



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO IN TECNOLOGIE INNOVATIVE NELLE MALATTIE
DELLO SCHELETRO, DELLA CUTE E DEL DISTRETTO ORO-
CRANIO-FACCIALE

Ciclo XXXIII

*MODIFICAZIONI OMEOSTATICHE DEL
FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 IN PAZIENTI
CON EMOCROMATOSI PRIMITIVA SOTTOPOSTI A
WHOLE BLOOD DONATION E VALUTAZIONE
DELLA LORO SALUTE SCHELETRICA*

Coordinatore Prof. Diego Ribuffo
Tutor Prof. Salvatore Minisola

Dottorando Luciano Colangelo
Matricola 1049713

INDICE

1. ABSTRACT	3
2. INTRODUZIONE	5
2.1. Emocromatosi	7
2.2. Genetica	8
2.3. Diagnosi	9
2.4. Clinica	11
2.5. Fibroblast growth factor 23	16
3. SCOPO DEL LAVORO	22
4. MATERIALI E METODI	24
4.1. Piano dettagliato della ricerca e delle procedure scientifiche	24
4.2. Analisi di laboratorio	25
4.3. Analisi della Bone Mineral Density (BMD)	26
4.4. Valutazione fratture	26
4.5. Analisi statistica	27
5. RISULTATI	28
5.1. Caratteristiche generali della popolazione	28
5.2. Caratteristiche biochimiche	29
5.3. Analisi densitometrica	37
5.4. Valutazione fratture	38
6. DISCUSSIONE	39
7. CONCLUSIONI	46
8. BIBLIOGRAFIA	48

1. ABSTRACT

Background: Il tessuto scheletrico è in grado di secernere diverse sostanze ormonali rilevanti per l'organismo.

Negli ultimi anni è stata posta una particolare attenzione nei confronti di un ormone secreto prevalentemente dagli osteociti, denominato *Fibroblast growth factor 23* (FGF23). L'FGF23 regola il metabolismo dei fosfati (azione fosfaturica) e del sistema della vitamina D (inibizione della conversione in prodotti attivi). La secrezione di questa sostanza è regolata anche da "meccanismi non scheletrici", tra i principali, l'assetto marziale, la flogosi e l'anemia.

Obiettivo: Valutare l'FGF23 in un modello *in vivo* rappresentato dall'Emocromatosi Primitiva (HE) in condizioni basali e dopo la procedura di donazione di sangue intero (*whole blood donation*).

Materiali e Metodi: Sono stati arruolati n= 26 soggetti affetti da HE e n= 19 donatori sani. FGF23 è stato valutato con entrambe le metodiche disponibili in commercio, ovvero misurando sia la componente intatta e biologicamente attiva (iFGF23), che la porzione C-terminale (cFGF23).

In aggiunta è stata effettuata una valutazione dell'assetto marziale completo, del metabolismo minerale e scheletrico comprensivo anche della misurazione della densità minerale scheletrica (BMD) e del rilievo di deformità vertebrali.

La popolazione oggetto dello studio è stata confrontata con donatori volontari sani (C).

Risultati: Non sono state rilevate differenze significative in merito al metabolismo calcio fosforico al baseline e dopo rivalutazione.

Per quanto concerne l'analisi di FGF23, non abbiamo riscontrato differenze dei livelli della porzione intatta tra i due gruppi al basale (HE0: iFGF23 54.27 ± 14.42 pg/mL vs C0: iFGF23 52.77 ± 17.63 pg/mL), né dopo la donazione

(HE1: iFGF23 54.70 ± 15.48 pg/mL vs C1: iFGF23 53.20 ± 15.88 pg/mL).

Invece è stata riscontrata una differenza nei livelli circolanti di cFGF23, che correlava in maniera significativa con i parametri dell'assetto marziale dopo la procedura di donazione ($p < 0,001$).

Il rapporto tra la porzione intatta e la porzione C-terminale (iFGF23/cFGF23 ratio) è rimasto costante, mentre i parametri dell'assetto marziale come atteso si riducevano dopo la *whole blood donation*.

Dalla valutazione densitometrica è emersa una lieve riduzione della BMD nel gruppo HE ($p = ns$).

Mediante valutazione morfometrica è stato rilevato il 20% di fratture vertebrali nel gruppo HE rispetto al 5% del gruppo di controllo ($p = ns$).

Conclusioni: Questo è il primo studio in cui è stato valutato l'FGF23 nell' HE. La valutazione di entrambe le componenti dell'FGF23 (intatta e C-terminale), unitamente all'assetto marziale ed alle sue variazioni dopo la procedura di *whole blood donation*, ha consentito di valutare il comportamento biologico di questo ormone al fine di incrementare le conoscenze nel campo dell'omeostasi dei fosfati. I dati rilevati consentono di affermare che l'FGF23 è influenzato dall'assetto marziale e come questo esercita un feedback sulla degradazione di FGF23, al fine di mantenere l'omeostasi dei fosfati e di prevenire la demineralizzazione scheletrica. In aggiunta è stato effettuato un *assessment* della compromissione scheletrica in una popolazione affetta da HE più giovane rispetto a quella analizzata finora in letteratura.

2. INTRODUZIONE

Il tessuto scheletrico oltre alle funzioni note, può essere considerato di fatto come un organo endocrino in grado di secernere sostanze ormonali rilevanti per l'omeostasi dell'organismo.

Negli ultimi anni è stata posta una particolare attenzione nei confronti di un ormone secreto prevalentemente dagli osteociti, denominato *Fibroblast growth factor 23* (FGF23). L'FGF23 è in grado di regolare il metabolismo dei fosfati (azione fosfaturica) e del sistema della vitamina D (inibizione della conversione in prodotti attivi).

Dall'esperienza personale maturata nella valutazione di tale sostanza in forme rare di sindrome paraneoplastiche (sostenute da neoplasie a localizzazione prevalentemente scheletrica), responsabili di un marcato difetto di mineralizzazione per l'ipersecrezione di FGF23 (*Tumor-induced osteomalacia*), si è voluto analizzare l'FGF23 anche in un contesto clinico differente.

Infatti, in letteratura sono stati esaminati diversi fattori in grado di influire sulla concentrazione di tale ormone; tra questi il decremento della funzione renale, il paratormone (PTH) e la concentrazione dei fosfati.

In aggiunta, numerose osservazioni sottolineano l'azione regolatoria di "meccanismi non scheletrici", quali, l'assetto marziale, la flogosi e l'anemia su tale sostanza.

La definizione di una eventuale relazione fisiopatologica potrebbe porre le basi eventualmente per future strategie terapeutiche.

L'obiettivo di questo progetto è stato quello di valutare le concentrazioni di FGF23 in pazienti affetti da emocromatosi primitiva (HE) rispetto ad un gruppo di controllo (C), unitamente alla valutazione del metabolismo minerale

scheletrico, alla valutazione della misurazione della densità minerale ossea (BMD) ed al rilievo di fragilità scheletrica.

Gli studi finora condotti hanno analizzato il ruolo dell'assetto marziale sulla secrezione di FGF23 in soggetti affetti da anemia sideropenica, sottolineandone prevalentemente il suo incremento.

Teoricamente, in un contesto di sovraccarico di ferro, rappresentato dall'HE, il risultato atteso sarebbe il riscontro invece di livelli soppressi di FGF23; tuttavia mediante un teorico meccanismo epcidina-dipendente, potrebbe invece riscontrarsi una eccessiva secrezione di FGF23 o una alterazione delle sue due porzioni (intatta e C-terminale), aprendo nuovi scenari sul suo ruolo nel metabolismo minerale e scheletrico in patologie da sovraccarico di ferro.

Tale studio potrebbe contribuire a chiarire, tramite una valutazione priva di fattori di confondimento, la precisa interazione che intercorre tra assetto marziale e FGF23. In aggiunta, potrebbero essere valutati ulteriori meccanismi fisiopatologici di danno d'organo, non ancora completamente chiariti, come l'esteso coinvolgimento articolare, in comune con molteplici patologie caratterizzate da accumulo di ferro (Fe).

2.1 EMOCROMATOSI

L'emocromatosi (HE) è un disordine ereditario comune del metabolismo del ferro, caratterizzato da una disregolazione intestinale del suo riassorbimento, a cui segue un eccessivo e dannoso sovraccarico marziale a carico di molteplici tessuti e, nel suo stadio più avanzato, allo sviluppo di gravi danni d'organo [1].

Classicamente gli organi maggiormente coinvolti sono rappresentati dal fegato, pancreas, cuore, ghiandole endocrine, cute ed articolazioni [1].

Tuttavia, il riconoscimento precoce di tale condizione ha consentito negli ultimi anni di apportare importanti strategie di prevenzione primaria, volte a prevenire il danno d'organo; esse sono rappresentate essenzialmente dal salasso e/o dalle periodiche donazioni di sangue intero (*whole blood donation*) [2].

Tali procedure generalmente consistono nella rimozione di una quantità di sangue compresa tra i 350 e i 450 mL (che può però variare a seconda del peso individuale e dalla frequenza delle donazioni) e sono cadenzate in base alla risposta individuale ed all'esito delle indagini biochimiche (fino al raggiungimento di livelli sierici target di ferritina ≤ 50 $\mu\text{g/L}$ pur mantenendo valori di Hb > 11 gr/dL) [1].

Nello specifico in Italia, un decreto del Ministero della Salute del 2 Novembre 2015 sulle "Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti", in uno degli allegati, stabilisce che *"i soggetti rilevati portatori di emocromatosi, con documentazione clinica di assenza di danno d'organo, possono essere accettati per la donazione di sangue intero. Il numero di donazioni nell'anno non deve essere superiore a 4 per l'uomo e per la donna non in età fertile, a 2 per la donna in età fertile"*.

Nel caso di danno d'organo conclamato, invece è possibile un approccio farmacologico specifico, caratterizzato dall'uso di chelanti del ferro, come la deferoxamina [2].

2.2 GENETICA

Il gene responsabile della malattia, detto HFE, è sito sul braccio corto del cromosoma 6, in prossimità del locus del gene HLA-A [1].

Esso è stato identificato negli Stati Uniti dall'osservazione di due mutazioni denominate C282Y e H63D, di cui la prima, in particolare, è stata riscontrata in più del 90% dei pazienti. Le due mutazioni più frequentemente riscontrate di questi due geni, provocano rispettivamente una la sostituzione dell'amminoacido 282 da Cisteina a Tirosina (Cys > Tyr), e l'altra dell'amminoacido 63 da Istidina ad Aspartato (His > Asp) [2].

La variante H63D può contribuire a una minoranza di casi di eterozigosi composta con C282Y (C282Y/H63D) ed è stata riscontrata in combinazione con altre cause di malattia epatica che contribuiscono al sovraccarico di ferro, come l'alcol, l'infezione da virus dell'epatite C (HCV) o steatosi epatica non alcolica (NAFLD) nel 15-20% [2].

Altre mutazioni puntiformi o delezione del gene HFE sono invece meno comuni. Infine, mutazioni di altri geni possono essere implicate nella patologia da sovraccarico di ferro e vengono classificate come forme non-HFE di emocromatosi (e.g. ferroportina, recettore 2 della transferrina, epcidina, geni HJV (emojuvelina co-recettore di BMP) [1, 3].

2.3 DIAGNOSI

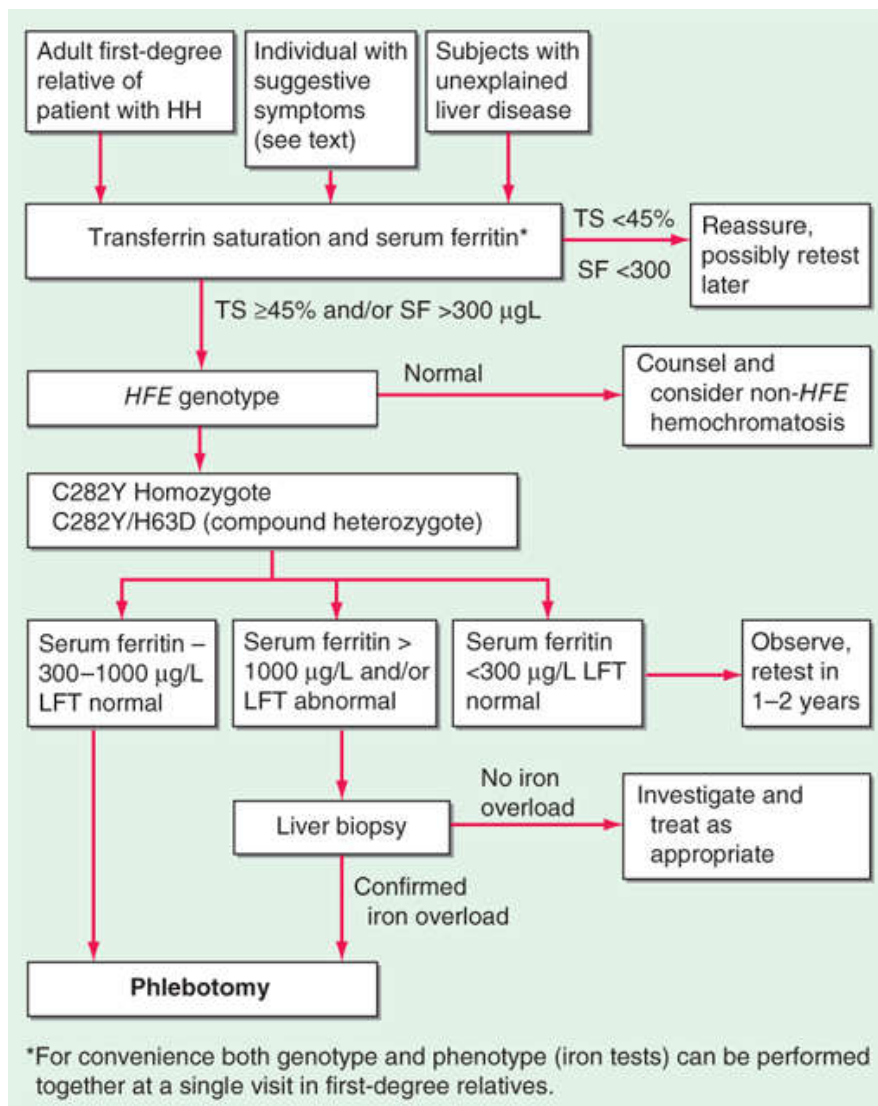
La diagnosi di HE viene in genere sospettata sulla base di alterazioni dei parametri dell'assetto marziale, degli esami di laboratorio ed avvalorata dal riscontro di aumento dei depositi di ferro a livello degli organi splancnici. La concentrazione del ferro soprattutto a livello epatico e pancreatico, viene facilmente quantizzata dalla risonanza magnetica (RM) in centri specializzati; si basa sull'accumulo di ferro nel parenchima che si riflette in una perdita di segnale nelle sequenze T2 pesate. In casi selezionati, è possibile eseguire la biopsia epatica, che consente di valutare in modo inequivocabile la presenza di sovraccarico di ferro (colorazione con il blu di Prussia) ed il grado di compromissione d'organo in cirrosi o l'evoluzione in epatocarcinoma [1, 3]. La conferma diagnostica definitiva richiede l'analisi genetica per l'identificazione delle mutazioni responsabili.

