



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ODONTOSTOMATOLOGICHE E MAXILLO  
FACCIALI

**Scuola di Dottorato di Ricerca in Tecnologie Innovative Nelle Malattie  
Dello Scheletro, Della Cute E Del Distretto Oro-Cranio-Facciale**

## **TESI DI DOTTORATO**

**“Modificazioni genetiche in soggetti affetti da  
Iperparatiroidismo Primario Normocalcémico (NPHPT) e  
controllo dei valori del paratormone rispetto ad una  
popolazione sana di riferimento”**

**Dottorando:** Federica Ferrone 1231316

**Supervisore:** Prof. Salvatore Minisola

**Coordinatore della Scuola:** Prof.ssa Antonella Polimeni

XXXII ciclo  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2020

# INDICE

<b>Riassunto</b>	<b>3</b>
<b>Introduzione:</b>	
Paratormone (PTH)	5
L'omeostasi del calcio	16
Recettore-sensore del calcio (CaSR)	21
Vitamina D	26
Iperparatiroidismo primario (o primitivo IPP o pHPT)	35
Iperparatiroidismo primario normocalcemico (NPHPT)	39
Aspetti diagnostici del NPHPT	42
Polimorfismi del gene codificante per il CaSR ed iperparatiroidismo	44
<b>Scopo del lavoro</b>	<b>46</b>
<b>Materiali e metodi</b>	
Donatori (pazienti e controlli)	48
Determinazione quantitativa degli elettroliti $\text{Ca}^{2+}$ extracellulare e $\text{Mg}^{2+}$ in siero mediante metodo iono-selettivo	51
Determinazione quantitativa degli ormoni calciotropi PTH 1-84, 25(OH)D (e di altri metaboliti idrossilati della vitamina D), e 1,25(OH) <sub>2</sub> D tramite immunodosaggio a chemiluminescenza (CLIA)	52
Estrazione DNA genomico	62
Analisi genetica dei polimorfismi del gene CaSR, collegati al fenotipo iperparatiroideo, nei 23 casi di NPHPT asintomatici individuati, mediante sequenziamento Sanger tramite un processo di elettroforesi capillare completamente automatizzato	64
Analisi statistica	77

## **Risultati**

Descrizione della popolazione selezionata per lo studio della prevalenza del NPHPT in Italia	<b>80</b>
Screening dei polimorfismi del gene CaSR nei 23 pazienti NPHPT	<b>82</b>
Influenza relativa del Ca <sup>2+</sup> sierico e della 25(OH)D nella regolazione della secrezione di PTH nei 2259 soggetti sani individuati	<b>87</b>
<b>Discussione</b>	<b>99</b>
<b>Conclusioni</b>	<b>110</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>111</b>

## RIASSUNTO

La presentazione clinica dell'iperparatiroidismo primario (o primitivo IPP o pHPT) si è modificata nel tempo passando da una forma plurisintomatica, diagnosticata in pazienti con sintomatologia clinica, ad una forma asintomatica (attualmente la più comune modalità di presentazione di questa patologia), a seguito dell'introduzione del dosaggio automatico della calcemia nella routine ospedaliera e, negli ultimi 10 anni, alla comparsa della forma normocalcemia, conseguente ad una maggiore richiesta di misurare i livelli di paratormone (PTH) nel sangue.

L'iperparatiroidismo primario normocalcémico (NPHPT) è stato formalmente riconosciuto per la prima volta nel 2008 nell'ambito di un Workshop sull'IPP asintomatico, ed è caratterizzato da un innalzamento persistente della concentrazione di PTH in associazione a normali livelli di calcio totale e ionizzato, la cui diagnosi è possibile solo dopo aver escluso tutte le cause secondarie di aumento dei valori di PTH sierico.

Esistono pochi dati in letteratura sulla epidemiologia del NPHPT e in nessuno dei precedenti studi è stato dosato il  $\text{Ca}^{2+}$  oltre alla calcemia totale e sono state escluse, contemporaneamente, tutte le possibili cause di aumento di PTH in presenza di normocalcemia.

Per di più, in nessun lavoro finora sono stati misurati i livelli di PTH circolanti con un metodo accurato ed è stata valutata simultaneamente l'importanza relativa dei diversi parametri noti per influenzare la secrezione del PTH in una popolazione di soggetti sani non afferenti a centri per le Malattie Metaboliche Dello Scheletro.

