotto numero di pazienti esaminati, cosicché ogni conclusione tratta deve essere considerata con cautela. Si deve tuttavia sottolineare l'estrema rarità della patologia presa in considerazione, che rappresenta tuttavia un modello sperimentale unico per la

valutazione in vivo del processo integrato di regolazione dell'intero metabolismo minerale [53].

In conclusione, il presente studio longitudinale di 5 pazienti affetti da TIO fornisce per la prima volta un completo inquadramento clinico e biochimico della sindrome in fase acuta, dopo il trattamento chirurgico e durante il trattamento farmacologico. La riduzione del rapporto RANKL/OPG, che si osserva in questi pazienti in fase acuta, ed il suo progressivo incremento in corso di terapia, dopo un periodo di transitoria "hungry-bone like syndrome", possono essere considerati un adattamento dell'organismo alla patologia, caratterizzato dall'inibizione funzionale dell'asse RANK/RANKL/OPG e finalizzato al tentativo di limitare la già eccessiva demineralizzazione ossea. Successivi studi multicentrici sono auspicabili per confermare i dati presentati.

Bibliografia

1. Drezner MK (2001) Tumor-induced osteomalacia. *Rev Endocr Metab Disord* 2: 175-186.
2. Jan de Beur SM (2005) Tumor-induced osteomalacia. *JAMA* 294: 1260-1267.
3. White KE, Larsson TE, Econs MJ (2006) The roles of specific genes implicated as circulating factors involved in normal and disordered phosphate homeostasis: frizzled related protein-4, matrix extracellular phosphoglycoprotein, and fibroblast growth factor 23. *Endocr Rev* 27: 221-241.
4. Reyes-Mùgica M, Arnsmeier SL, Backeljauw PF, Persing J, Ellis B, Carpenter TO (2000) Phosphaturic mesenchymal tumor induced rickets. *Pediatr Dev Pathol* 3: 61–69.
5. Jan de Beur SM (2006) Tumor-induced osteomalacia. In: American Society for Bone and Mineral Research (ed) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, p 345-351.
6. Folpe AL, Fanburg-Smith JC, Billings SD, Bisceglia M, Bertoni F, Cho JY, Econs MJ, Inwards CY, Jan de Beur SM, Mentzel T, Montgomery E, Michal M, Miettinen M, Mills SE, Reith JD, O'Connell JX, Rosenberg AE, Rubin BP, Sweet DE, Vinh TN, Wold LE, Wehrli BM, White KE, Zaino RJ, Weiss SW (2004) Most osteomalacia-associated mesenchymal tumors are a single histopathologic entity: an analysis of 32 cases and a comprehensive review of the literature. *Am J Surg Pathol* 28: 1-30.

7. Weber TJ, Liu S, Indridason OS, Quarles LD (2003) Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *J Bone Miner Res* 18: 1227-1234.
8. Fukumoto S, Yamashita T (2007) FGF23 is a hormone-regulating phosphate metabolism-unique biological characteristics of FGF23. *Bone* 40: 1190-1195.
9. Rendina D, Mossetti G, De Filippo G, Cioffi M, Strazzullo P (2006) Fibroblast growth factor 23 is increased in calcium nephrolithiasis with hypophosphataemia and renal phosphate leak. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 959-963.
10. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T (2001) Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6500–6505.
11. Jonsson KB, Zahradnik R, Larsson T, White KE, Sugimoto T, Imanishi Y, Yamamoto T, Hampson G, Koshiyama H, Ljunggren O, Oba K, Yang IM, Miyauchi A, Econs MJ, Lavigne J, Juppner H (2003) Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia. *N Engl J Med* 348: 1656-1663.
12. Prié D, Ravery V, Boccon-Gibod L, Friedlander G (2001) Frequency of renal phosphate leak among patients with calcium nephrolithiasis. *Kidney Int* 60: 272-276.
13. Prié D, Huart V, Bakouh N, Planelles G, Dellis O, Gerard B, Hulin P, Benque-Blanchet F, Silve C, Grandchamp B, Friedlander G (2002)

Nephrolithiasis and osteoporosis associated with hypophosphatemia caused by mutations in the type 2a sodium-phosphate cotransporter. *N Engl J Med* 347: 983-991.

14. Nawrot-Wawrzyniak K, Varga F, Nader A, Roschger P, Sieghart S, Zwettler E, Roetzer KM, Lang S, Weinkamer R, Klaushofer K, Fratzl-Zelman N (2009) Effects of tumor-induced osteomalacia on the bone mineralization process. *Calcif Tissue Int* 84: 313-323.
15. Bringhurst FR (2001) Regulation of calcium and phosphate homeostasis. In: DeGroot LJ, Jameson JL (eds). *Endocrinology*, Philadelphia: W.B. Saunders Co., p 1029-1052.
16. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H (2006) Proximal tubular handling of phosphate: a molecular perspective. *Kidney Int* 70: 1548-59.
17. Mossetti G, Rendina D, De Filippo G, Zampa G, Strazzullo P (2009) Phosphatonins: novel insights and clinical perspectives. *G Ital Nefrol* 26: 171-180.
18. Qin L, Raggatt LJ, Partridge NC (2004) Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 15: 60-65.
19. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005) Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F8-F28.
20. Heaney RP (2007) Vitamin D endocrine physiology. *J Bone Miner Res* 22: V25-V27.
21. Razzaque MS (2009) The FGF23-Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 5: 611-619.