Segni o sintomi clinici indicativi di sovraccarico di ferro devono essere valutati in ciascuna delle seguenti condizioni:

- Eccessiva astenia,
- Malattia epatica cronica o cirrosi,
- Coinvolgimento cardiaco (insufficienza cardiaca o difetti di conduzione),
- Diabete mellito di tipo 2,
- Ipogonadismo, diminuzione della libido o disfunzione sessuale maschile,
- Iperpigmentazione cutanea,
- Artropatia con coinvolgimento soprattutto della seconda e della terza articolazione metacarpofalangea,
- Porfiria cutanea tarda,
- Un parente di primo o secondo grado con diagnosi di HE.

La diagnosi di HE viene altamente sospettata se unitamente agli aspetti clinici si associano i seguenti parametri di laboratorio (Figura 1):

- Anomalie inspiegabili dei test di funzionalità epatica;
- Elevata ferritina sierica (p. es., ≥ 300 ng/mL nei maschi o nelle femmine in postmenopausa; ≥ 200 ng/mL nelle femmine in premenopausa);
- Elevata saturazione della transferrina (TSAT; es. $\geq 45\%$)



Source: Joseph Loscalzo, Anthony Fauci, Dennis Kasper, Stephen Hauser, Dan Longo, J. Larry Jameson: Harrison's Principles of Internal Medicine, 21e Copyright © McGraw Hill. All rights reserved.

Figura 1: Flow chart diagnosi e management Emocromatosi. Harrison's Principles of Internal Medicine, 21e McGraw Hill.

2.4 CLINICA

A differenza del passato, in cui l'HE era gravata da una elevata mortalità (cirrosi epatica, epatocarcinoma, diabete mellito, disfunzioni endocrine multiple ed insufficienza cardiaca, etc.), oggi le complicanze di questa patologia si osservano raramente nella pratica clinica.

Ciò può essere attribuito ad una maggiore consapevolezza della malattia e, soprattutto, alla valutazione di routine dell'assetto marziale, in particolare della ferritina sierica. Allo stesso tempo, la scarsa specificità degli elevati valori di ferritina potrebbe ingannare clinici meno esperti e condurre ad un ritardo diagnostico [4].

Infatti, HE può essere asintomatica per diversi anni e l'assenza di sintomi può persistere fino ai 30-40 anni di età negli uomini ed ai 40-50 anni di età nelle donne con malattia associata a HFE [1].

In generale, i sintomi sono ampiamente variabili e spesso aspecifici, il che spiega il frequente ritardo diagnostico.

Una volta sospettata la diagnosi, la valutazione genetica è fondamentale per definire l'HE ma anche per adottare strategie di screening precoce nei familiari (*Figura 1*).

A ciò si affianca la valutazione di danno d'organo, generalmente conclamato per valori di ferritina $\geq 1000 \mu\text{g/L}$ [2] (*Figura 2*).

Come descritto precedentemente, la strategia terapeutica attuale per l'HE è la rimozione dell'eccesso di ferro al fine di prevenire il danno multiorgano.

Tuttavia, per ragioni etiche, i benefici riportati a seguito delle procedure periodiche di salasso-terapia e di donazioni di sangue, non sono stati mai dimostrati da studi clinici randomizzati [5, 6].

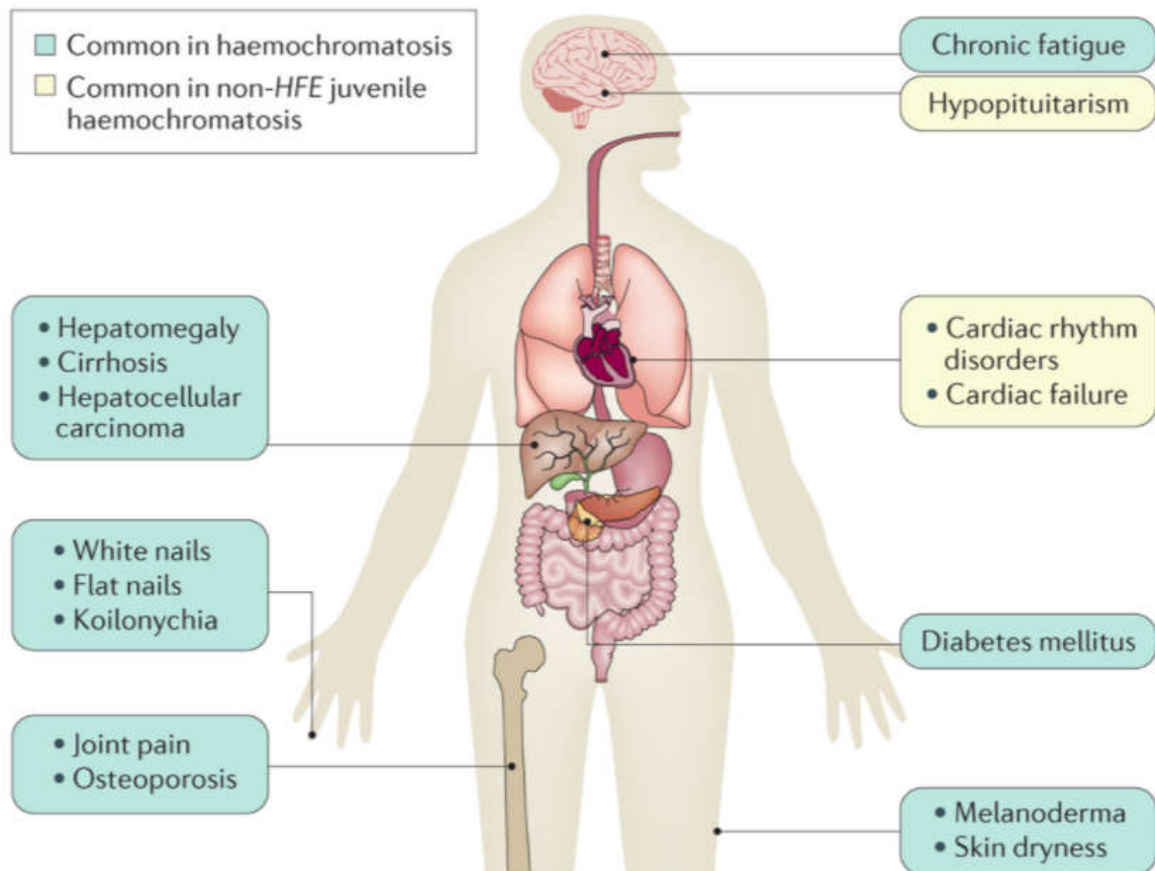


Figura 2: *Manifestazioni cliniche dell'Emocromatosi. Brissot P, Pietrangelo A, Adams PC, de Graaff B, McLaren CE, Loreal O. Haemochromatosis. Nat Rev Dis Primers. 2018.*

Tra le manifestazioni d'organo in corso di HE ben noto è il coinvolgimento articolare ed osseo. Tuttavia, l'attenzione clinica e la relativa letteratura scientifica si sono focalizzate prevalentemente sull'interessamento articolare. In uno studio condotto su una casistica di 199 pazienti con HE, è stato riportato un coinvolgimento articolare pari al 72,4%, con un esordio della sintomatologia intorno a 45.8 ± 13.2 anni [7].

Le sedi maggiormente coinvolte sono la seconda e la terza articolazione metacarpofalangea (MCP). I sintomi di solito differiscono da quelli dell'artrite infiammatoria che colpisce le articolazioni MCP ed in particolare l'Artrite

Reumatoide. Frequente è anche l'interessamento a carico delle articolazioni delle ginocchia e delle caviglie.

Diversi studi riportano un numero elevato di interventi di protesi articolari nei pazienti affetti da HE, rispetto alla popolazione generale [7]. Le sedi maggiormente interessate sono l'anca (84,6%), seguita dal ginocchio (11,5%). Tali dati risultano essere sovrapponibili anche con quelli della popolazione italiana [8].

L'interessamento articolare ha un impatto negativo sulla qualità di vita (QoL) ed è stato infatti descritto un impatto maggiore sulla QoL e sulla stessa sopravvivenza ($p= 0,05$), rispetto ai pazienti con altre complicanze dell'HE, quali cirrosi e diabete mellito [9].

Invece, nonostante le premesse precliniche, che hanno dimostrato la relazione di danno tra sovraccarico di ferro e tessuto scheletrico, pochi studi sono stati condotti in vivo al fine di valutare in maniera estensiva la fragilità scheletrica ed il metabolismo osseo dei pazienti affetti da HE.

Nella stesura di una review, relativa alle cause secondarie di osteoporosi secondaria [10], riportavo il dato conclamato in letteratura relativo all'alterazione della funzione degli osteoblasti in corso di sovraccarico di ferro. Nell'ambito di tale contesto, tuttavia l'osteoporosi è stata ricondotta a cause multifattoriali, principalmente legate alla disfunzione endocrina, gonadica e pancreatica [11]. Infatti, in altre patologie accomunate dall'eccesso di ferro (esempio Talassemia major), l'utilizzo di chelanti del ferro (deferossamina), si associa ad un miglioramento della densità minerale ossea (BMD), valutata in un follow-up di medio termine pari a 5 anni. L'incremento della BMD tuttavia veniva principalmente interpretato quale effetto secondario al parziale ripristino della funzione ghiandolare endocrina [12]. Date queste premesse, in caso di fragilità scheletrica, è opportuno effettuare anche la valutazione dell'assetto marziale ed il calcolo della

percentuale di saturazione della transferrina (TSAT) tra le possibili cause secondarie di osteoporosi [10].

La gravità del sovraccarico di ferro, definita da un livello di ferritina ≥ 1000 $\mu\text{g/l}$ alla diagnosi, è stata associata ad Osteoartrite ($p = 0,0005$), Osteoporosi ($p = 0,01$), presenza di protesi d'anca ($p = 0,04$), fratture del polso ($p = 0,002$) e fratture vertebrali ($p = 0,02$) in uno studio basato su un questionario autosomministrato [13].

La *Tabella 1* riporta i dati di pazienti affetti da HE pubblicati in letteratura fino ad Ottobre 2022 e nei quali è stata analizzata la complicità ossea in termini di riduzione della BMD e/o di fragilità scheletrica (fratture).

Dai dati riportati, si evince innanzitutto che la popolazione finora studiata è di età avanzata e soprattutto affetta da complicanze d'organo secondarie al sovraccarico di ferro. In sostanza, gli studi finora effettuati, volti ad analizzare la fragilità scheletrica nell'HE, hanno fotografato una popolazione che non rispecchia le caratteristiche attuali, dove screening precoce e trattamenti opportuni hanno modificato sostanzialmente la storia naturale di questa patologia.

In aggiunta, le valutazioni finora effettuate su tale popolazione non hanno preso in considerazione nuove molecole coinvolte attivamente nei processi di mineralizzazione, come il *Fibroblast growth factor* (FGF23).

AUTORI e riferimento bibliografico	NUMEROSITÀ CAMPIONARIA / ETÀ MEDIA (media ± SD)	TIPOLOGIA DI STUDIO/ METODOLOGIA	CONCLUSIONI
Diamond T. (1989) [14]	22 (M/F: 100/0) 49.7 ± 3.3 anni	Caso-controllo BMD, Radiografie Analisi istomorfometrica	Rilievo di fratture vertebrali pari al 20% rispetto al gruppo di controllo. Valutazione istomorfometrica con tetraciline con riscontro di una differenza significativa tra formazione ossea ed attività osteoblastica indiretta tra pazienti eugonadici trattati con salassoterapia versus pazienti eugonadici non trattati.
Eyres K.S. et al. (1992) [15]	1 (M/F 1/0) 34 anni	Case report BMD Analisi istomorfometrica	Numerose fratture vertebrali pregresse. Riduzione della BMD (0.683 g/cm ² , 63% inferiore rispetto a popolazione di controllo per sesso e range di età) Riscontro di deposito di ferro sul tessuto scheletrico (colorazione di Perls). Riduzione del turnover scheletrico.
Duquenne M. et al. (1996) [16]	1 (M/F: 1/0) 48 anni	Case report BMD Radiografie	OP severa BMD 0.54 gr/cm ² Multiple fratture vertebrali Complicanze d'organo, tra cui ipogonadismo associate a valori di Ferritina elevati (5000 mcg/L v.n.27-329)
Guggenbuhl P. et al (2005) [17]	38 (M/F: 100/0) 47.2 ± 9.4 anni	Coorte senza gruppo di controllo	Riduzione della BMD nei pazienti con ipogonadismo HE-relato rispetto a pazienti eugonadici (BMD 0.788 ± 0.16 vs 0.954 ± 0.14 g/cm ²)
Valenti L. et al. (2009) [18]	87 (M/F: 70/17) 50.8 + 11.3 anni	Coorte senza gruppo controllo	Diagnosi di Osteoporosi nel 25% e di Osteopenia nel 41% Fattori di confondimento: danno d'organo secondario ipogonadismo (34%) e cirrosi (85%) menopausa nel 47% della popolazione di sesso femminile
Richette P. et al. (2010) [13]	306 (M/F: 161/145) 60.1 ± 11.3 anni	Caso-controllo Questionari autosomministrati	Prevalenza maggiore di OP nei pazienti rispetto ai controlli: 23,3% vs 4,6% (aOR 7,3, IC 95% 3,2-17,0). Coinvolgimento osseo se Ferritina > 1000 µg/l: OA (p = 0,0005), OP (p = 0,01), presenza di protesi d'anca (p = 0,04), fratture del polso (p = 0,002) e fratture vertebrali (p = 0,02)
Jandl N. M. et al. (2020) [19]	10 (M/F: 6/4) Età mediana 58.5 anni	Studio retrospettivo Tomografia computerizzata quantitativa periferica ad alta risoluzione (HR-pQcT) Bone turnover markers	BMD non alterata Nessuna differenza nei bone markers analizzati: PTH, BALP; 25(OH)D, Idrossiprolina urinaria Riscontro significativo di osteonecrosi articolare. Rilievo di alterazione dell'osso corticale rilevato con la HR-pQcT Non alterazioni della trabecolatura ossea. Novità: valutazione della microarchitettura ossea mediante HR-pQcT
Nguyen C-D et al. (2020) [20]	93 (M/F: 43/50) 60 ± 11.2 anni	Cross-sectional study Periodo di osservazione: 2 anni	Riscontro di fragilità scheletrica 21 fratture in 16 pazienti (1 vertebrale, 7 distali avambraccio, 7 caviglia, 2 bacino, 1 omero, 3 periferiche) Analisi multivariata associava fragilità alla cirrosi epatica: OR 8.20 (1.74-38.69), p= 0.008

Tabella 1: studi presenti in letteratura fino ad Ottobre 2022 che hanno valutato le alterazioni scheletriche in termini di osteoporosi e fragilità scheletrica in pazienti affetti da Emocromatosi.