In considerazione di ciò, il mio lavoro ha lo scopo di fornire nuovi strumenti sia per la valutazione della prevalenza del NPHPT in una popolazione sana di riferimento sia per la comprensione delle basi genetiche di tale patologia. Inoltre, questo studio mira a valutare l'importanza relativa del  $\text{Ca}^{2+}$ , del  $\text{Mg}^{2+}$ , della

25(OH)D e della 1,25(OH)<sub>2</sub>D nella regolazione della secrezione del PTH in una grande coorte di più di 2.000 volontari sani donatori di sangue.

Le analisi biochimiche ematiche sono state effettuate secondo le metodiche attualmente in uso presso il nostro laboratorio. La tipizzazione genotipica dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) del gene CaSR è avvenuta mediante sequenziamento Sanger tramite un processo di elettroforesi capillare completamente automatizzato.

I risultati ottenuti dal sequenziamento degli esoni 2-7 del gene CaSR nei 23 soggetti risultati iperparatiroidei normocalcemicici, in particolare quelli relativi agli SNPs situati nell'esone 7d (rs1042636 e rs1801725), sembrano confermare l'ipotesi da noi sostenuta circa l'origine del NPHPT, ovvero che la forma normocalcemicica sia la prima fase di un disordine bifasico, il quale successivamente potrebbe manifestarsi come pHPT ipercalcemicico. Oltre a ciò, in un paziente NPHPT è stato individuato il polimorfismo rs115230894 (c.1631G>A), situato nel sesto esone del gene CaSR e determinante la variazione aminoacidica non conservativa R544Q, per cui esistono pochi dati in letteratura, non consolidati, circa il suo effetto sul funzionamento della proteina CaSR in pazienti con NPHPT o con IPP.

I risultati ottenuti al termine delle analisi biochimiche ematiche sui 2259 soggetti risultati sani dimostrano che, in un ordine gerarchico in condizioni stabili non acute, la 25(OH)D svolge un ruolo significativo nella regolazione della secrezione di PTH rispetto alle altre variabili esaminate, incluso il Ca<sup>2+</sup> sierico. È importante sottolineare che questo risultato è rimasto coerente in tre approcci statistici. L'influenza della 25(OH)D può riguardare non solo il suo effetto periferico sull'assorbimento intestinale di calcio, ma anche un suo effetto diretto sulla secrezione di PTH a livello centrale.

# INTRODUZIONE

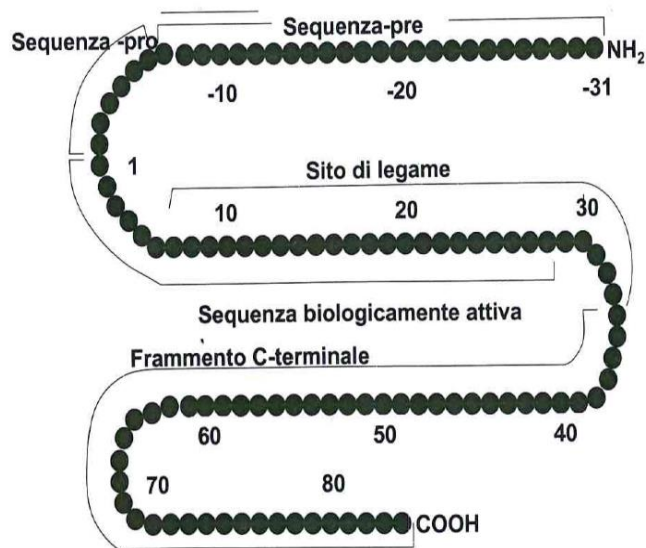
## **Paratormone (PTH)**

L'ormone paratiroideo (o paratormone PTH) svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi del calcio ed è secreto dalle ghiandole paratiroidee in risposta alle diverse concentrazioni di calcio sierico (*Mazzuoli G et al., 1990*).

Il calcio è un elemento chimico di importanza fondamentale in numerosi processi vitali sia intracellulari, come la contrazione muscolare, la secrezione ormonale, il metabolismo del glicogeno e la divisione cellulare (*Rasmussen H, 1986*), che extracellulari, come la regolazione del potenziale d'azione di membrana, l'esocitosi, il mantenimento dell'adesione intercellulare e dell'integrità della membrana cellulare, e la coagulazione del sangue.