22. Kurosu H, Kuro-O M (2009) The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 299: 72-78.
23. Harada S, Rodan GA (2003) Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349-355.
24. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342.
25. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ (2008) Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 29: 155-192.
26. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K (2007) The role of receptor activator of nuclear factor κ B/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 4514-4521.
27. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D (2004) The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 457-475.
28. Moss DW (1982) Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem* 28: 2007-2016.
29. Garnero P, Bianchi F, Carlier MC, Genty V, Jacob N, Kamel S, Kindermans C, Plouvier E, Pressac M, Souberbielle JC (2000) Biochemical markers of bone remodeling: pre-analytical variations and guidelines for their use. *Ann Biol Clin* 58: 683-704.

30. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J (2000) The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos Int* 6: S2-S17.
31. Zhao Q, Jia Y, Xiao Y (2009) Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases. *Biochem Biophys Res Comm* 380: 721-723.
32. Siener R, Hesse A (2002) The effects of different diets on urine composition and the risk of calcium oxalate crystallisation in healthy subjects. *Eur Urol* 42: 289-296.
33. Tiselius HG, Ackermann D, Alken P, Buck C, Conort P, Gallucci M (2001) Guidelines on urolithiasis. *Eur Urol* 40: 362-371.
34. Walton RJ, Bijvoet OL (1975) Nomogram for derivation of renal threshold phosphate concentration. *Lancet* 2: 309-310.
35. Imel EA, Peacock M, Pitukcheewanont P, Heller HJ, Ward LM, Shulman D, Kassem M, Rackoff P, Zimering M, Dalkin A, Drobny E, Colussi G, Shaker JL, Hoogendoorn EH, Hui SL, Econs MJ (2006) Sensitivity of fibroblast growth factor 23 measurements in tumor-induced osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2055-2061.
36. Prockop DJ, Underfried S (1960) A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissue and urine. *Anal Biochem* 1: 228.
37. Clery J, Sanders RA (1974) A simplified procedure for the measurement of total hydroxyproline in urine. *Clin Chim Acta* 57: 217.
38. Kiel D (1995) Assessing vertebral fractures. National Osteoporosis Foundation Working Group on Vertebral Fractures. *J Bone Miner Res* 10: 518-523.

39. Tong D, Gillick L, Hendrickson FR (1982) The palliation of symptomatic osseous metastases: final results of the Study by the Radiation Therapy Oncology Group. *Cancer* 50: 893-899.
40. Kendall FP, McCreary EK, Provance PG (1993) *Muscles - Testing and function with posture and pain*. 4th ed. Lippincott, Williams, and Wilkins, Baltimore, MD, USA.
41. Seibel M (1996) Neuromuscular examination. In: Valmassy RL (ed) *Clinical biomechanics of the lower extremities*. 1st ed. Mosby, St. Louis, MO, USA, p 207–221.
42. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
43. Henriksen K, Tanko LB, Qvist P, Delmas PD, Christiansen C, Karsdal MA (2007) Assessment of osteoclast number and function: application in the development of new and improved treatment modalities for bone diseases. *Osteoporos Int* 18: 681-685.
44. Mossetti G, Rendina D, De Filippo G, Viceconti R, Di Domenico G, Cioffi M, Postiglione L, Nunziata V (2005) Interleukin-6 and osteoprotegerin systems in Paget's disease of bone: relationship to risedronate treatment. *Bone* 36: 549-554.
45. Ueland T, Bollerslev J, Godang K, Müller F, Frøland SS, Aukrust P (2001) Increased serum osteoprotegerin in disorders characterized by persistent immune activation or glucocorticoid excess--possible role in bone homeostasis. *Eur J Endocrinol* 145: 685-690.

46. Umphrey LG, Whitaker MD, Bosch EP, Cook CB (2007) Clinical and bone density outcomes of tumor-induced osteomalacia after treatment. *Endocr Pract* 13: 458-462.
47. Hayashibara T, Hiraga T, Sugita A, Wang L, Hata K, Ooshima T, Yoneda T (2007) Regulation of osteoclast differentiation and function by phosphate: potential role of osteoclasts in the skeletal abnormalities in hypophosphatemic. *J Bone Miner Res* 22: 1743-1751.
48. Sitara D, Kim S, Razzaque MS, Bergwitz C, Taguchi T, Schuler C, Erben RG, Lanske B (2008) Genetic evidence of serum phosphate-independent functions of FGF-23 on bone. *PLoS Genet* 4: e1000154.
49. Mozar A, Haren N, Chasseraud M, Louvet L, Mazière C, Wattel A, Mentaverri R, Morlière P, Kamel S, Brazier M, Mazière JC, Massy ZA (2008) High extracellular inorganic phosphate concentration inhibits RANK-RANKL signaling in osteoclast-like cells. *J Cell Physiol* 275: 41-54.
50. Yates AJ, Oreffo RO, Mayor K, Mundy GR (1991) Inhibition of bone resorption by inorganic phosphate concentration is mediated by both reduced osteoclast formation and decreased activity of mature osteoclasts. *J Bone Miner Res* 6: 473-478.
51. Tenenhouse HS (1999) X-linked hypophosphataemia: A homologous disorder in humans and mice. *Nephrol Dial Transplant* 14: 333-341.
52. Fitzpatrick LA (2002) The hypocalcemic states. In: Coe FL, Favus MJ (eds) *Disorders of bone and mineral metabolism*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p 568-588.