2.5 FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23

Il *fibroblast growth factor* (FGF23) è un ormone di origine scheletrica secreto prevalentemente dagli osteociti, implicato attivamente nel metabolismo dei fosfati e nel sistema della vitamina D [21].

L'FGF23 direttamente è in grado di modulare negativamente la trascrizione e la traslocazione di specifici co-trasportatori sodio-fosfato (NaPT2A e NaPT2C) responsabili nel processo di riassorbimento del fosfato a livello del tubulo contorto prossimale. In condizioni fisiologiche, i livelli sierici di fosfato e l'assorbimento intestinale dei fosfati, attivano un feedback negativo che stimola la secrezione di FGF23 [21, 22].

Inoltre, l'FGF23 down-regola l'enzima 1- α idrossilasi renale con conseguente riduzione dei livelli sierici di 1,25(OH)₂D [23] (Figura 3).

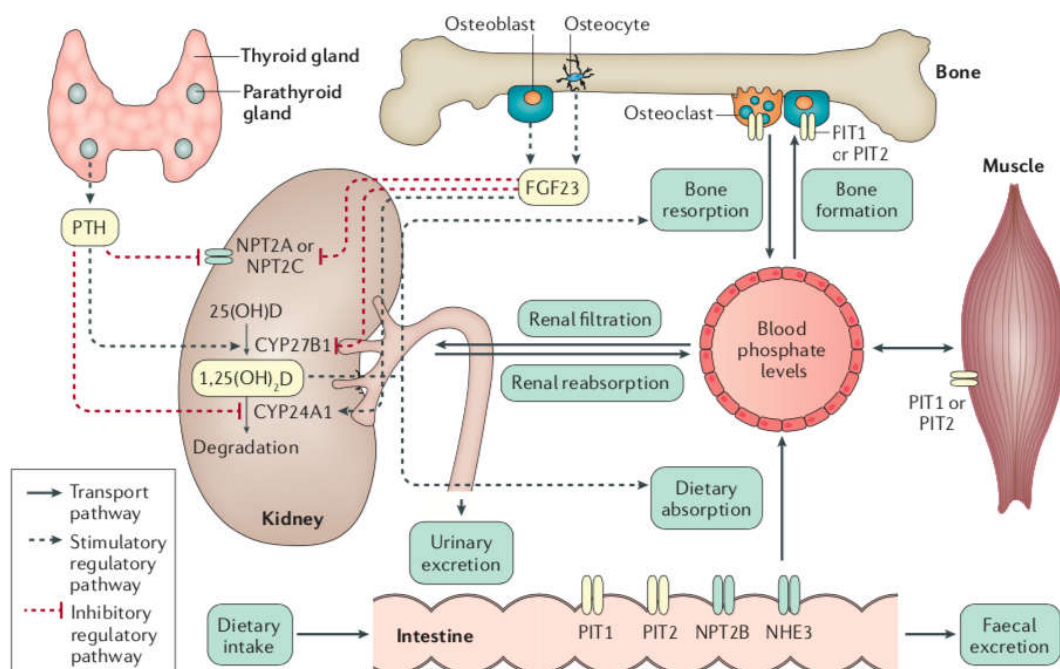


Figura 3: Rappresentazione schematica dell'omeostasi dei fosfati. Minisola, S. et al. *Tumour-induced osteomalacia. Nat. Rev. Dis. Primers* 3, 17044 (2017).

La regolazione dell'FGF23 è sottesa all'azione di diverse sostanze, che tramite meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali, sono in grado di modularne la sintesi [22].

Oltre ai molteplici fattori largamente descritti in letteratura (decremento della funzione renale, PTH, fosfati, etc.), recentemente una particolare attenzione è stata posta nei confronti di "fattori non scheletrici" in grado di influenzare la sintesi di FGF23. Questi sono rappresentati principalmente dall'assetto marziale, dalla flogosi e dall'anemia [24].

Nello specifico, particolare interesse è volto a valutare l'associazione tra livelli di FGF23 ed assetto marziale.

Di notevole rilevanza, a dimostrazione del ruolo del ferro sull'omeostasi scheletrica, è il lavoro di Imel e Coll., che ha dimostrato come la supplementazione marziale in una piccola coorte di pazienti affetti da rachitismo ipofosforemico autosomico dominante (ADHR), si è dimostrata efficace nel normalizzare i livelli di FGF23, con una contestuale correzione dell'ipofosfatemia [25].

La carenza di ferro infatti è in grado di incrementare i processi molecolari implicati nella trascrizione e traduzione cellulare con incremento della sintesi proteica di FGF23. Nello specifico, la forma biologicamente attiva, in grado di influenzare il metabolismo dei fosfati, è rappresentata dalla forma intatta (i-FGF23), mentre la porzione C-terminale, compete con la forma attiva per il legame con il recettore FGFR, inibendone pertanto il signaling. Quindi, è stato anche proposto che un'alterazione iFGF23/cFGF23 ratio, possa essere il meccanismo coinvolto nell'incremento dei livelli sierici di iFGF23. Le principali citochine pro-infiammatorie (TNF, IL-1 β e IL-6), mediante un processo mediato dalla furina (enzima appartenente alla classe delle idrolasi che catalizza il rilascio di proteine mature a partire da precursori) e dall'epcidina (principale regolatore del controllo dell'assetto marziale attraverso il

sistema reticoloendoteliale), potrebbero alterare il clivaggio del sistema FGF23, a favore di un incremento della porzione intatta. La valutazione di entrambe le componenti (iFGF23 e cFGF23) è importante in quanto un'alterazione dell'iFGF23/cFGF23 ratio esplicherebbe una potenziale inefficacia del signaling cellulare [26] (Figura 4).

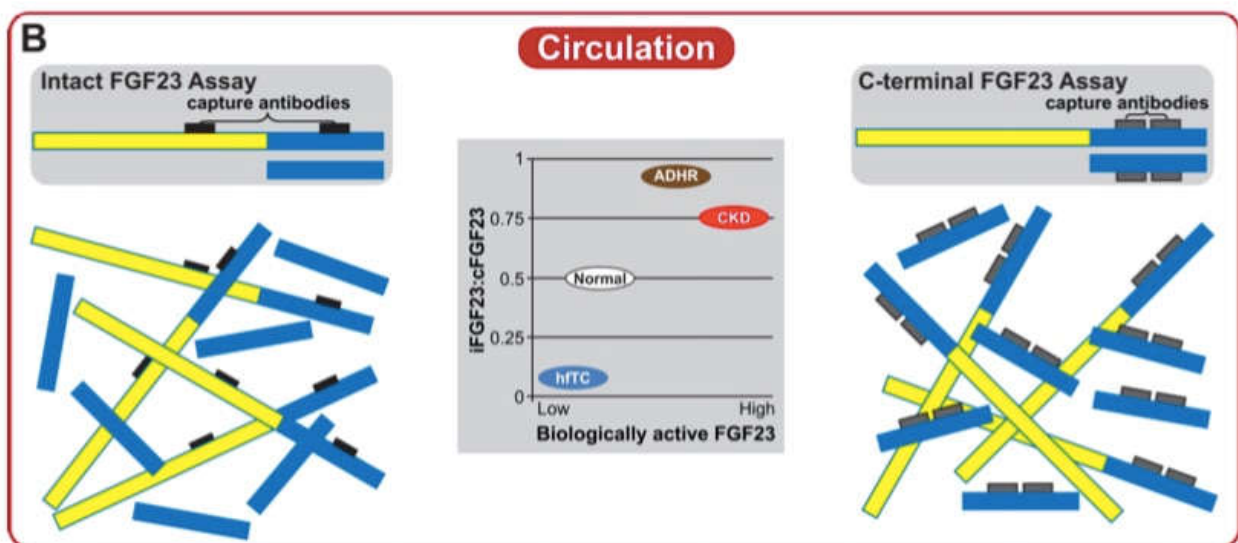


Figura 4: Differenti modalità di determinazione delle diverse molecole di FGF23 presenti in commercio e rationale dell'utilizzo del rapporto iFGF23/cFGF23 in differenti scenari clinici. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2014 July ; 23(4): 411–419.

Inoltre, una riduzione della concentrazione di Fe, indurrebbe l'attivazione del pathway von Hippel-Lindau/Hypoxia-inducible transcription factors (VHL/HIFs), con stimolo diretto alla secrezione di FGF23 [27]. Tra i fattori di trascrizione inducibili dall'ipossia, in particolar modo è stato dimostrato come HIF-1 α sia un potente fattore di trascrizione di FGF23. La sua up-regolazione, in pazienti affetti da osteomalacia oncogenica, correla con un'eccessiva produzione di FGF23 [28].

Teoricamente, invece, una condizione patologica caratterizzata da un sovraccarico di Fe dovrebbe invece determinare la soppressione dei livelli di FGF23.

Una patologia, determinata geneticamente e caratterizzata da un progressivo accumulo di Fe nell'organismo, è l'Emocromatosi ereditaria o primitiva (HE). Un ruolo di particolare rilievo nei meccanismi fisiopatologici in tale condizione potrebbe essere svolto anche dall'FGF23. Pertanto, l'HE rappresenta un modello di notevole importanza ai fini clinici e biologici, per meglio definire l'azione dell'FGF23 in relazione all'assetto marziale.

Ad oggi gli studi condotti hanno descritto l'influenza del deficit di Fe sulla secrezione di FGF23, tuttavia i risultati ottenuti sono spesso contrastanti. Le ragioni possono essere ricondotte alla presenza di multipli fattori di confondimento, rappresentati soprattutto dalla presenza di insufficienza renale cronica [29, 30], la quale si associa ad un incremento dell'FGF23 già dallo stadio II KDIGO, quale regolatore negativo del *pool* sistemico dei fosfati. Infatti, nel cercare di valutare l'FGF23 in un modello privo di fattori di confondimento per una precisa valutazione dei dati, Collins MT e Coll., hanno effettuato uno studio, su pazienti affetti da una patologia ultra-rara (paraganglioma/somatostinoma syndrome), caratterizzata da un incremento dei livelli di eritropoietina (EPO) dovuta ad una mutazione a carico del gene HIF2a [31].

La patologia presa in esame di fatto rappresenta un modello clinico per valutare l'FGF23 in un contesto simile alla carenza di Fe per le premesse descritte sopra. Gli Autori hanno dimostrato la presenza di un'azione diretta dell'asse HIF/EPO sulla regolazione di FGF23; nello specifico hanno evidenziato un incremento della sua componente C-terminale [31].

Al contrario, ancora non è noto quale sia il comportamento biologico dell'FGF23 invece in contesti caratterizzati da sovraccarico di Fe.

E' ipotizzabile che in corso di HE geneticamente determinata, il comportamento dell'epcidina possa influire attivamente sulla concentrazione plasmatica di FGF23. Infatti, a dispetto del semplice sovraccarico marziale, l'epcidina è quasi sempre assente nell' HE in quanto la sua produzione non è stimolata dal sovraccarico marziale [32]. Tale alterazione è da ascrivere alla mutazione principale C282Y del gene HFE, in grado di determinare una grave distorsione ed instabilità strutturale della proteina HFE, con conseguente compromissione dell'espressione di HFE sulla membrana cellulare. In assenza di HFE il trasporto di Fe nel citoplasma procede senza regolazione negativa ed inoltre, anche se non ben noti i meccanismi molecolari, viene meno l'iper-espressione dell'epcidina, come se l'organismo fosse in carenza di Fe. In tal modo, la ferroportina non viene ad essere bloccata ed in ultima istanza il Fe viene assorbito con un progressivo accumulo ed insorgenza di danno tissutale [33].

In aggiunta è stato dimostrato, in modelli murini knockout per HFE^{-/-}, la presenza di una alterazione del signaling mediato dalla famiglia delle *bone morphogenic proteins* (BMPs) [34]. Tale sistema è inoltre fondamentale nella regolazione dell'espressione dell'epcidina [35]. Molte sono le sottoclassi di questa famiglia espresse a livello epatico, tra cui: Bmp2, Bmp4, Bmp5, Bmp6 e Bmp9 [14]. Tuttavia, tra queste solo le Bmp2 e la Bmp6 si sono confermate essere implicate nell'attivazione dell'epcidina in vivo [36].

Nell'HE è stata dimostrata una alterazione dell'espressione della Bmp2 a livello delle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici, con evidenza di una down-regolazione del pathway BMP-SMAD. Nello specifico l'alterazione di tale signaling e dei secondi messaggeri come SMAD7, si ripercuote sull'espressione dell'epcidina negli epatociti [35, 36].

Inoltre, come dimostrato da studi effettuati in vitro, mediante l'utilizzo di ferrochelanti, la down-regolazione dell'epcidina si correla ad un incremento

dei livelli di HIF, che a sua volta funge da promoter dell'attivazione del gene dell'FGF23 [27, 28].

Alla luce dei meccanismi sopra descritti, in particolar modo relativi all'epcidina, si potrebbe rilevare invece un comportamento diverso rispetto alla teorica riduzione dei livelli di FGF23 attesa nei contesti di sovraccarico di Fe. In aggiunta, tale progetto potrebbe contribuire all'identificazione di meccanismi molecolari implicati da un punto di vista fisiopatologico in uno asse fegato-osso, ad oggi non ancora esplorato.

La teorica connessione di questo ormone con l'Emocromatosi secondo la mia tesi, parte anche dall'osservazione clinica che le infusioni di alcune formulazioni di ferro (ferro-carbossimaltoso), sono in grado di determinare fasi transitorie di ipofosfatemia anche severa (0.16 ± 0.77 mmol/L) [37].

Il meccanismo fisiopatologico attualmente proposto si basa sull'iperincrezione di FGF23 a seguito della somministrazione endovenosa di tali preparazioni ferrose. In aggiunta, periodiche infusioni di tali preparati, possono compromettere il metabolismo scheletrico determinando un incremento della fragilità, come sottolineato da una recente revisione della letteratura [37].