Tuttavia, anche variazioni delle concentrazioni di altri elettroliti od ormoni, come i livelli sierici di magnesio (*Sahota O et al., 2006*), fosfato (*Thomas L et al., 2017*), 25-idrossivitamina D [25(OH)D] (*Pepe J et al., 2005; Shapses SA et al., 2013*), 1,25-diidrossivitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] (*Chen CL et al., 2014*) e fattore di crescita dei fibroblasti 23 (FGF23) (*Mace ML et al., 2018*), possono modulare la secrezione di PTH.

L'ormone paratiroideo è un peptide di 84 aminoacidi a singola catena con un peso molecolare di 9300 Dalton e con un tempo di eliminazione molto rapido, in quanto si suddivide in più subunità dotate anch'esse di attività biologica (Fig. 1).



**Figura 1** – Sequenza aminoacidica della molecola di PTH (Maccocci C et al., 2002).

La sequenza aminoacidica è stata caratterizzata in diversi mammiferi ed è stata rilevata una conservazione della porzione N-terminale che risulta determinante per molte azioni biologiche della molecola.

Infatti, l'attività biologica del PTH risiede completamente nella porzione N-terminale della proteina (1-34).

Di questa, la porzione 7-34 è responsabile del legame al relativo recettore di membrana (Recettore 1 del PTH PTHR1 o Recettore 2 del PTH PTHR2).

Il gene che codifica il PTH umano è stato clonato ed è localizzato sul braccio corto del cromosoma 11 (11p15). Ha un'analogia strutturale con quello del peptide correlato all'ormone paratiroideo (PTHrP), e la sequenza aminoacidica del PTH e del PTHrP è identica in 8 dei primi 13 aminoacidi.

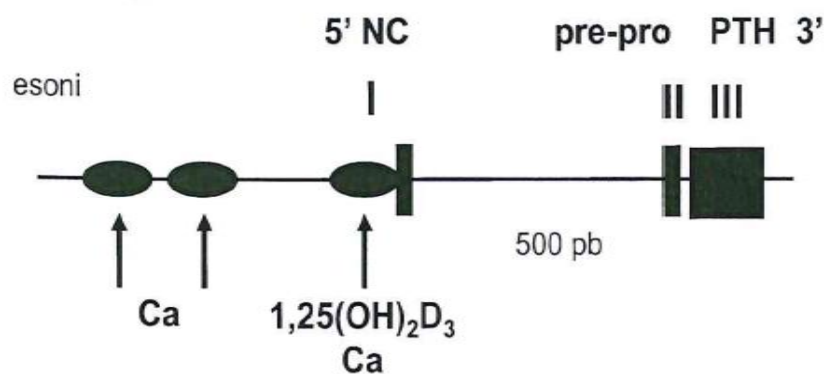
Sebbene siano due prodotti distinti di differenti geni, il fatto che il PTH e il PTHrP mostrino notevoli omologie funzionali e strutturali potrebbe stare ad indicare che derivano da un comune gene ancestrale. Comunque, il gene del PTHrP umano è molto più complesso di quello del PTH, contendendo numerosi esoni e numerosi siti per sequenze alternative di splicing durante la sintesi

dell'mRNA.

Il gene del PTH umano contiene tre esoni separati da due introni. Il primo esone contiene la sequenza non codificante localizzata all'estremità N-terminale (5'). Il secondo esone codifica i primi 29 aminoacidi della sequenza "pre-pro", mentre il terzo esone codifica la sequenza di clivaggio della regione "pro" (costituita da due aminoacidi, Lys-Arg), la sequenza del PTH maturo, e la regione non codificante del gene all'estremità C-terminale (3').

Quest'ultima regione è deputata al legame con proteine che regolano la stabilità del mRNA che codifica per il pre-pro PTH (precursore del PTH).

Il gene che codifica il PTH è preceduto da due sequenze "TATA" che costituiscono i due siti di inizio della trascrizione (Fig. 2).