53. Barthel TK, Mathern DR, Whitfield GK, Haussler CA, Hopper HA 4th, Hsieh JC, Slater SA, Hsieh G, Kaczmarska M, Jurutka PW, Kolek OI, Ghishan FK, Haussler MR (2007) 1,25-Dihydroxyvitamin D3/VDR-mediated induction of FGF23 as well as transcriptional control of other bone anabolic and catabolic genes that orchestrate the regulation of phosphate and calcium mineral metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103: 381-388

Tabella 1: Parametri clinico-laboratoristici dei pazienti con TIO

P	Tempo (die)	Pain (score)	Med (score)	Weak (score)	PO₄³⁻ (mmol/L)	Ca²⁺ (mmol/L)	Mg²⁺ (mmol/L)	25OH₂D₃ (nmol/L)	1,25(OH)₂D₃ (pmol/L)	iPTH (pmol/L)	FGF-23 (RU/ml)	TrnPy/GFR (mmol/L)
1	0	6	6	47	0.48	1.19	0.95	74.9	78.4	2.57	1158	0.44
	30	6 (0)	6 (0)	45 (-4)	1.09 (+127)	1.16 (-3)	0.93 (-2)	70.5 (-6)	87.5 (+12)	2.28 (-11)	37 (-97)	1.18 (+168)
	60	4 (-33)	3 (-50)	39 (-17)	1.10 (+129)	1.17 (-2)	0.94 (-1)	75.2 (0)	89.1 (+14)	2.15 (-16)	37 (-97)	1.19 (+170)
	180	3 (-50)	1 (-83)	36 (-23)	1.12 (+133)	1.21 (+2)	0.95 (0)	77.3 (+3)	85.8 (+9)	2.34 (-9)	36 (-97)	1.17 (+166)
360	1 (-83)	0 (-100)	0 (-100)	25 (-47)	1.11 (+131)	1.20 (+1)	0.97 (+2)	80.1 (+7)	82.5 (+5)	2.41 (-6)	35 (-97)	1.17 (+166)
2	0	6	6	46	0.64	1.21	1.01	75.6	79.8	2.13	569	0.54
	30	4 (-33)	4 (-33)	45 (-2)	1.15 (+80)	1.15 (-5)	0.98 (-3)	69.8 (-8)	88.6 (+11)	1.95 (-8)	26 (-95)	1.21 (+124)
	60	3 (-50)	3 (-50)	39 (-15)	1.17 (+83)	1.16 (-4)	0.99 (-2)	72.4 (-4)	85.9 (+8)	1.98 (-7)	25 (-96)	1.25 (+131)
	180	1 (-83)	2 (-67)	37 (-20)	1.18 (+84)	1.20 (-1)	0.98 (-3)	76.7 (+1)	86.3 (+8)	2.19 (+3)	24 (-96)	1.29 (+139)
360	0 (-100)	0 (-100)	25 (-46)	1.24 (+94)	1.19 (-2)	0.97 (-4)	79.6 (+5)	84.1 (+5)	1.96 (-8)	24 (-96)	1.34 (+148)	
3	0	9	9	50	0.75	1.19	0.95	73.8	82.1	2.01	226	0.60
	30	9 (0)	6 (-33)	48 (-4)	0.89 (+19)	1.15 (-3)	0.92 (-3)	74.7 (+1)	94.4 (+15)	1.54 (-23)	218 (-4)	0.78 (+30)
	60	6 (-33)	4 (-56)	45 (-10)	0.88 (+17)	1.16 (-3)	0.94 (-1)	76.6 (+4)	95.7 (+17)	1.47 (-27)	204 (-10)	0.84 (+40)
	180	4 (-56)	4 (-56)	35 (-30)	0.91 (+21)	1.21 (+2)	0.95 (0)	88.1 (+19)	88.2 (+7)	1.78 (-11)	230 (+2)	0.72 (+20)
360	4 (-56)	4 (-56)	33 (-34)	0.89 (+19)	1.20 (+1)	1.00 (+5)	85.4 (+16)	85.7 (+4)	1.84 (-8)	207 (-8)	0.91 (+52)	
4	0	9	9	49	0.41	1.20	0.96	70.9	75.1	2.17	1851	0.40
	30	9 (0)	6 (-33)	46 (-6)	0.51 (+24)	1.15 (-4)	0.91 (-5)	72.2 (+2)	89.4 (+19)	1.68 (-23)	1723 (-7)	0.51 (+28)
	60	4 (-56)	4 (-56)	44 (-10)	0.56 (+37)	1.16 (-3)	0.92 (-4)	80.7 (+14)	83.9 (+12)	1.67 (-23)	1642 (-11)	0.59 (+48)
	180	3 (-67)	3 (-67)	39 (-20)	0.54 (+32)	1.21 (+1)	0.95 (-1)	84.1 (+19)	80.7 (+7)	1.98 (-9)	1784 (-4)	0.47 (+18)
360	2 (-78)	3 (-67)	38 (-22)	0.54 (+32)	1.20 (0)	0.97 (+1)	86.4 (+22)	84.1 (+12)	2.01 (-7)	1654 (-11)	0.59 (+48)	
5	0	6	6	45	0.70	1.19	1.00	67.5	80.1	2.25	348	0.56
	30	6 (0)	6 (0)	44 (-2)	0.85 (+21)	1.15 (-3)	0.96 (-4)	69.1 (+2)	92.1 (+15)	1.45 (-36)	319 (-8)	0.89 (+59)
	60	4 (-33)	3 (-50)	38 (-16)	0.79 (+13)	1.16 (-3)	0.96 (-4)	70.7 (+5)	88.9 (+11)	1.54 (-32)	365 (+5)	0.65 (+16)
	180	3 (-50)	2 (-67)	36 (-20)	0.84 (+20)	1.20 (+1)	1.01 (+1)	76.4 (+13)	80.4 (0)	1.75 (-22)	329 (-5)	0.74 (+32)
360	3 (-50)	2 (-67)	31 (-31)	0.84 (+20)	1.20 (+1)	0.99 (-1)	84.7 (+25)	82.4 (+3)	1.96 (-13)	317 (-9)	0.89 (+59)	
Valori di riferimento												
	0-9	0-9	0-60	1.16±0.25	1.21±0.02	0.97±0.10	76.4 ± 10.2	87.2 ± 11.3	2.49 ± 0.57	27.2 ± 11.3	1.31 ± 0.35	