Ad oggi, non è stato tuttavia ancora stabilito se nell'ambito dell'HE, l'FGF23 possa essere coinvolto nei meccanismi fisiopatologici della compromissione scheletrica ed articolare.

3. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare i livelli di FGF23 in pazienti affetti da Emocromatosi primitiva (HE) arruolati consecutivamente in condizioni basali e dopo una settimana dalla procedura di donazione di sangue intero.

L'obiettivo principale del progetto è stato quello di individuare, in un modello privo di fattori di confondimento, la relazione fisiopatologica tra assetto marziale, eritropoiesi e metabolismo scheletrico, al fine di incrementare le conoscenze sulla biologia dell'FGF23.

La comprensione della relazione di questo ormone con altre sostanze potrebbe porre le basi per una migliore interpretazione dei livelli di FGF23 in differenti contesti clinici.

In aggiunta, è stata eseguita un'analisi contestuale dei principali parametri del metabolismo calcio-fosforico, unitamente ai dati clinici e strumentali mirati a valutare la fragilità scheletrica (densitometria ossea, Trabecular Bone Score e morfometria vertebrale).

La popolazione oggetto dello studio è stata infine confrontata con soggetti donatori sani arruolati consecutivamente e valutati per i medesimi parametri.

Descrizione della sequenza temporale del progetto (time schedule)
STUDY DESIGN

T0

Soggetti affetti da Emocromatosi

Anamnesi, Esame Obiettivo
Densitometria ossea
Fracture Vertebral Assessment
Prelievo ematico per: assetto marziale completo, emocromo, creatinina, Ca⁺⁺, fosforo, 25(OH)vitamina D, PTH, ALP, iFGF23, cFGF23

Donatori volontari (gruppo di controllo)

Anamnesi, Esame Obiettivo
Densitometria ossea
Fracture Vertebral Assessment
Prelievo ematico per: assetto marziale completo, emocromo, creatinina, Ca⁺⁺, fosforo, 25(OH)vitamina D, PTH, ALP, iFGF23, cFGF23

T1

Rivalutazione dopo 7 giorni:
assetto marziale, emocromo, funzione renale, iFGF23, cFGF23

Rivalutazione dopo 7 giorni:
assetto marziale, emocromo, funzione renale, iFGF23, cFGF23

4. MATERIALI E METODI

4.1 PIANO DETTAGLIATO DELLA RICERCA E DELLE PROCEDURE SCIENTIFICHE

Il presente studio è stato realizzato presso il Dipartimento di Scienze Cliniche, Internistiche, Anestesiologiche e Cardiovascolari, del Policlinico Umberto I (“Sapienza” Università di Roma), in collaborazione con il Centro Emotrasfusionale del medesimo nosocomio.

Il progetto dopo aver ricevuto parere favorevole da parte del Dipartimento di afferenza è stato sottoposto al giudizio del Comitato Etico dell’Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Umberto I, ricevendo parere favorevole (*riferimento 6679, Protocollo 0374/2022*).

Tutti i pazienti con HE arruolati avevano già ricevuto una diagnosi genetica-molecolare che confermava la presenza di mutazioni genetiche specifiche.

I pazienti studiati ed il gruppo dei donatori sani sono stati arruolati consecutivamente, in base all’accesso volontario per effettuare la procedura di donazione presso il Centro Emotrasfusionale.

CRITERI DI ESCLUSIONE:

- soggetti con valori di ferritina ≥ 1200 $\mu\text{g/L}$ (possibile fattore di confondimento per le complicanze multisistemiche descritte in questo stadio della patologia),
- pazienti in trattamento con ferro-chelanti,
- pazienti affetti da insufficienza renale cronica (IRC) \geq II stadio KDIGO.

Per ogni paziente, previa acquisizione del consenso informato, è stata raccolta un’accurata anamnesi relativa alla patologia di base con particolare riferimento alla valutazione di pregresse fratture scheletriche da fragilità.

I campioni ematici raccolti sono stati conservati a -80°C presso il laboratorio di ricerca diretto dal Prof. S. Minisola, per la successiva determinazione di iFGF23, cFGF23.

L'emocromo, l'analisi dell'assetto marziale completo, l'assetto del metabolismo minerale sono stati eseguiti ed analizzati dal centro emotrasfusionale e ripetuti dopo 7 giorni dal trattamento ferro-depletivo. (disegno dello studio nel *time schedule*).

4.2 ANALISI DI LABORATORIO

I livelli sierici di calcio ionizzato sono stati determinati utilizzando un elettrodo ione specifico (Nova 8; Nova Biochemical, Waltham, Massachusetts, USA) come precedentemente descritto [38].

Le concentrazioni sieriche totali di 25-idrossi vitamina D [25(OH)D] sono state rilevate attraverso RIA (DiaSorin Inc., Stillwater, Minnesota, USA); i coefficienti di variazione intra ed inter-saggio sono stati rispettivamente 8.1% e 10.2%.

I livelli sierici di PTH sono stati rilevati attraverso saggio immunoradiometrico (N-tact PTH SP; DiaSorin Inc., Minnesota, USA); i coefficienti di variazione intra e inter-saggio sono stati rispettivamente 3% e 5.5%.

I livelli plasmatici di FGF23 sono stati effettuati sia valutando la porzione intatta (iFGF 23) (DiaSorin, Stillwater, Minnesota, USA), con unità di misura pg/mL, che la porzione terminale (cFGF 23) (Biomedica GmbH), con unità di misura pg/mL.

Il metodo per la determinazione quantitativa dell'iFGF23 intatto è un test sandwich a 3 step basato sul principio della chemiluminescenza (CLIA).

Per la porzione intatta dell'FGF23, l'intervallo di normalità riportato in letteratura è compreso tra 23,2-94,4 pg/mL [39], il suo valore va comunque interpretato nel contesto clinico [21].

La determinazione invece della componente C-terminale è stata eseguita con metodica ELISA.

La valutazione dell'emocromo, della funzione renale, dell'assetto marziale completo e dell'asse PTH vitamina D, sono stati effettuati presso il laboratorio centrale del Policlinico Umberto I.

4.3 ANALISI DELLA BONE MINERAL DENSITY (BMD)

Usando il densitometro Lunar DXA System (Medical System Lunar GE, USA, software version: 17 [SP4]), sono state effettuate scansioni postero-anteriori del rachide lombare (da L4 a L1), del femore non dominante e del distretto ultradistale del radio per misurare la densità minerale ossea (BMD).

I dati densitometrici sono stati comparati in accordo a quelli della popolazione italiana [40].

Il Trabecular Bone Score (TBS), espressione della microarchitettura scheletrica, è stato calcolato dall'esame DXA standard della colonna vertebrale antero-posteriore da un software (TBS iNsign) a completamento dell'analisi DXA [41].

4.4 VALUTAZIONE FRATTURE

I dati relativi a fratture scheletriche sono stati ricavati da dati anamnestici, da cartelle cliniche portate in visione o desunte da precedenti interventi ortopedici.

La valutazione delle fratture vertebrali è stata effettuata sistematicamente mediante la valutazione semiquantitativa del Vertebral Fracture Assessment

(VFA), con la tecnica Dual-Energy X-Ray Absorptiometry (iDXA, Lunar GE, USA) [41].

L'analisi densitometrica e la valutazione delle fratture sono state eseguite da uno stesso operatore, specialista in radiologia, con esperienza nell'ambito delle patologie osteo-metaboliche e dello scheletro. In aggiunta, la valutazione è stata eseguita senza che l'operatore fosse a conoscenza del gruppo di appartenenza di ciascuno dei partecipanti allo studio.

4.5 ANALISI STATISTICA

I dati continui sono stati presentati come media \pm deviazione standard.

Le variabili categoriche sono state identificate con numeri ed espressi in percentuali.

Trattandosi di uno studio pilota e non essendo stato effettuato precedentemente uno studio analogo, non è stato possibile calcolare la potenza statistica al fine di definire la numerosità campionaria.

E' stata quindi eseguita un'analisi pre-post per dati appaiati sul campione di pazienti affetti da HE. Variazioni nei livelli dei parametri considerati, sono stati rilevati con test parametrici (t-test per dati appaiati) e non parametrici (Mann-Whitney test).

Infine, le variazioni riscontrate rispetto ai livelli basali, sono state confrontate con il gruppo dei controlli in un modello lineare ad effetti misti.

5. RISULTATI

5.1 CARATTERISTICHE GENERALI DELLA POPOLAZIONE

La *Tabella 2* illustra le caratteristiche e la composizione generale della popolazione affetta da HE e del gruppo di donatori volontari (C). Lo studio è stato condotto su n= 26 pazienti (24 maschi e 2 femmine), confrontati con un gruppo di soggetti sani arruolati consecutivamente, n= 19 (17 maschi e 2 femmine). Per il gruppo dei pazienti con HE, è stata stimata una durata di patologia al momento dell'inclusione nello studio pari a 37.65 anni.

	Pazienti con Emocromatosi (HE)	Controlli (C)
Età (aa)	43.80 ± 10.40	42.40 ± 12.80
Numerosità campionaria (n)	26	19
Sesso (M/F)	24/2	17/2
BMI (Kg/m ²)	26.40 ± 3.40	24.80 ± 2.90
CV (cm)	96.90 ± 9.20	93.10 ± 8.90

Tabella 2: Caratteristiche generali della popolazione. I valori sono espressi come media ± Deviazione standard (DS).

Nel gruppo dei pazienti, la diagnosi di HE è stata confermata geneticamente e le mutazioni rilevate sono espresse nella *Tabella 3*.

Mutazione rilevata	Frequenza
C282Y/C282Y	57.7%
C282Y/H63D	27.3%
H63D/H63D	15%

Tabella 3: Mutazioni genetiche rilevate nella popolazione oggetto dello studio affetta da Emocromatosi primitiva.

5.2 CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE

La *Tabella 4* riporta i dati biochimici della popolazione oggetto dello studio al baseline e dopo rivalutazione a 7 giorni, confrontati con la popolazione dei donatori sani.

Dalla valutazione dell'esame emocromitometrico, non vi erano importanti differenze basali tra i due gruppi, con una riduzione percentuale di circa il 5% dell'ematocrito nei pazienti con HE, sovrapponibile a quella dei donatori sani (4%) dopo la donazione di sangue intero (rimozione di una sacca di sangue intero pari a circa 450 mL).

Non sono state invece riscontrate alterazioni significative in merito al metabolismo calcio-fosforico, del PTH, né differenze della fosfatasi alcalina.

Anche se non ha raggiunto valori di significatività statistica, i soggetti con HE avevano livelli ridotti di 25(OH)vitamina D pari a 25.27 ± 7.44 ng/mL, rispetto a valori di 33.05 ± 13.14 ng/mL del gruppo di controllo; le due popolazioni

erano omogenee per il periodo stagionale dell'arruolamento ed in assenza di trattamento suppletivo.

Dati biochimici	HE (T0)	HE (T1)	Controlli (C0)	Controlli (C1)
Cr (mg/dL)	0.94 ± 01.14	0.93 ± 0.16	0.98 ± 0.13	1.00 ± 0.13
Clearance creatinina MDRD (mL/min)	93.91 ± 15.22	95.37 ± 17.18	89.2 ± 11.49	87.24 ± 14.08
Sideremia (v.n. 64.80 - 174.90 mcg/dL)	155.85 ± 53.44	114.37 ± 43.59	100.13 ± 20.41	71.02 ± 25.74
Transferrina (v.n. 2.15 - 3.65 g/L)	2.58 ± 0.48	2.53 ± 0.44	2.89 ± 0.45	2.92 ± 0.34
Ferritina (v.n. 30 - 400 mcg/L)	387.87 ± 313.74	296.42 ± 235.62	77.21 ± 67.20	52.11 ± 49.40
TSAT (%)	43.8 ± 16.33	32.23 ± 13.59	24.37 ± 5.10	17 ± 7.13
Calcemia (mg/dL)	9.91 ± 0.33	9.64 ± 0.38	9.89 ± 0.41	9.59 ± 0.36
Calcio ionizzato (v.n. 1.13 -1.33 mmol/l)	1.26 ± 0.04	1.26 ± 0.04	1.21 ± 0.05	1.23 ± 0.05
Fosfato (mg/dL)	3.27 ± 0.43	3.23 ± 0.50	3.27 ± 0.56	3.49 ± 0.60
25(OH)vitamina D (ng/mL)	25.27 ± 7.44	NA	33.05 ± 13.14	NA
PTH (v.n. 15 – 65 pg/mL)	44.32 ± 11.89	NA	42.52 ± 15.57	NA
ALP (v.n. 40 – 129 U/L)	70.46 ± 18.96	NA	68.84 ± 14.46	NA
Hb (gr/dL)	15.60 ± 1.01	14.49 ± 0.94	15.21 ± 1.23	14 .04 ± 1.48
GR (10 ⁶ /mm ³)	5.13 ± 0.41	4.66 ± 0.37	5.19 ± 0.39	4.77 ± 0.52
HTC (%)	48.4 ± 3.14	43.13 ± 3.19	47.63 ± 3.73	43.57 ± 4.26
GB (/mm ³)	5972 ± 1458	5723 ± 1793	6515 ± 1326	5968 ± 1246
PLT (10 ³ /mm ³)	203 ± 39.97	239 ± 48.34	210 ± 50.97	254 ± 67.88
i FGF 23(pg/mL)	54.27 ± 14.42	54.70 ± 15.48	52.77 ± 17.63	53.20 ± 15.88
c FGF 23 (pg/mL)	7.39 ± 2.98	9.04 ± 6.74	9.47 ± 6.71	13.84 ± 8.38
i FGF 23 / c FGF23 ratio	8.71 ± 5.30	8.73 ± 4.82	8.20 ± 5.84	5.32 ± 3.71
giorni intercorsi	7 ± 0.9		6.57 ± 0.74	

Tabella 4: Dati biochimici della popolazione oggetto dello studio al baseline e dopo rivalutazione espressi come media ± DS. T0 gruppo Emocromatosi al basale, T1 gruppo Emocromatosi alla rivalutazione, C0 gruppo controllo basale e C1 gruppo controllo alla rivalutazione.

Per quanto concerne i parametri dell'assetto marziale, le mediane di ferritina, TSAT e sideremia erano significativamente elevate nel gruppo Emocromatosi rispetto al gruppo dei controlli (*Figura 5*).