**Figura 2** – Gene del PTH (Marcocci C et al., 2002).

L'attività del gene del PTH è regolata dalle concentrazioni di calcio, 1,25-diidrossivitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] e fosfato. Vari studi hanno dimostrato che alti livelli di calcio extracellulare determinano una riduzione dei livelli di mRNA deputato alla sintesi del PTH ed una riduzione del tasso di trascrizione del gene del PTH, mentre ridotti livelli di calcio extracellulare determinano un incremento di tale mRNA.



Il sito su cui va ad agire il calcio nella regolazione della sintesi del PTH è stato identificato in alcune sequenze localizzate alcune migliaia di basi prima del sito di inizio della trascrizione del gene (cfr. Fig. 2). Ulteriori studi hanno dimostrato come la ghiandola paratiroidea sia in grado di incrementare rapidamente la sintesi del PTH in risposta ad un rapido decremento della calcemia, ma sia relativamente meno rapida nel ridurre la secrezione del PTH in caso di ipercalcemia (Marcocci C et al., 2002).

In caso di ipocalcemia acuta, infatti, si ha un rapido aumento dei livelli di mRNA del gene del PTH, mentre in caso di rapido aumento della calcemia il cospicuo decremento dei livelli di tale mRNA si ha solo dopo 48 ore (Yamamoto M et al., 1989; Marcocci C et al., 2002). È stato dimostrato che l'aumento dei livelli di mRNA del gene del PTH determinato dall'ipocalcemia non è dovuto ad una modificazione del processo trascrizionale, ma piuttosto ad un cambiamento nella stabilità di tale mRNA.

La sequenza di DNA responsabile della regolazione della sintesi del PTH da parte della vitamina D è costituita da 26 bp, ed è localizzata 125 bp a monte del sito di inizio della trascrizione. L'esposizione di cellule paratiroidee in coltura ad alti livelli di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  determina una riduzione dei livelli di mRNA per il PTH. Tuttavia, esperimenti *in vivo* hanno dimostrato che in ratti resi ipocalcemici per 3 settimane con una dieta a basso contenuto di calcio, nei quali si aveva anche un notevole aumento dei livelli di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , si osservava un marcato aumento dei livelli di tale mRNA.

Questi dati indicano che l'effetto dell'ipocalcemia è più potente di quello dovuto agli alti livelli di vitamina D, come se l'ipocalcemia rendesse le cellule paratiroidee resistenti all'effetto della  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Naveth-Many T e Silver J, 1990; Marcocci C et al., 2002).

Anche variazioni della concentrazione del fosfato possono modificare la concentrazione del PTH. Questo effetto si attua con un meccanismo post-trascrizionale ed è indipendente dall'effetto del calcio o della vitamina D.

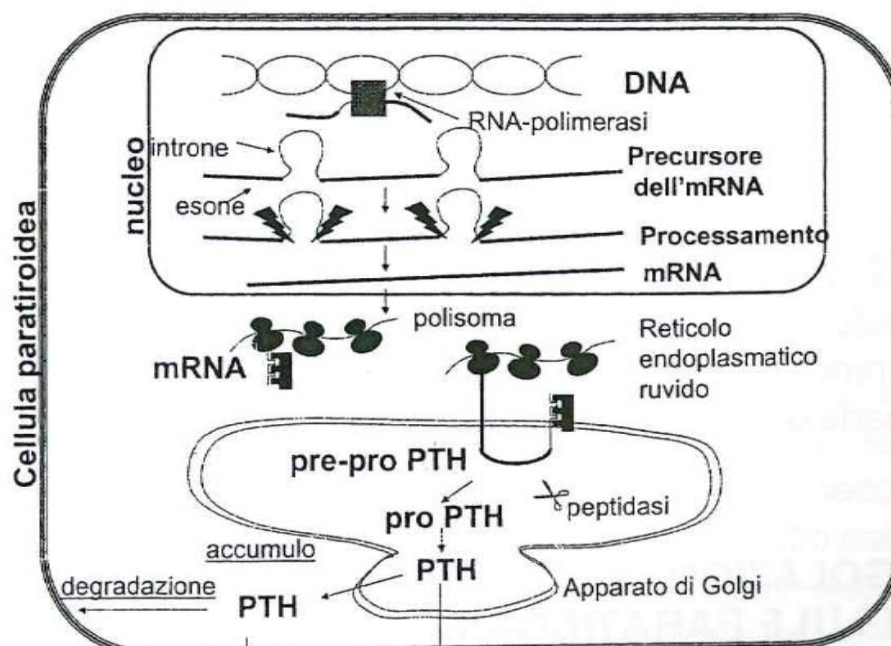
Il PTH intatto deriva da un precursore di 115 aminoacidi, il pre-pro PTH (Fig. 3).