TIO: osteomalacia oncogenica. P: paziente. Pain score: valutazione quantitativa del dolore [39]. Med score: valutazione quantitativa del trattamento analgesico [39]. Weak score: valutazione quantitativa del tono e trofismo muscolare [40-41]. iPTH: paratormone molecola intatta. FGF-23: fibroblast growth factor-23. TmPi/GFR: soglia del riassorbimento tubulare renale massimo dei fosfati, corretto per la clearance della creatinina [34]. I dati ai tempi 30, 60, 180 e 360 sono espressi come valore assoluto (percentuale di variazione dal tempo 0). I valori di riferimento sono espressi come intervallo di riferimento per Pain, Med e Weak scores e come media \pm deviazione standard per le altre variabili. Questi ultimi valori sono stati determinati in 40 controlli sani comparabili ai pazienti per sesso, indice di massa corporea ed età. Nei pazienti 1 e 2 il tumore causale la TIO è stato identificato e rimosso chirurgicamente. I pazienti 3, 4 e 5 sono stati trattati farmacologicamente con calcitriolo (1-3 μ g/die) e fosfati (2 g/die, divisi in 4 dosi) [1]

Tabella 2 – Parametri di turnover osseo nei pazienti con TIO

P	Tempo (die)	L2-L4 BMD (g/cm ²)	RANKL (pmol/L)	OPG (pmol/L)	RANKL/ OPG	CathK (pmol/L)	bALP (µg/L)	ICTP (nmol/L)	UHP/cre (µmol/mmol)
1	0	0.28	0.49	3.15	0.16	1.8	57.4	23.5	23.5
	30	0.36 (+29)	0.50 (+2)	3.11 (-1)	0.16 (0)	1.9 (+6)	64.5 (+12)	15.7 (-33)	14.6 (-38)
	60	0.42 (+50)	0.50 (+2)	3.09 (-2)	0.16 (0)	2.0 (+11)	67.1 (+17)	15.4 (-34)	14.6 (-38)
	180	0.85 (+204)	0.87 (+78)	3.05 (-3)	0.28 (+75)	2.5 (+39)	32.4 (-44)	19.1 (-19)	17.7 (-25)
	360	1.02 (+264)	1.15 (+135)	3.04 (-3)	0.38 (+138)	2.9 (+61)	21.7 (-62)	21.3 (-9)	20.7 (-12)
	0	0.41	0.54	3.49	0.15	1.7	36.8	29.1	35.2
2	30	0.48 (+17)	0.54 (0)	3.37 (-3)	0.16 (+7)	1.7 (0)	51.7 (+40)	22.2 (-24)	27.4 (-22)
	60	0.61 (+49)	0.55 (+2)	3.24 (-7)	0.17 (+13)	1.8 (+6)	53.2 (+45)	21.7 (-25)	26.4 (-25)
	180	0.74 (+80)	0.85 (+57)	3.19 (-9)	0.27 (+80)	2.4 (+41)	37.2 (+1)	23.2 (-20)	27.1 (-23)
	360	0.98 (+139)	1.32 (+144)	3.12 (-11)	0.42 (+180)	3.0 (+76)	24.3 (-34)	27.1 (-7)	30.4 (-14)
	0	0.62	0.71	4.17	0.17	1.9	31.3	22.1	22.7
	30	0.62 (0)	0.70 (-1)	4.09 (-2)	0.17 (0)	1.9 (0)	44.2 (+41)	18.4 (-17)	18.5 (-19)
3	60	0.70 (+13)	0.72 (+1)	3.98 (-5)	0.18 (+6)	2.0 (+5)	42.1 (+35)	18.7 (-15)	18.1 (-20)
	180	0.79 (+27)	0.85 (+20)	3.91 (-6)	0.22 (+29)	2.6 (+37)	32.1 (+3)	20.4 (-8)	20.1 (-11)
	360	0.85 (+37)	0.91 (+28)	3.86 (-7)	0.24 (+41)	2.9 (+53)	23.8 (-24)	21.7 (-2)	20.7 (-9)
	0	0.21	0.31	3.24	0.10	1.5	46.5	34.9	36.8
	30	0.25 (+19)	0.31 (0)	3.21 (-1)	0.10 (0)	1.6 (+7)	52.9 (+14)	19.5 (-44)	20.1 (-45)
	60	0.27 (+29)	0.32 (+3)	3.19 (-2)	0.10 (0)	1.6 (+7)	54.5 (+17)	20.8 (-40)	21.2 (-42)
4	180	0.30 (+43)	0.47 (+89)	3.17 (-2)	0.15 (+50)	2.1 (+40)	37.1 (-20)	22.4 (-36)	23.4 (-36)
	360	0.37 (+76)	0.89 (+187)	3.17 (-2)	0.28 (+180)	2.8 (+87)	27.4 (-41)	21.7 (-38)	24.3 (-34)
	0	0.52	0.51	2.85	0.18	1.9	52.5	28.0	27.9
	30	0.65 (+25)	0.50 (-2)	2.78 (-2)	0.18 (0)	2.0 (+5)	61.7 (+18)	17.4 (-38)	17.7 (-37)
	60	0.71 (+37)	0.52 (+2)	2.67 (-6)	0.19 (+6)	2.0 (+5)	62.4 (+19)	18.1 (-35)	18.4 (-34)
	180	0.75 (+44)	0.81 (+59)	2.61 (-8)	0.31 (+72)	2.4 (+26)	41.1 (-22)	20.2 (-25)	20.1 (-28)
360	0.79 (+52)	0.94 (+84)	2.57 (-10)	0.36 (+100)	2.6 (+37)	29.9 (-43)	25.1 (-10)	22.3 (-20)	
<i>Valori di riferimento</i>									
	<i>1.09 ± 0.04</i>	<i>1.05 ± 0.23</i>	<i>2.87 ± 0.54</i>	<i>0.36 ± 0.11</i>	<i>3.48 ± 0.87</i>	<i>17.5 ± 6.7</i>	<i>23.3 ± 3.5</i>	<i>24.6 ± 5.1</i>	