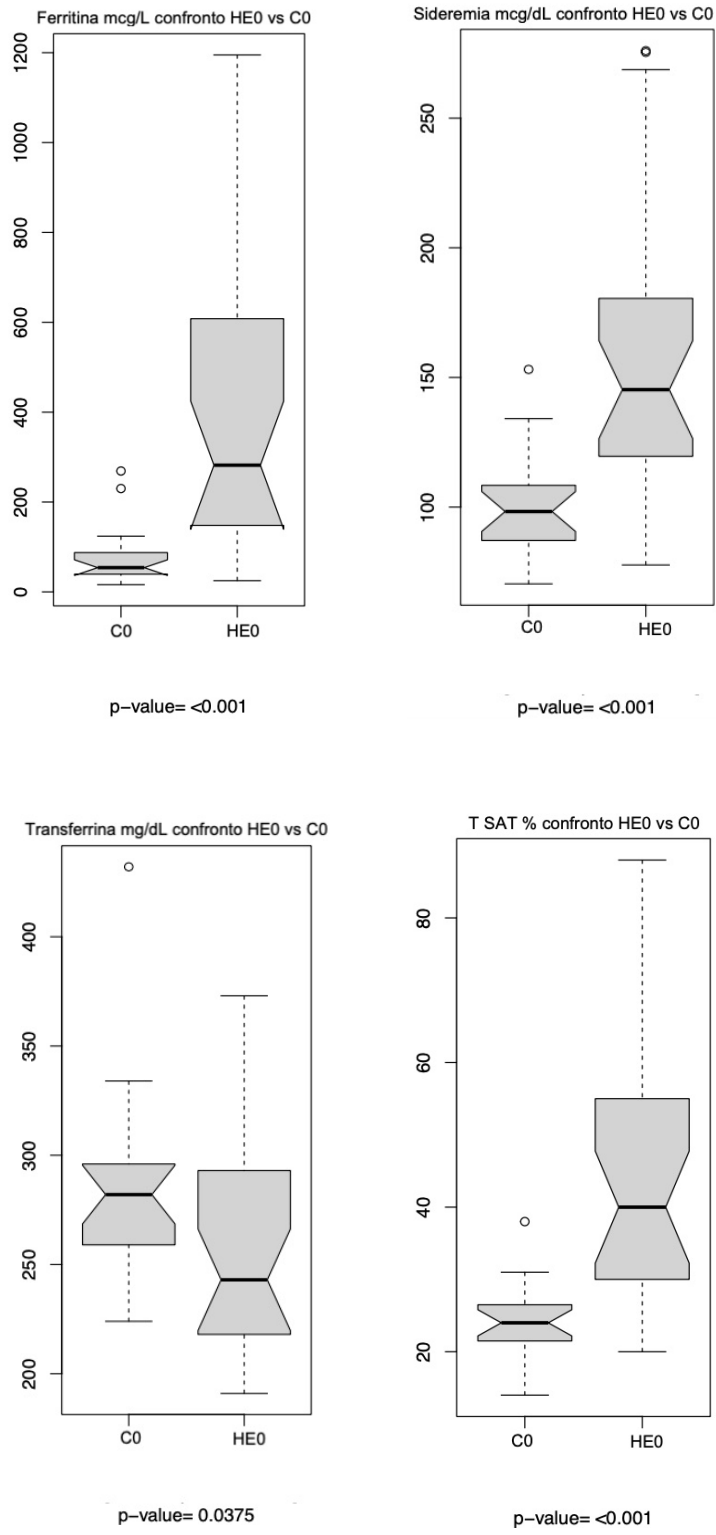


Figura 5: Boxplot assetto marziale gruppo emocromatosi (T0) vs gruppo controllo (C0) al basale.

Alla rivalutazione dopo 7 giorni dalla procedura di donazione, la TSAT e la sideremia sono risultate statisticamente ridotte nel gruppo HE, invece i livelli di ferritina non subivano tale modificazione (Figura 6).

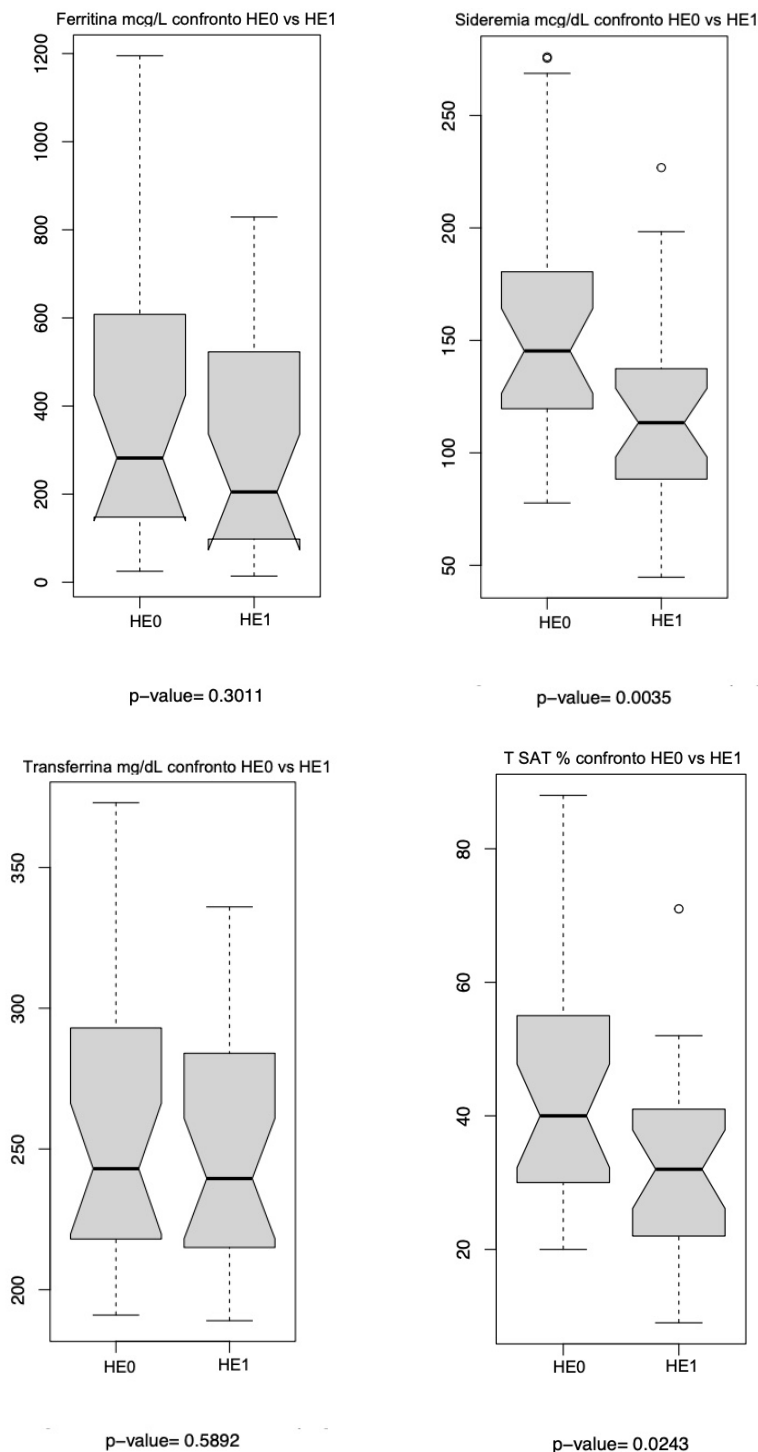


Figura 6: Boxplot assetto marziale gruppo emocromatosi al basale (T0) e dopo rivalutazione (T1).

E' stata inoltre valutata la correlazione tra assetto marziale e valori di FGF23 nelle sue due porzioni al basale per tutti i soggetti arruolati nello studio (Tabella 5) e dopo rivalutazione (Tabella 6); * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,005$, **** = $p < 0,001$.

	Ferritina..mcg.L.	Transferrina..mg.dL.	Sideremia..mcg.dL.	T.Sat.calcolata....	FGF23i..pg.mL.
Ferritina .mcg.L.					
Transferrina .mg.dL.	-0.26				
Sideremia .mcg.dL.	0.66****	-0.09			
T.Sat.calcolata....	0.64****	-0.47**	0.90****		
FGF23i .pg.mL.	-0.22	0.12	-0.18	-0.20	
FGF23c .pg.mL.	-0.18	0.26	-0.06	-0.13	-0.08

Tabella 5: Correlazione al basale.

	Ferritina..mcg.L.	Transferrina..mg.dL.	Sideremia..mcg.dL.	T.Sat.calcolata....	FGF23i..pg.mL.
Ferritina .mcg.L.					
Transferrina .mg.dL.	-0.35*				
Sideremia .mcg.dL.	0.43**	-0.29			
T.Sat.calcolata....	0.45**	-0.55****	0.94****		
FGF23i .pg.mL.	-0.15	0.00	-0.11	-0.11	
FGF23c .pg.mL.	-0.30*	0.43**	-0.37*	-0.40**	0.23

Tabella 6: Correlazione dopo rivalutazione.

In particolar modo per quanto riguarda il gruppo affetto da HE, abbiamo rilevato una correlazione statisticamente significativa tra sideremia e cFGF23 alla rivalutazione (*Grafico 1*).

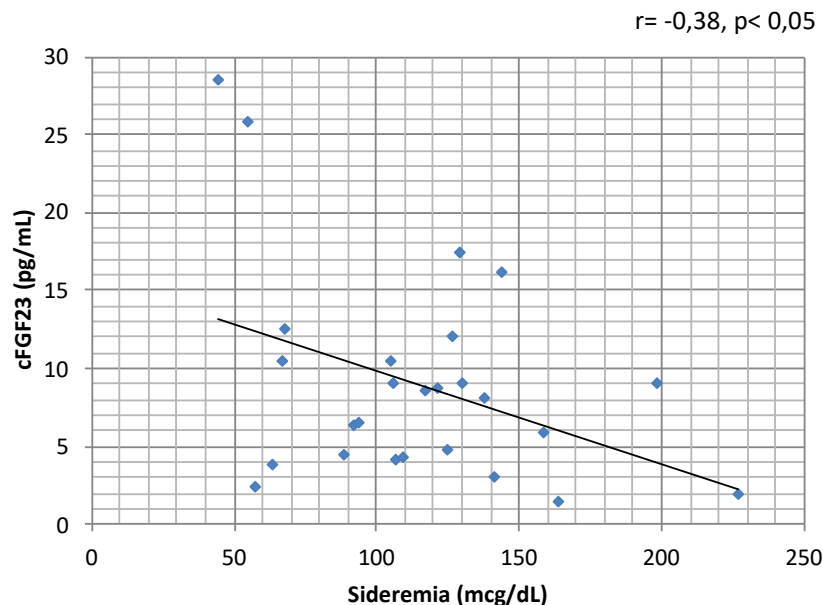


Grafico 1: Correlazione tra i valori di sideremia e cFGF23 nel gruppo Emocromatosi dopo rivalutazione.

In merito alla valutazione dei livelli di FGF23 abbiamo riscontrato delle differenze tra le due sue componenti analizzate (*Tabella 4*).

Nello specifico per quanto riguarda la porzione intatta, i livelli rilevati non differivano tra il gruppo dei pazienti affetti da Emocromatosi rispetto al gruppo di controllo, né sono state rilevate differenze a seguito della procedura di donazione di sangue intero, a cui è corrisposta una riduzione dei livelli di ferritina sierica, sideremia e transferrina.

Per quanto riguarda la porzione C-terminale, per entrambi gruppi i livelli plasmatici del frammento C-terminale sono aumentati alla rivalutazione (*Figura 7 e 8*).

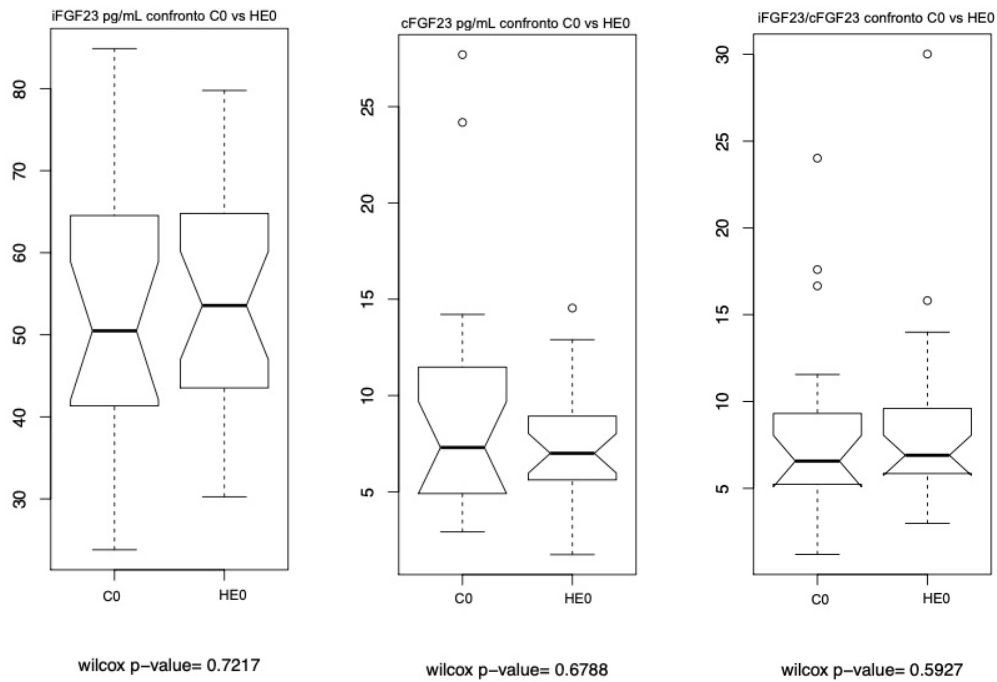


Figura 7: Boxplot livelli di iFGF23, cFGF23 e iFGF23/cFGF23 ratio nel gruppo Emocromatosi al basale (HE0) e gruppo di controllo al basale (C0)

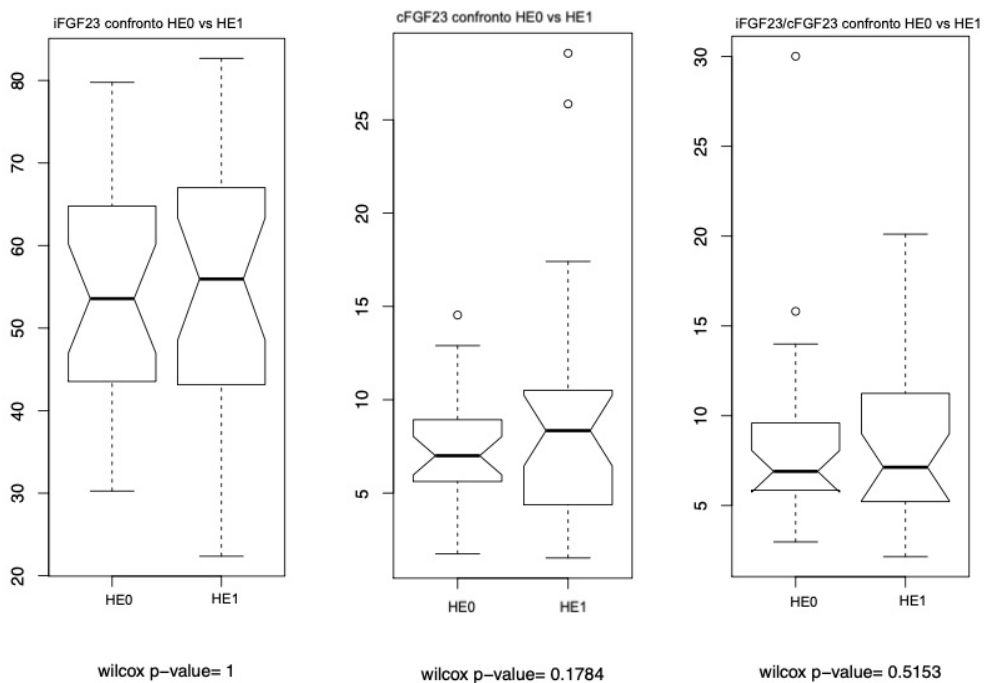


Figura 8: Boxplot livelli di iFGF23, cFGF23 e iFGF23/cFGF23 ratio nel gruppo Emocromatosi al basale (HE0) e gruppo Emocromatosi alla rivalutazione (HE1).