**Figura 3** – Sequenza del pre-pro PTH (in alto) e sequenza full-length del PTH umano maturo (1-84) (Friedman PA e Goodman WG, 2006).

La sequenza “pre”, localizzata nella porzione N-terminale, funziona da sequenza “segnale”; infatti, non appena esce dal ribosoma durante la sintesi si lega ad una proteina SRP (particella di riconoscimento del segnale), che riconosce il complesso sequenza segnale-ribosoma. Successivamente, tale SRP si lega ad un recettore localizzato sulla superficie del reticolo endoplasmatico ruvido (docking protein) ed indirizza il pre-pro PTH nascente attraverso un canale deputato al trasporto della molecola all’interno del reticolo. Sulla superficie interna della membrana del reticolo endoplasmatico è localizzata una peptidasi deputata al clivaggio della sequenza segnale; la molecola ottenuta è il pro PTH di 90 aminoacidi.

Il pro PTH viene trasportato, tramite vescicole, all’apparato di Golgi, dove viene rimossa la sequenza “pro”. Il PTH 1-84 così ottenuto viene in parte secreto ed in parte concentrato in vescicole secretorie, che, in risposta ad una riduzione del calcio extracellulare, si fondono con la membrana plasmatica e rilasciano il PTH (Fig. 4) (Kronenberg HM et al., 2001; Marcocci C et al., 2002).



**Figura 4** – Rappresentazione schematica della sintesi e della secrezione del PTH (Marcocci C et al., 2002).

La forma secreta è prevalentemente il PTH 1-84 (o PTH intatto iPTH). Vengono comunque secreti in quantità variabile, a seconda della presenza di ipo- o ipercalcemia, anche frammenti C-terminali della proteina (frammenti 37-84 e 34-84), biologicamente inattivi, derivanti dalla degradazione del PTH all'interno della cellula paratiroidea.

La degradazione intracellulare è, quindi, regolata dai livelli extracellulari di calcio.

In condizioni di ipercalcemia, infatti, la maggior parte di ormone secreto è costituita dai frammenti C-terminali, che non sono attivi sul recettore 1 del PTH (PTHr1), ma sono essenziali per il trasporto e la secrezione dell'ormone.

In condizioni di ipocalcemia, invece, oltre al rapido rilascio (da pochi secondi a 60 minuti) di PTH preformato (immagazzinato nelle vescicole), si riduce la degradazione intracellulare del PTH (in 20-30 minuti). Se l'ipocalcemia persiste aumenta l'espressione del gene del PTH e, in caso di ipocalcemia cronica,

aumenta la proliferazione delle cellule paratiroidi. L'emivita del PTH secreto è molto breve (circa 2-4 minuti).

Il metabolismo periferico del PTH avviene soprattutto nel fegato (60-70%), secondariamente nel rene (20-30%) e in minor misura anche in altri organi (*Martin KJ et al., 1973; Marcocci C et al., 2002*). Questo processo non è influenzato dalle concentrazioni sieriche di calcio o dal calcio introdotto con la dieta.

La clearance del PTH nel fegato è mediata dalle cellule di Kupffer che, dopo un sistema di ricaptazione (uptake) ad alta affinità e non saturabile, effettuano una rapida proteolisi del PTH.

La clearance renale avviene attraverso la filtrazione glomerulare: il PTH intatto viene quasi completamente riassorbito dalle cellule del tubulo prossimale attraverso il legame con una glicoproteina di membrana, detta megalina (un recettore per la proteina legante la vitamina D DBP), e successivamente degradato; in tal modo nelle urine si trovano soltanto piccole quantità di PTH intatto.

Studi *in vivo*, *in vitro* e l'analisi diretta del metabolismo periferico del PTH hanno mostrato che dopo la rapida rimozione dal circolo sanguigno, sia a livello epatico che renale, il 10-20% del PTH intatto viene rapidamente degradato dalle proteasi endocellulari in una serie di frammenti C-terminali, alcuni dei quali vengono reintrodotti in circolo. Soltanto l'1% della clearance totale del PTH avviene a livello dei tessuti periferici, attraverso il legame a recettori di membrana ad alta affinità (*Marcocci C et al., 2002*).