TIO: osteomalacia oncogenica. P: paziente. BMD: densità minerale ossea; RANKL: ligando del recettore attivatore il fattore nucleare NF- κ B; OPG: osteoprotegerina; CathK: catepsina K; bALP: isoenzima osseo della fosfatasi alcalina; ICTP: Telopeptide C-terminale del collagene di tipo I; UHP/cre: idrossiprolina urinaria/creatinina urinaria. I dati per i tempi 30, 60, 180 e 360 sono espressi come valore assoluto (percentuale di variazione dal tempo 0). I valori di riferimento sono stati determinati in 40 controlli sani appaiati ai pazienti per sesso e per età e sono espressi come media \pm deviazione standard. Nei pazienti 1 e 2 il tumore causa della TIO è stato identificato e rimosso chirurgicamente. I pazienti 3, 4 e 5 sono stati trattati farmacologicamente con calcitriolo (1-3 μ g/die) e fosfati (2 g/die, divisi in 4 dosi) [1]

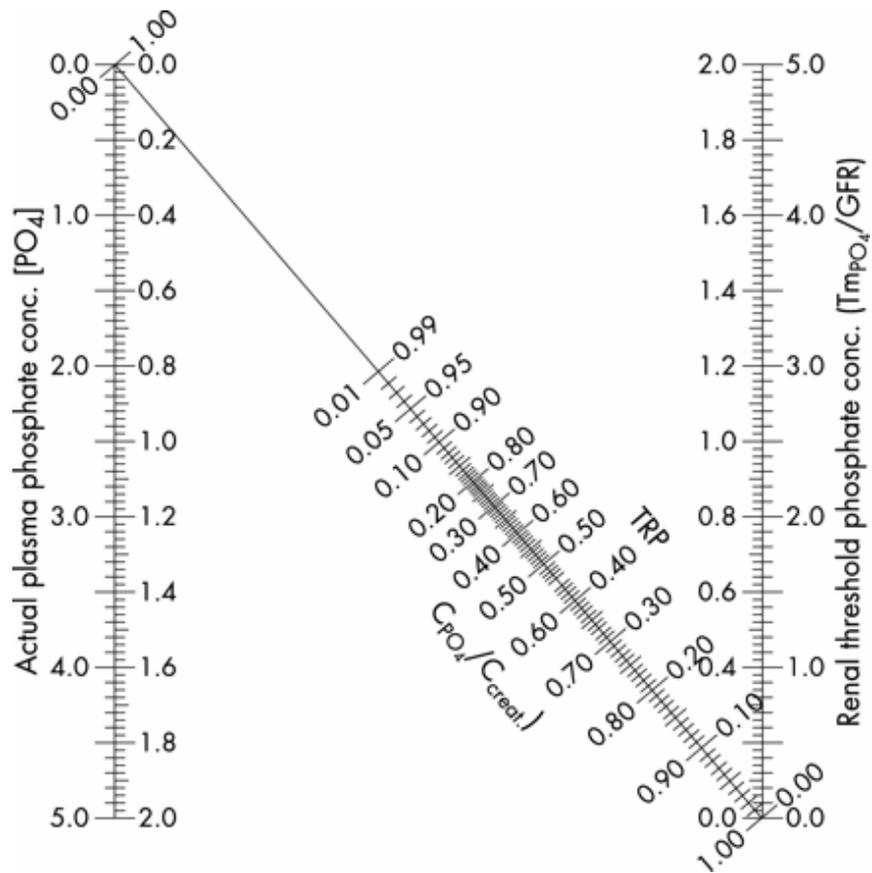


Figura 1.

Nomogramma per il calcolo della soglia massima di riassorbimento tubulare dei fosfati, corretta per il filtrato glomerulare stimato con la clearance della creatinina, secondo Walton e Bijvoet [34]