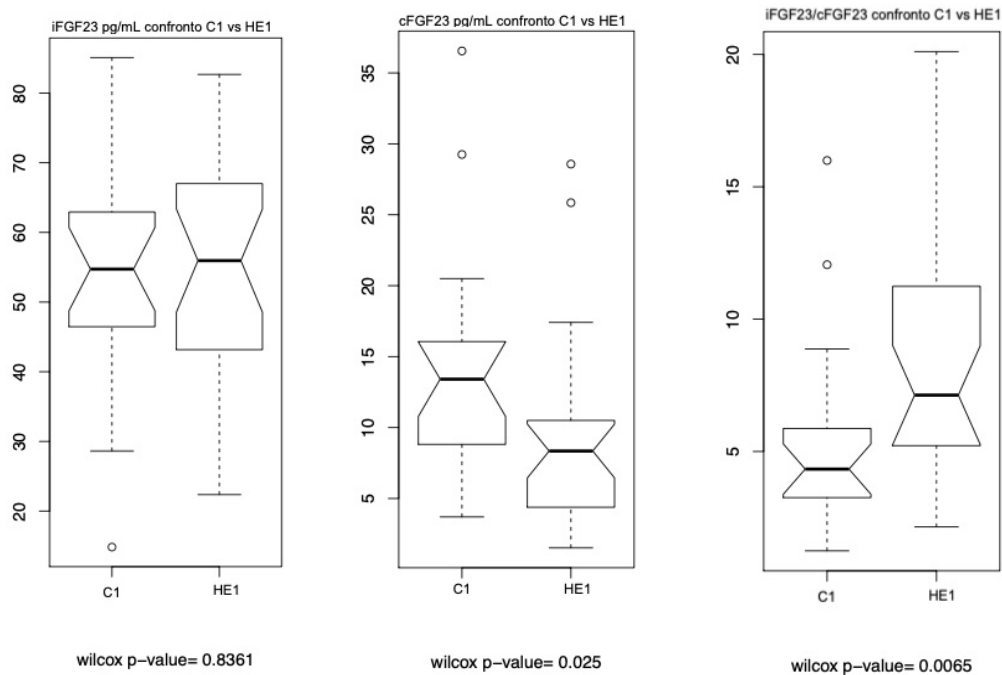


Figura 9: Boxplot livelli di iFGF23, cFGF23 e iFGF23/cFGF23 ratio nel gruppo Emocromatosi alla rivalutazione (HE1) e gruppo di controllo alla rivalutazione (C1)

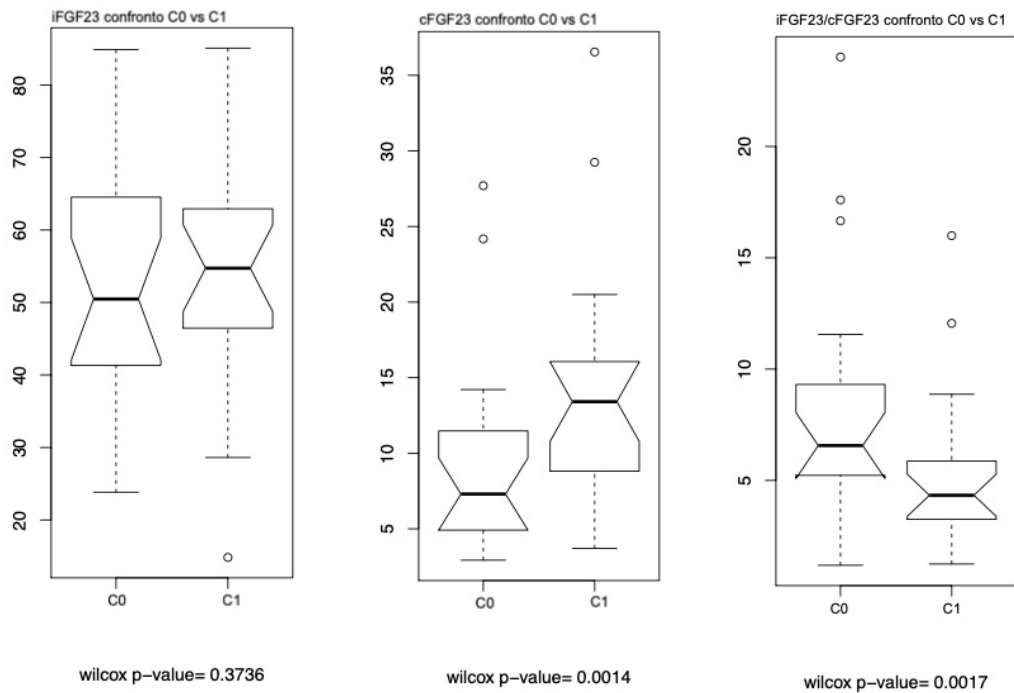


Figura 10: Boxplot livelli di iFGF23, cFGF23 e iFGF23/cFGF23 ratio nel gruppo controllo al basale (C0) e gruppo di controllo alla rivalutazione (C1)

5.3 ANALISI DENSITOMETRICA

Nella *Tabella 7* sono riportati i valori densitometrici dei pazienti e dei controlli, misurati su tre siti scheletrici (colonna lombare, femore non dominante e radio). I dati sono stati espressi in termini di BMD e Z score.

In aggiunta è stato calcolato il Trabecular Bone Score (TBS), espressione della microarchitettura scheletrica.

Nei pazienti affetti da HE è stato riscontrati una riduzione della BMD e dei valori di Z score in tutti i distretti ad eccezione del tratto prossimale del radio, rispetto alla popolazione di controllo (p= NS).

		EMOCROMATOSI (HE)	CONTROLLI (C)	p value
BMD (g/cm ²)				
	Lumbar spine	1.201 ± 0.15	1.249 ± 0.12	ns
	Femural Neck	0.970 ± 0.10	1.045 ± 0.15	ns
	Total Hip	1.040 ± 0.11	1.090 ± 0.14	ns
	Radius 1/3	0.950 ± 0.08	0.947 ± 0.09	ns
Z score				
	Lumbar spine	-0.4 ± 1.10	0.3 ± 0.98	ns
	Femural Neck	-0.4 ± 0.86	0.2 ± 0.90	ns
	Total Hip	-0.2 ± 0.90	0.3 ± 0.85	ns
	Radius 1/3	-0.2 ± 0.6	0.13 ± 0.90	ns
Trabecular Bone score (TBS)		1.462 ± 110	1.493 ± 83,4	ns

Tabella 7: Dati densitometrici e del TBS di entrambe le popolazioni in esame.

5.5 VALUTAZIONE FRATTURE

Nel 20% dei pazienti affetti da HE sono state rilevate deformità vertebrali alla valutazione morfometrica di grado lieve secondo i criteri classificativi di Genant, rispetto al 5% del gruppo di controllo ($p= ns$) (Figura 11). Nello specifico le fratture erano tutte localizzate nel tratto dorsale della colonna vertebrale, con un massimo tre fratture del tratto dorsale rilevate in due pazienti. In aggiunta dalla valutazione anamnestica sono state rilevate fratture da fragilità in siti periferici, verificatesi in assenza di traumi ad alto impatto energetico. Nello specifico il 19% dei pazienti con HE dichiarava fratture di Colles, rispetto al 5% del gruppo dei donatori sani.

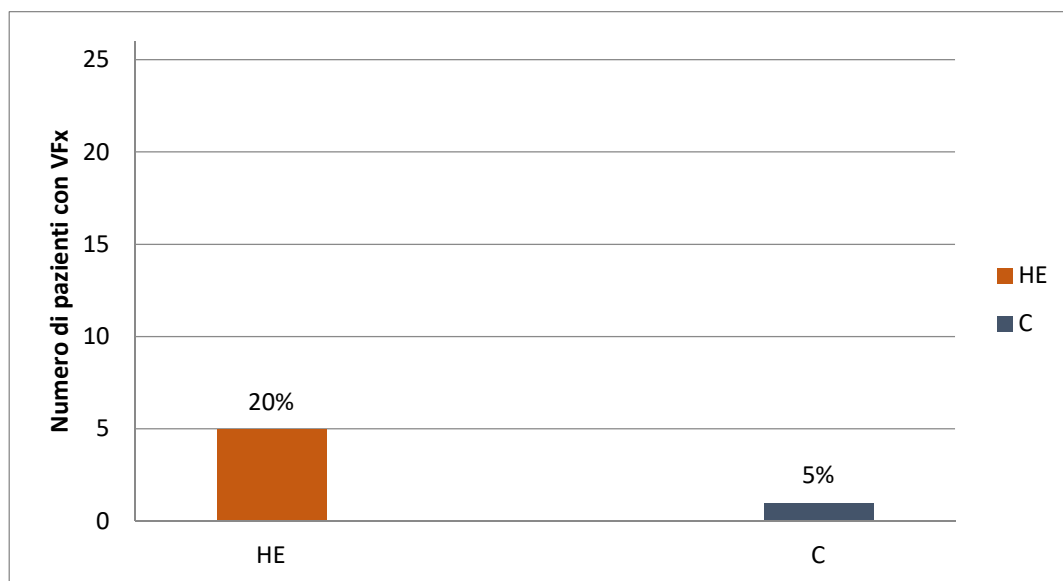


Figura 11: Istogramma prevalenza fratture vertebrali (VFX) nel gruppo emocromatosi (HE) e nel gruppo di controllo (C).

6. DISCUSSIONE

Lo studio condotto ha potuto valutare i livelli circolanti di FGF23 in un modello in vivo costituito da una patologia caratterizzata da un sovraccarico di ferro, sia in condizioni basali che dopo donazione di sangue intero.

E' stato possibile effettuare l'analisi dei dati ed interpretarli in assenza di fattori di confondimento, a differenze di quanto riportato fino ad oggi in letteratura.

Nello specifico, uno dei principali *bias* è rappresentato dall'insufficienza renale cronica, al cui decremento del filtrato glomerulare corrisponde un incremento dei livelli di FGF23.

Un altro importante fattore di confondimento è rappresentato dall'obesità viscerale, associata spesso ad iperferritinemia, quale epifenomeno dalla steatosi epatica e dell'incremento degli indici di flogosi [42].

Questo fattore di confondimento è stato fugato per la popolazione analizzata, con il rilievo anche dei parametri antropometrici e della circonferenza vita, al fine di escludere la presenza di adiposità viscerale. I principali indici di flogosi (VES, PCR) sono risultati negativi in entrambi i gruppi analizzati, in quanto parte dello screening preposto per la procedura della donazione di sangue.

La presenza delle sopracitate limitazioni, ad oggi non ha consentito di avere una idea univoca dei meccanismi regolatori di FGF23.

Per quanto riguarda, le mutazioni del gene HFE riportate, queste erano in linea con quelle attese e quelle riportate dai dati in letteratura [2].

Un aspetto innovativo di questo progetto è stata la valutazione di una popolazione affetta da Emocromatosi in età più giovane rispetto a quella analizzata finora in letteratura, dove le complicanze scheletriche in termini di fratture avevano anche una base multifattoriale, secondaria ad esempio a

complicanze, quali cirrosi epatica, diabete mellito ed ipogonadismo [14, 17, 18, 20].

Tali complicanze non erano presenti nella popolazione oggetto dello studio, anche per la diagnosi precoce ed il trattamento tempestivo. Per quanto riguarda l'ipogonadismo nella popolazione maschile è stato escluso sulla base della valutazione anamnestica, negativa per alterazioni della libido sessuale.

Come atteso, il gruppo HE mostrava parametri dell'assetto marziale indicativi di un eccesso di ferro, statisticamente significativo rispetto alla popolazione di controllo. Per quanto riguarda la rivalutazione dopo 7 giorni del gruppo HE, la sideremia, la transferrina e quindi la TSAT risultavano ridotte significativamente, mentre i livelli di ferritina non avevano una riduzione significativa. Ciò potrebbe essere correlato forse alla tempistica ravvicinata scelta per la rivalutazione.

Infatti, per quanto riguarda la concentrazione della ferritina, essa si riduce progressivamente con il susseguirsi delle donazioni, riflettendo il graduale processo di decremento del contenuto totale dei depositi di ferro nell'organismo. E' stimato che una unità di emazie di circa 500 mL, contenga circa 200-250 mg di ferro, perciò nei pazienti con patologia avanzata e con marcato sovraccarico di ferro, possono essere necessari diversi anni per raggiungere livelli di ferritina ottimali [1].

E' da sottolineare, che avendo riscontrato una variabilità all'interno del gruppo tra i pazienti con HE, i parametri dell'assetto marziale sono stati espressi in termini di mediana (*Figura 5-6*) e che il p-value tra le differenze delle mediane è stato calcolato con il test di Wilcoxon.