Il catabolismo intracellulare del PTH intatto avviene soprattutto a livello degli aminoacidi 33-34, 36-37, 40-41, 42-43. I frammenti C-terminali ottenuti hanno un peso molecolare compreso tra 4000-7000 Dalton e sono biologicamente inattivi, avendo perduto i primi aminoacidi N-terminali. Alcuni frammenti possono conservare la capacità di legarsi al PTHR1 (che risiede tra gli aminoacidi 7-34) comportandosi come "antagonisti fisiologici" del PTH (come il

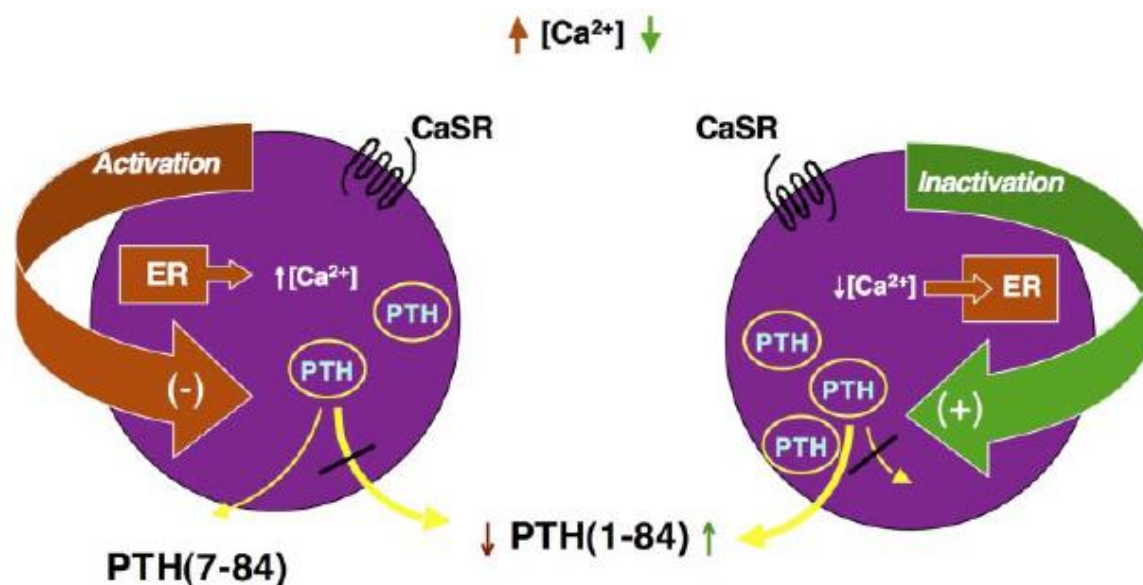
recentemente identificato PTH 7-84); non è chiaro ancora se tali frammenti comprendano l'intera porzione C-terminale del PTH, cioè fino al residuo 84. È probabile che anche frammenti più corti, non ancora identificati con le comuni tecniche di dosaggio, siano presenti in circolo.

Sebbene solo il 10-20% del PTH secreto sia convertito nei frammenti C-terminali, tali frammenti costituiscono il 50-90% dell'immunoreattività del PTH intatto circolante; ciò si verifica soprattutto perché la clearance dei frammenti C-terminali, che avviene soprattutto a livello renale, è significativamente più lenta (alcune ore) di quella del PTH intatto (alcuni minuti), ed anche perché, come si è detto precedentemente, gli stessi frammenti prodotti dal metabolismo periferico del PTH sono secreti insieme al PTH 1-84 dalle cellule paratiroidee (*D'Amour P et al., 1985; Marcocci C et al., 2002*).

Da tutto ciò deriva l'eterogeneità molecolare del PTH circolante, costituito dal PTH 1-84 e dai vari tipi di frammenti C-terminali, mentre non sono dimostrabili in circolo gli ipotetici frammenti N-terminali (frammento 1-34), che sono in grado di legarsi ai recettori del PTH (PTH1R e PTH2R) e di attivarli, derivati dalla rapida degradazione epatica.