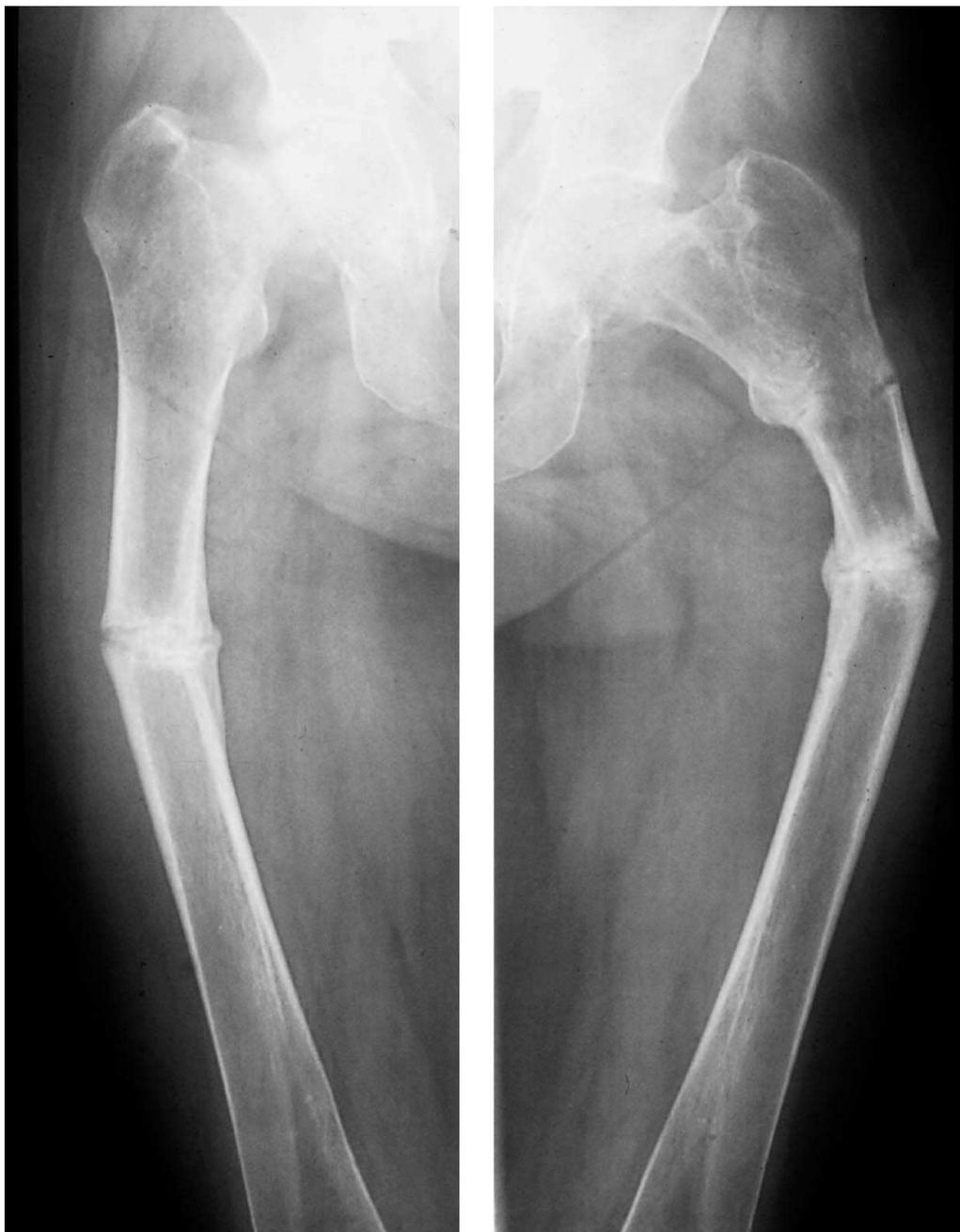


Figura 2.

Radiogramma in proiezione frontale di entrambi i femori del paziente n° 4. In questo paziente e nel paziente n° 5 la neoplasia alla base dell'osteomalacia oncogenica è rimasta non identificata nonostante siano stati eseguiti periodici controlli radiografici e scintigrafici.