Ad ogni modo, il riscontro di una correlazione statisticamente significativa della sola porzione C-terminale con tutti i parametri dell'assetto marziale e

per entrambe le popolazioni studiate al momento della rivalutazione (*Tabella 6*), conferma inequivocabilmente che in seguito ad una riduzione dell'assetto marziale, si assiste ad un incremento della porzione C-terminale dell'FGF23. Tale comportamento consente di poter affermare che questo tipo di modulazione si realizza ai fini del mantenimento dell'omeostasi del metabolismo dei fosfati, regolando negativamente un teorico incremento della porzione intatta. Infatti, calcolando il rapporto tra la porzione intatta e la porzione C-terminale (iFGF23/cFGF23 ratio) è possibile osservare come esso rimanga costante.

Tuttavia, al progredire della riduzione dei parametri dell'assetto marziale, si assiste invece ad un sostanziale incremento statisticamente significativo della porzione C-Terminale del FGF23 (*Figura 9, 10*), che solo nel gruppo C1 è in grado di alterare il rapporto iFGF23/cFGF23 ratio, che consente tuttavia di mantenere inalterati i livelli della porzione intatta di iFGF23. Questo fenomeno, inoltre, è in grado di non determinare alterazioni del metabolismo dei fosfati (invariati rispetto al tempo 0) (*Tabella 2*).

Tuttavia, non è da escludere l'ipotesi che questo tipo di risposta omeostatica, possa modificarsi nel corso della vita, in relazione a processi di invecchiamento che coinvolgono anche la funzione osteocitaria [43, 44].

In condizioni fisiologiche, quindi parallelamente all'incremento dei livelli di FGF23 a seguito di modifiche dell'assetto marziale, si assiste alla sua degradazione, che evita una alterazione del metabolismo dei fosfati.

Questo dato rappresenta una evoluzione in vivo rispetto alle premesse teoriche e/o basate su modelli sperimentali di laboratorio.

Infatti, dagli studi iniziali di Wolf et al. si è giunti alla dimostrazione di come la carenza di ferro sia in grado di stimolare la produzione di FGF23 [26, 45]. Successivamente fu dimostrato come in modelli murini, una parte della produzione di FGF23 proveniva dalle cellule endoteliali che rivestono i

capillari fenestrati dei vasi del midollo osseo; ciò si verificava in particolar modo in situazioni di carenza marziale [46].

Quindi, si aggiungeva la nozione relativa alla possibilità di produzione extrascheletrica di questa sostanza, confermata anche in una nostra osservazione (produzione ectopica di FGF23 nel contesto delle neoplasie prostatiche) [47].

Ad oggi i livelli di FGF23 possono essere determinati usando due differenti *assay*, che misurano la porzione intatta (forma biologicamente attiva) e la porzione C-terminale, che viene rilasciata a seguito dei processi di degradazione della forma intatta o che può anche corrispondere alla porzione C-terminale della molecola attiva (*Figura 4*).

Pertanto, la determinazione della porzione C-terminale non è in grado di discernere tra la forma attiva ed inattiva dell'ormone.

Tuttavia, combinando le due metodiche, è possibile determinare con maggiore precisione la porzione di FGF23 inattivata.

Il rapporto di iFGF23/cFGF23 potrebbe avere un ruolo utile come misura surrogata per confrontare la frazione delle due forme di FGF23 circolanti totali, in particolar modo in diversi contesti clinici peculiari.

Questo concetto era stato postulato nel passato, indicando alcune patologie caratterizzate da uno specifico *impairment* della ratio tra forma intatta e C-terminale (*Figura 4*), tuttavia risultava di difficile realizzazione perché le metodiche in commercio esprimevano i livelli di FGF23 con unità differenti e non convertibili tra loro, rappresentate da pg/ml e RU/mL, rispettivamente per la forma intatta e C-terminale.

La recente introduzione di nuovi *assay*, in grado di valutare anche la porzione C-terminale in pg/mL, potrebbe rendere effettivamente realizzabile il calcolo

di una ratio tra le due componenti dell'FGF23 in diverse condizioni patologiche.

Nella realizzazione di questo progetto, per la prima volta viene effettuato tale tipo di approccio in un modello in vivo, al fine di valutare indirettamente i meccanismi di omeostasi.

In merito alla valutazione densitometrica, anche se i pazienti con Emocromatosi avevano una riduzione di entità lieve della massa ossea (BMD) rispetto al gruppo di controllo, non abbiamo rilevato differenze significative nella BMD (*Tabella 7*). Ancora una volta l'iniziale compromissione va contestualizzata con una popolazione più giovane rispetto a quanto riportato in letteratura e che ha ricevuto una diagnosi precoce di HE, seguita da un trattamento tempestivo.

Oltre al dato densitometrico, abbiamo deciso di valutare anche l'aspetto morfometrico, poiché come è noto, molte fratture da fragilità, si verificano anche nell'ambito dell'osteopenia e/o della normalità densitometrica [48].

Pertanto, abbiamo completato lo screening delle complicanze, mediante la valutazione semiquantitativa del *Vertebral Fracture Assessment* (VFA), con la tecnica Dual-Energy X-Ray Absorptiometry [49].

La VFA è una nuova metodica che consente la diagnosi delle fratture vertebrali da fragilità con una esposizione alle radiazioni molto più bassa rispetto alla radiologia convenzionale pari a circa 30 μ Sv. Ciò è possibile perché la VFA viene effettuata con i densitometri di ultima generazione, che grazie ai recenti progressi della tecnologia assorbimetrica a doppia energia (DXA) sono in grado di acquisire immagini in proiezione laterale della colonna vertebrale con buona risoluzione spaziale per la diagnosi delle fratture vertebrali.

Una volta acquisita l'immagine della colonna vertebrale, uno specifico

software consente di effettuare automaticamente la morfometria vertebrale identificando in maniera oggettiva e con elevata sensibilità anche le fratture vertebrali lievi. L'analisi morfometrica infatti ha evidenziato un numero di deformità vertebrali di grado lieve secondo la classificazione di Genant, maggiori rispetto al gruppo di controllo (*Figura 11*). Nello specifico con tale metodica abbiamo rilevato un incremento delle fratture nel gruppo dei pazienti con HE (20% vs 5%). Per il gruppo dei pazienti con HE, si aggiungeva anche un'anamnesi positiva maggiore per fratture scheletriche periferiche da fragilità, essenzialmente costituite dalle fratture di Colles (HE 19% vs C 5%).

Per quanto riguarda l'analisi della microarchitettura scheletrica rappresentata dal TBS, non abbiamo riscontrato alcuna differenza tra i due gruppi (*Tabella 7*). E' noto come il TBS sia in grado di implementare le informazioni ottenute con l'analisi densitometrica, definendo meglio aspetti relativi alla microarchitettura scheletrica, soprattutto in forme secondarie di osteoporosi [50]. In particolar modo si poteva teorizzare una correlazione di tale dato con la ferritina, che meglio esprime i livelli di deposito di ferro tissutale. Tuttavia, trattandosi di soggetti giovani con un adeguato trattamento di prevenzione, è possibile che l'assenza di una correlazione possa risiedere in questa premessa.

In merito all'utilizzo del TBS nell'Emocromatosi, esiste ad oggi solo uno studio, che ha utilizzato tale metodica in tale patologia. Gli Autori hanno riscontrato una riduzione del TBS (1.29 ± 0.03), rispetto ad una popolazione di controllo (1.38 ± 0.16) con una $p = 0.04$ [51]. Tuttavia, la popolazione in oggetto aveva un'età media pari a 53 anni ed includeva 12 soggetti di sesso femminile, verosimilmente in menopausa (dato non esplicitato nello studio).

La compromissione della microarchitettura scheletrica è stata associata da Rupp e coll. con i livelli circolanti di FGF23 in pazienti con osteoporosi, dato che si confermava anche dopo aggiustamento per variabili confondenti [52, 53]

Pertanto, il riscontro di valori di FGF23 nella popolazione oggetto di questa tesi, nel range di normalità è compatibile pertanto con questa ipotesi.

Recentemente Jandl N. M et al. hanno analizzato la microarchitettura scheletrica dei pazienti affetti da HE con la tomografia computerizzata quantitativa periferica ad alta risoluzione (*HR-pQCT*), che consente di ottenere notevoli informazioni sulla microarchitettura scheletrica anche con una ricostruzione tridimensionale dell'immagine [19]. Lo studio è stato eseguito tuttavia su una popolazione di piccole dimensioni (n = 10). Da tale valutazione, è stata rilevata una riduzione dello spessore della corticale, ma con valori della microarchitettura trabecolare (Tb.Th) nella norma. In questa casistica è stato inoltre rilevata anche la presenza di fratture vertebrali (33%).

L'elevato riscontro di fratture vertebrali associate ad una riduzione dello spessore corticale ma con microarchitettura trabecolare conservata, potrebbe, per quanto riguarda la compromissione scheletrica, associare l'HE con altre condizioni patologiche, come il diabete mellito [54].

Questo tipo di comparazione consentirebbe di spiegare l'elevata prevalenza di fratture vertebrali, in un contesto di BMD compresa tra la normalità ed il range di osteopenia.

Il dato relativo alle fratture vertebrali della casistica oggetto di questa tesi ha tuttavia la peculiarità di essere composta da soggetti con età più giovane rispetto a quella riportata in letteratura.

7. CONCLUSIONI

Questo è il primo studio in cui sia stato valutato l'FGF23 in un contesto clinico caratterizzato dal sovraccarico di ferro geneticamente determinato.

Se da un lato le conoscenze su tale ormone si sono ampliate negli ultimi anni, consentendo anche la sua determinazione plasmatica in Centri di terzo livello specializzati nella gestione di patologie osteometaboliche, persistono ancora dubbi di interpretazione dei livelli di questo ormone, per la coesistenza di alcune variabili.

La nostra valutazione, effettuata in soggetti giovani e privi dei principali fattori confondenti, potrebbe implementare le informazioni sulla fisiologia di FGF23 e della sua relazione con l'assetto marziale.

Abbiamo sottolineato l'importanza di valutare entrambe le componenti al fine di ottenere informazioni esaustive della sua azione biologica, fondamentale pertanto sarebbe anche la valutazione del rapporto iFGF23/cFGF23 ratio.

I dati rilevati consentono di affermare che l'FGF23 è influenzato dall'assetto marziale e come questo eserciti un feedback sulla degradazione di FGF23.

Infatti, dal calcolo del rapporto tra la porzione intatta e la porzione C-terminale (iFGF23/cFGF23 ratio) è possibile osservare come esso rimanga costante fintanto che non ci sia una marcata deplezione dei depositi di ferro.

E' quindi possibile ipotizzare che l'incremento della clearance di questo ormone, espresso dall'incremento dei livelli di C-Terminale, espliciti un feedback negativo sul teorico incremento della porzione biologicamente attiva (iFGF23) a seguito di modifiche dell'assetto marziale. Questo meccanismo verosimilmente consente di evitare una alterazione del metabolismo dei fosfati, prevenendo condizioni di osteomalacia e di demineralizzazione scheletrica.

In aggiunta è stato effettuato un *assessment* della compromissione scheletrica in una popolazione più giovane rispetto a quella analizzata in letteratura.

Il limite principale dello studio è la ridotta numerosità campionaria, che potrebbe aver influito sul mancato raggiungimento della significatività di alcuni parametri all'analisi statistica.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Brissot P, Pietrangelo A, Adams PC, de Graaff B, McLaren CE, Loreal O. Haemochromatosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18016. Epub 2018/04/06. doi: 10.1038/nrdp.2018.16. PubMed PMID: 29620054; PubMed Central PMCID: PMC7775623.
2. Girelli D, Busti F, Brissot P, Cabantchik I, Muckenthaler MU, Porto G. Hemochromatosis classification: update and recommendations by the BIOIRON Society. *Blood*. 2022;139(20):3018-29. Epub 2021/10/04. doi: 10.1182/blood.2021011338. PubMed PMID: 34601591.
3. Kowdley KV, Brown KE, Ahn J, Sundaram V. ACG Clinical Guideline: Hereditary Hemochromatosis. *Am J Gastroenterol*. 2019;114(8):1202-18. Epub 2019/07/25. doi: 10.14309/ajg.000000000000315. PubMed PMID: 31335359.
4. Czaja AJ. Review article: iron disturbances in chronic liver diseases other than haemochromatosis - pathogenic, prognostic, and therapeutic implications. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019;49(6):681-701. Epub 2019/02/15. doi: 10.1111/apt.15173. PubMed PMID: 30761559.
5. Beutler E. Natural history of hemochromatosis. *Mayo Clin Proc*. 2004;79(3):305-6. Epub 2004/03/11. doi: 10.4065/79.3.305. PubMed PMID: 15008601.
6. Adams PC. The natural history of untreated HFE-related hemochromatosis. *Acta Haematol*. 2009;122(2-3):134-9. Epub 2009/11/13. doi: 10.1159/000243797. PubMed PMID: 19907150.
7. Sahinbegovic E, Dallos T, Aigner E, Axmann R, Manger B, Englbrecht M, et al. Musculoskeletal disease burden of hereditary hemochromatosis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(12):3792-8. Epub 2010/08/20. doi: 10.1002/art.27712. PubMed PMID: 20722017.
8. Sinigaglia L, Fargion S, Fracanzani AL, Binelli L, Battafarano N, Varenna M, et al. Bone and joint involvement in genetic hemochromatosis: role of cirrhosis and iron overload. *J Rheumatol*. 1997;24(9):1809-13. Epub 1997/09/18. PubMed PMID: 9292808.
9. Adams PC, Speechley M. The effect of arthritis on the quality of life in hereditary hemochromatosis. *J Rheumatol*. 1996;23(4):707-10. Epub 1996/04/01. PubMed PMID: 8730131.
10. Colangelo L, Biamonte F, Pepe J, Cipriani C, Minisola S. Understanding and managing secondary osteoporosis. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2019;14(2):111-22. Epub 2019/02/09. doi: 10.1080/17446651.2019.1575727. PubMed PMID: 30735441.
11. McDermott JH, Walsh CH. Hypogonadism in hereditary hemochromatosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(4):2451-5. Epub 2005/01/20. doi: 10.1210/jc.2004-0980. PubMed PMID: 15657376.
12. Poggi M, Sorrentino F, Pugliese P, Smacchia MP, Daniele C, Equitani F, et al. Longitudinal changes of endocrine and bone disease in adults with beta-thalassemia major receiving different iron chelators over 5 years. *Ann Hematol*. 2016;95(5):757-63. Epub 2016/03/10. doi: 10.1007/s00277-016-2633-y. PubMed PMID: 26957357.
13. Richette P, Ottaviani S, Vicaut E, Bardin T. Musculoskeletal complications of hereditary hemochromatosis: a case-control study. *J Rheumatol*. 2010;37(10):2145-50. Epub 2010/08/05. doi: 10.3899/jrheum.100234. PubMed PMID: 20682666.
14. Diamond T, Stiel D, Posen S. Osteoporosis in hemochromatosis: iron excess, gonadal deficiency, or other factors? *Ann Intern Med*. 1989;110(6):430-6. Epub 1989/03/15. doi: 10.7326/0003-4819-110-6-430. PubMed PMID: 2919850.
15. Eyres KS, McCloskey EV, Fern ED, Rogers S, Beneton M, Aaron JE, et al. Osteoporotic fractures: an unusual presentation of haemochromatosis. *Bone*. 1992;13(6):431-3. Epub 1992/01/01. doi: 10.1016/8756-3282(92)90086-c. PubMed PMID: 1476821.
16. Duquenne M, Rohmer V, Legrand E, Chappard D, Wion Barbot N, Basle MF, et al. Spontaneous multiple vertebral fractures revealed primary haemochromatosis. *Osteoporos Int*. 1996;6(4):338-40. Epub 1996/01/01. doi: 10.1007/BF01623396. PubMed PMID: 8883126.
17. Guggenbuhl P, Deugnier Y, Boisdet JF, Rolland Y, Perdriger A, Pawlotsky Y, et al. Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporos Int*. 2005;16(12):1809-14. Epub 2005/06/02. doi: 10.1007/s00198-005-1934-0. PubMed PMID: 15928800.
18. Valenti L, Varenna M, Fracanzani AL, Rossi V, Fargion S, Sinigaglia L. Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporos Int*. 2009;20(4):549-55. Epub 2008/07/29. doi: 10.1007/s00198-008-0701-4. PubMed PMID: 18661088.

19. Jandl NM, Rolvien T, Schmidt T, Mussawy H, Nielsen P, Oheim R, et al. Impaired Bone Microarchitecture in Patients with Hereditary Hemochromatosis and Skeletal Complications. *Calcif Tissue Int.* 2020;106(5):465-75. Epub 2020/01/29. doi: 10.1007/s00223-020-00658-7. PubMed PMID: 31989186.
20. Nguyen CD, Morel V, Pierache A, Lion G, Cortet B, Flipo RM, et al. Bone and joint complications in patients with hereditary hemochromatosis: a cross-sectional study of 93 patients. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2020;12:1759720X20939405. Epub 2020/07/31. doi: 10.1177/1759720X20939405. PubMed PMID: 32728396; PubMed Central PMCID: PMC7366396.
21. Cipriani C, Minisola S, Colangelo L, V DEM, Ferrone F, Biamonte F, et al. FGF23 functions and disease. *Minerva Endocrinol (Torino).* 2021. Epub 2021/04/02. doi: 10.23736/S2724-6507.21.03378-2. PubMed PMID: 33792238.
22. Minisola S, Peacock M, Fukumoto S, Cipriani C, Pepe J, Tella SH, et al. Tumour-induced osteomalacia. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17044. Epub 2017/07/14. doi: 10.1038/nrdp.2017.44. PubMed PMID: 28703220.
23. Bhattacharyya N, Chong WH, Gafni RI, Collins MT. Fibroblast growth factor 23: state of the field and future directions. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(12):610-8. Epub 2012/08/28. doi: 10.1016/j.tem.2012.07.002. PubMed PMID: 22921867; PubMed Central PMCID: PMC3502714.
24. Wheeler JA, Clinkenbeard EL. Regulation of Fibroblast Growth Factor 23 by Iron, EPO, and HIF. *Curr Mol Biol Rep.* 2019;5(1):8-17. Epub 2019/06/21. doi: 10.1007/s40610-019-0110-9. PubMed PMID: 31218207; PubMed Central PMCID: PMC6582956.
25. Imel EA, Liu Z, Coffman M, Acton D, Mehta R, Econs MJ. Oral Iron Replacement Normalizes Fibroblast Growth Factor 23 in Iron-Deficient Patients With Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets. *J Bone Miner Res.* 2020;35(2):231-8. Epub 2019/10/28. doi: 10.1002/jbmr.3878. PubMed PMID: 31652009; PubMed Central PMCID: PMC7333537.
26. Wolf M, White KE. Coupling fibroblast growth factor 23 production and cleavage: iron deficiency, rickets, and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014;23(4):411-9. Epub 2014/05/29. doi: 10.1097/01.mnh.0000447020.74593.6f. PubMed PMID: 24867675; PubMed Central PMCID: PMC4322859.
27. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest.* 2007;117(7):1926-32. Epub 2007/06/09. doi: 10.1172/JCI31370. PubMed PMID: 17557118; PubMed Central PMCID: PMC1884690.
28. Zhang Q, Doucet M, Tomlinson RE, Han X, Quarles LD, Collins MT, et al. The hypoxia-inducible factor-1alpha activates ectopic production of fibroblast growth factor 23 in tumor-induced osteomalacia. *Bone Res.* 2016;4:16011. Epub 2016/07/29. doi: 10.1038/boneres.2016.11. PubMed PMID: 27468359; PubMed Central PMCID: PMC4948305.
29. Yamamoto S, Okada Y, Mori H, Fukumoto S, Tanaka Y. Fibroblast growth factor 23-related osteomalacia caused by the prolonged administration of saccharated ferric oxide. *Intern Med.* 2012;51(17):2375-8. Epub 2012/09/15. doi: 10.2169/internalmedicine.51.7450. PubMed PMID: 22975552.
30. Honda H, Michihata T, Shishido K, Takahashi K, Takahashi G, Hosaka N, et al. High fibroblast growth factor 23 levels are associated with decreased ferritin levels and increased intravenous iron doses in hemodialysis patients. *PLoS One.* 2017;12(5):e0176984. Epub 2017/05/06. doi: 10.1371/journal.pone.0176984. PubMed PMID: 28475601; PubMed Central PMCID: PMC5419608.
31. Roszko KL, Brown S, Pang Y, Huynh T, Zhuang Z, Pacak K, et al. C-Terminal, but Not Intact, FGF23 and EPO Are Strongly Correlatively Elevated in Patients With Gain-of-Function Mutations in HIF2A: Clinical Evidence for EPO Regulating FGF23. *J Bone Miner Res.* 2021;36(2):315-21. Epub 2020/10/14. doi: 10.1002/jbmr.4195. PubMed PMID: 33049075; PubMed Central PMCID: PMC9161667.
32. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37597-603. Epub 2002/07/26. doi: 10.1074/jbc.M205305200. PubMed PMID: 12138110.
33. Loreal O, Cavey T, Robin F, Kenawi M, Guggenbuhl P, Brissot P. Iron as a Therapeutic Target in HFE-Related Hemochromatosis: Usual and Novel Aspects. *Pharmaceuticals (Basel).* 2018;11(4). Epub 2018/11/30. doi: 10.3390/ph11040131. PubMed PMID: 30486249; PubMed Central PMCID: PMC6315470.
34. Bolondi G, Garuti C, Corradini E, Zoller H, Vogel W, Finkenstedt A, et al. Altered hepatic BMP signaling pathway in human HFE hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;45(4):308-12. Epub 2010/09/25. doi: 10.1016/j.bcmd.2010.08.010. PubMed PMID: 20863724; PubMed Central PMCID: PMC3295241.
35. Silvestri L, Nai A, Dulja A, Pagani A. Hepcidin and the BMP-SMAD pathway: An unexpected liaison. *Vitam Horm.* 2019;110:71-99. Epub 2019/02/26. doi: 10.1016/bs.vh.2019.01.004. PubMed PMID: 30798817.
36. Rausa M, Pagani A, Nai A, Campanella A, Gilberti ME, Apostoli P, et al. Bmp6 expression in murine liver non parenchymal cells: a mechanism to control their high iron exporter activity and protect hepatocytes from iron

- overload? *PLoS One*. 2015;10(4):e0122696. Epub 2015/04/11. doi: 10.1371/journal.pone.0122696. PubMed PMID: 25860887; PubMed Central PMCID: PMC4393274.
37. Vilaca T, Velmurugan N, Smith C, Abrahamsen B, Eastell R. Osteomalacia as a Complication of Intravenous Iron Infusion: A Systematic Review of Case Reports. *J Bone Miner Res*. 2022;37(6):1188-99. Epub 2022/04/16. doi: 10.1002/jbmr.4558. PubMed PMID: 35426179; PubMed Central PMCID: PMC9322686.
38. Ferrone F, Pepe J, Danese VC, Fassino V, Cecchetti V, De Lucia F, et al. The relative influence of serum ionized calcium and 25-hydroxyvitamin D in regulating PTH secretion in healthy subjects. *Bone*. 2019;125:200-6. Epub 2019/05/28. doi: 10.1016/j.bone.2019.05.029. PubMed PMID: 31129357.
39. Heijboer AC, Levitus M, Vervloet MG, Lips P, ter Wee PM, Dijstelbloem HM, et al. Determination of fibroblast growth factor 23. *Ann Clin Biochem*. 2009;46(Pt 4):338-40. Epub 2009/07/01. doi: 10.1258/acb.2009.009066. PubMed PMID: 19564163.
40. Pedrazzoni M, Girasole G, Bertoldo F, Bianchi G, Cepollaro C, Del Puente A, et al. Definition of a population-specific DXA reference standard in Italian women: the Densitometric Italian Normative Study (DINS). *Osteoporos Int*. 2003;14(12):978-82. Epub 2003/10/08. doi: 10.1007/s00198-003-1521-1. PubMed PMID: 14530829.
41. Nuti R, Brandi ML, Checchia G, Di Munno O, Dominguez L, Falaschi P, et al. Guidelines for the management of osteoporosis and fragility fractures. *Intern Emerg Med*. 2019;14(1):85-102. Epub 2018/06/28. doi: 10.1007/s11739-018-1874-2. PubMed PMID: 29948835; PubMed Central PMCID: PMC6329834.
42. Rametta R, Fracanzani AL, Fargion S, Dongiovanni P. Dysmetabolic Hyperferritinemia and Dysmetabolic Iron Overload Syndrome (DIOS): Two Related Conditions or Different Entities? *Curr Pharm Des*. 2020;26(10):1025-35. Epub 2020/02/01. doi: 10.2174/138161282666200131103018. PubMed PMID: 32003680.
43. Lewerin C, Ljunggren O, Nilsson-Ehle H, Karlsson MK, Herlitz H, Lorentzon M, et al. Low serum iron is associated with high serum intact FGF23 in elderly men: The Swedish MrOS study. *Bone*. 2017;98:1-8. Epub 2017/02/19. doi: 10.1016/j.bone.2017.02.005. PubMed PMID: 28212898.
44. Isakova T, Cai X, Lee J, Katz R, Cauley JA, Fried LF, et al. Associations of FGF23 With Change in Bone Mineral Density and Fracture Risk in Older Individuals. *J Bone Miner Res*. 2016;31(4):742-8. Epub 2015/11/22. doi: 10.1002/jbmr.2750. PubMed PMID: 26590361; PubMed Central PMCID: PMC45564422.
45. Wolf M, Koch TA, Bregman DB. Effects of iron deficiency anemia and its treatment on fibroblast growth factor 23 and phosphate homeostasis in women. *J Bone Miner Res*. 2013;28(8):1793-803. Epub 2013/03/19. doi: 10.1002/jbmr.1923. PubMed PMID: 23505057.
46. Boots JMM, Quax RAM. High-Dose Intravenous Iron with Either Ferric Carboxymaltose or Ferric Derisomaltose: A Benefit-Risk Assessment. *Drug Saf*. 2022;45(10):1019-36. Epub 2022/09/07. doi: 10.1007/s40264-022-01216-w. PubMed PMID: 36068430; PubMed Central PMCID: PMC9492608.
47. Minisola F, Cipriani C, Colangelo L, Cilli M, Sciarra A, Von Heland M, et al. Mineral metabolism abnormalities in patients with prostate cancer: a systematic case controlled study. *Endocrine*. 2018;59(2):338-43. Epub 2017/07/01. doi: 10.1007/s12020-017-1351-0. PubMed PMID: 28660378.
48. Siris ES, Chen YT, Abbott TA, Barrett-Connor E, Miller PD, Wehren LE, et al. Bone mineral density thresholds for pharmacological intervention to prevent fractures. *Arch Intern Med*. 2004;164(10):1108-12. Epub 2004/05/26. doi: 10.1001/archinte.164.10.1108. PubMed PMID: 15159268.
49. Aparisi Gomez MP, Isaac A, Dalili D, Fotiadou A, Kariki EP, Kirschke JS, et al. Imaging of Metabolic Bone Diseases: The Spine View, Part II. *Semin Musculoskelet Radiol*. 2022;26(4):491-500. Epub 2022/09/15. doi: 10.1055/s-0042-1754341. PubMed PMID: 36103890.
50. Ulivieri FM, Silva BC, Sardanelli F, Hans D, Bilezikian JP, Caudarella R. Utility of the trabecular bone score (TBS) in secondary osteoporosis. *Endocrine*. 2014;47(2):435-48. Epub 2014/05/24. doi: 10.1007/s12020-014-0280-4. PubMed PMID: 24853880.
51. Banaszkiwicz K, Sikorska K, Panas D, Sworzczak K. The Role of the Trabecular Bone Score in the Assessment of Osteoarticular Disorders in Patients with HFE-Hemochromatosis: A Single-Center Study from Poland. *Genes (Basel)*. 2021;12(9). Epub 2021/09/29. doi: 10.3390/genes12091304. PubMed PMID: 34573286; PubMed Central PMCID: PMC8470067.
52. Rupp T, Butscheidt S, Vettorazzi E, Oheim R, Barvencik F, Amling M, et al. High FGF23 levels are associated with impaired trabecular bone microarchitecture in patients with osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2019;30(8):1655-62. Epub 2019/05/03. doi: 10.1007/s00198-019-04996-7. PubMed PMID: 31044263.
53. Minisola S, Colangelo L, Cipriani C, Pepe J. FGF 23 and trabecular microarchitecture. *Osteoporos Int*. 2019;30(11):2357. Epub 2019/08/14. doi: 10.1007/s00198-019-05123-2. PubMed PMID: 31407024.
54. Burghardt AJ, Issever AS, Schwartz AV, Davis KA, Masharani U, Majumdar S, et al. High-resolution peripheral quantitative computed tomographic imaging of cortical and trabecular bone microarchitecture in patients with type 2

diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95(11):5045-55. Epub 2010/08/20. doi: 10.1210/jc.2010-0226. PubMed PMID: 20719835; PubMed Central PMCID: PMC2968722.

Il presente documento è distribuito secondo la licenza Tutti i diritti riservati.