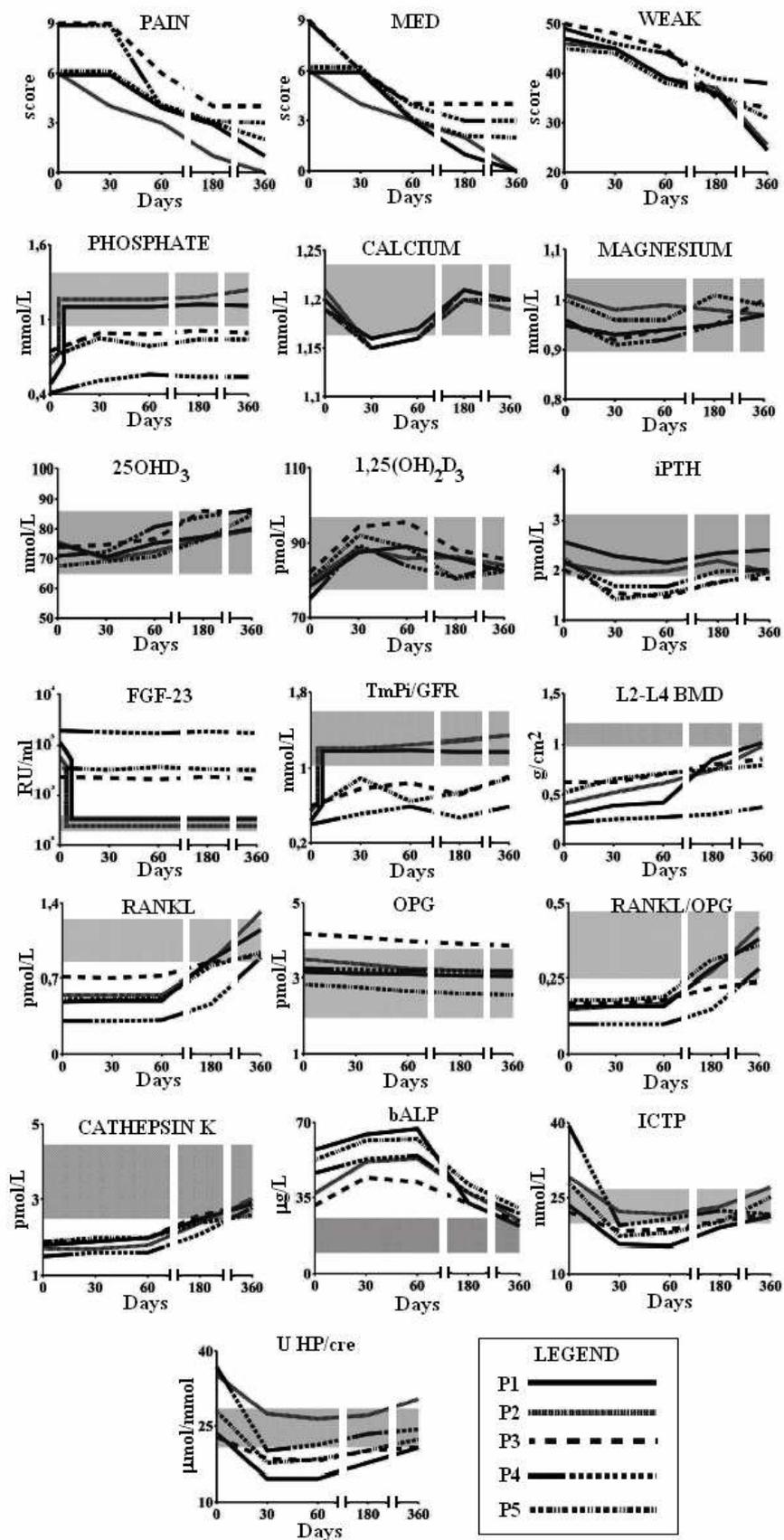


Figura 3.

Evoluzione temporale dei parametri clinici e biochimici valutati. Pain: valutazione quantitativa del dolore [39]. Med: valutazione quantitativa del trattamento analgesico [39]. Weak: valutazione quantitativa del tono e trofismo muscolare [40, 41]. FGF23: Fibroblast growth factor 23; TmPi/GFR: soglia massima di riassorbimento tubulare dei fosfati, corretta per il filtrato glomerulare stimato con la clearance della creatinina [34]; L₂-L₄ BMD: densità minerale ossea valutata tramite DXA a livello delle vertebre lombari L₂-L₄; RANKL: ligando del recettore attivatore del NF-κB; OPG: Osteoprotegerina; Cathepsin K: Catepsina K; bALP: isoenzima osseo della fosfatasi alcalina; ICTP: Telo peptide C-terminale del collagene di tipo I; UHp/Crea: rapporto idrossiprolina/creatinina urinarie.

Le aree grigie rappresentano il valore medio \pm 1 deviazione standard di ogni parametro determinati in gruppo di 40 soggetti sani di controllo, comparabili per età, sesso e indice di massa corporea ai soggetti con TIO. Nei pazienti 1 e 2 il tumore causa della TIO è stato identificato e rimosso chirurgicamente. I pazienti 3, 4 e 5 sono stati trattati farmacologicamente con calcitriolo (1-3 µg/die) e fosfati (2 g/die, divisi in 4 dosi) [1].

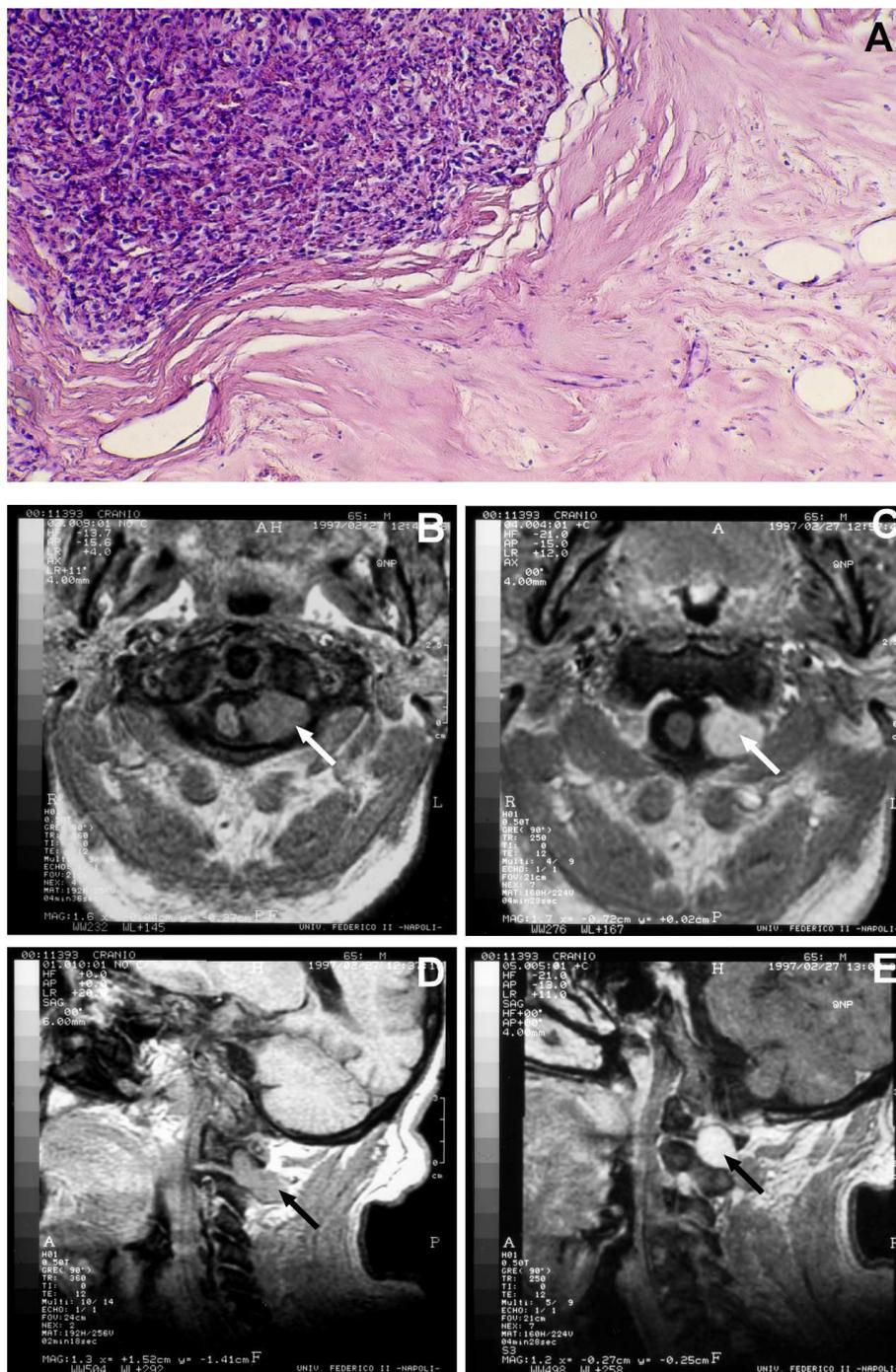


Figura 4.

Nel paziente n°1 il tumore causale la TIO è stato identificato ed rimosso chirurgicamente. La parte A) della figura mostra un preparato istologico del tumore: si tratta di variante ipercellulare del tumore mesenchimale tipo PMTMCT

(Phosphaturic Mesenchimal Tumor Mixed Connective Tissue variant) nel quale sono indicati con le frecce gli elementi vascolari tipo emangiopericitoma (colorazione ematossilina-eosina; ingrandimento originale x25).

Le parti B), C), D), ed E) della figura mostrano le immagini alla risonanza magnetica del tumore in proiezione assiale (B e C) e sagittale (D ed E) [prima (B e D) e dopo (C ed E) iniezione di mezzo di contrasto paramagnetico]. Dopo l'escissione de tumore, localizzato nella fossa cranica posteriore, i livelli serici di fibroblast growth factor 23 sono ritornati nei limiti dei valori di riferimento.

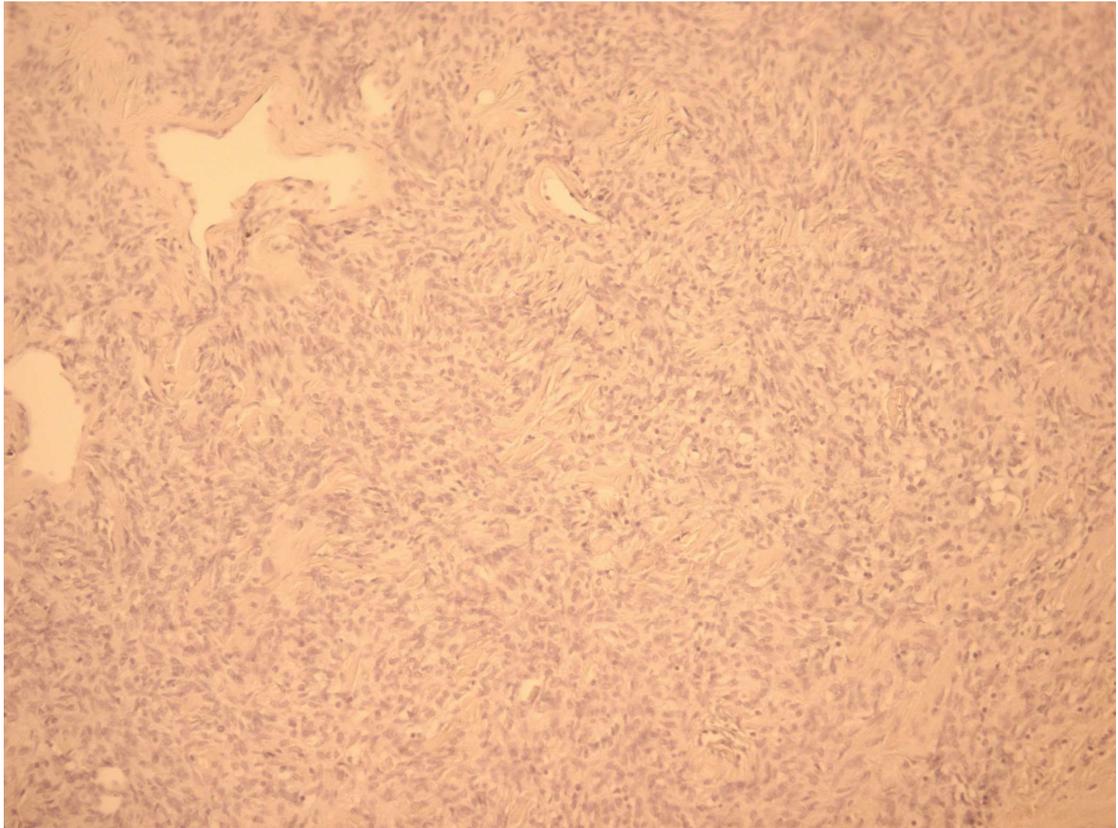


Figura 5.

Preparato istologico del tumore causale la TIO nel paziente n° 2: si tratta di un fibroma ossificante tipo PMTMCT (Phosphaturic Mesenchymal Tumor Mixed Connective Tissue variant) nel quale sono presenti elementi vascolari tipo emangiopericitoma (colorazione ematossilina-eosina; ingrandimento originale x40). Macroscopicamente, il fibroma si presentava come una massa ovale di 4 x 5 cm localizzata sulla superficie laterale della coscia sinistra, 8 cm al di sopra del ginocchio. *In situ* non erano evidenti segni di flogosi



Figura 6.

Paziente n° 3. Risonanza magnetica del rachide *in toto* in proiezione sagittale prima (A) e dopo (B) iniezione di mezzo di contrasto paramagnetico. Sono evidenti diversi angiomi/emangiopericitomi vertebrali (freccie) probabilmente causali la TIO. La rimozione chirurgica è stata giudicata impossibile a causa della loro localizzazione intravertebrale.