Nell'insufficienza renale cronica, si determina un maggiore accumulo di frammenti C-terminali sia per la loro ridotta clearance a livello renale sia per l'aumentata produzione da parte delle paratiroidi iperplastiche di PTH e di frammenti C-terminali (*Marcocci C et al., 2002*).

La funzione principale del PTH è quella di mantenere la concentrazione di calcio nel liquido extracellulare entro uno stretto intervallo di normalità (Fig. 5).



**Figura 5** – Funzione del  $\text{Ca}^{2+}$  sulle paratiroidi (Friedman PA e Goodman WG, 2006).

I principali organi bersaglio dell'azione del PTH sono tre: rene, tessuto osseo ed intestino; a quest'ultimo livello l'ormone esercita soprattutto un effetto indiretto. A livello renale, il PTHR1 è espresso nelle cellule del tubulo prossimale, nella porzione corticale del tratto ascendente dell'ansa di Henle, nel tubulo distale e nel dotto collettore.

Le azioni dirette del PTH a livello renale sono descritte di seguito.

*Riduzione del riassorbimento del fosfato.* Tale azione si esplica attraverso l'inibizione del cotrasporto sodio-fosfato, soprattutto a livello del tubulo prossimale e in minor misura a livello del tubulo distale.

In condizioni fisiologiche, l'80% del fosfato filtrato viene riassorbito insieme al sodio nel tubulo prossimale per mezzo di un cotrasportatore sodio-fosfato. L'attività di questo sistema di trasporto è ridotta dal PTH che, attraverso un meccanismo cAMP-protein-chinasi dipendente, determina la fosforilazione della proteina e la conseguente rimozione endocitica della stessa dalla membrana apicale della cellula del tubulo prossimale (Caverzasio J et al., 1986; Marcocci C et al., 2002).

*Idrossilazione in posizione 1 $\alpha$  alla 25(OH)D sintetizzata a livello epatico.* Il PTH, infatti, stimola l'attività dell'enzima 1 $\alpha$ -idrossilasi renale, presente nelle cellule del tubulo prossimale, con produzione della forma attiva della vitamina D, ovvero 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Il meccanismo di regolazione dell'enzima non è noto, ma sembra essere indotto dal cAMP.

L'enzima 1 $\alpha$ -idrossilasi renale viene, inoltre attivato, dai bassi livelli di fosfato intracellulari determinati dall'azione del PTH (*Horiuchi N et al., 1977; Marocci C et al., 2002*).

*Aumento del riassorbimento tubulare del calcio.* Il PTH aumenta il riassorbimento di calcio nel tratto ascendente sottile dell'ansa di Henle ed a livello del tubulo distale.

Il meccanismo con cui si esplica l'azione del PTH a livello dell'ansa di Henle non è ben noto.

Attraverso l'attivazione del cotrasportatore di Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> e quella del canale per la fuoriuscita di potassio si determinerebbe un aumento del voltaggio intraluminale con conseguente incremento del trasporto intracellulare di calcio attraverso canali voltaggio-dipendenti; inoltre è presente una quota di riassorbimento di calcio transcellulare voltaggio-dipendente (*Di Stefano A et al., 1985; Marocci C et al., 2002*).

Il tubulo distale è la principale sede dove il PTH promuove il riassorbimento di calcio; a questo livello l'intera quota di calcio assorbito è sotto il controllo del PTH. L'ormone determina un'iperpolarizzazione delle cellule tubulari distali, mediante l'uscita di Cl<sup>-</sup> dalla membrana basolaterale con conseguente attivazione dei canali del calcio ed ingresso dello ione nella cellula.

Il calcio lascia la cellula a livello della membrana basolaterale ad opera dello scambiatore sodio-calcio, attivato dal PTH, e per mezzo di pompe ATP dipendenti (*Bringham FR et al., 1998; Marocci C et al., 2002*).

Attraverso questi meccanismi, in condizioni di eccesso di PTH, si determina ipercalcemia e conseguente aumento della quota di calcio filtrata dal glomerulo;

se tale quota supera la capacità di assorbimento tubulare si determina ipercalciuria.

All'ipercalcemia, e quindi all'ipercalciuria, contribuiscono, inoltre, l'aumento dell'assorbimento intestinale di calcio, l'aumento del riassorbimento di calcio dall'osso, ed anche l'inibizione del riassorbimento di calcio a livello della membrana basolaterale del tratto ascendente dell'ansa di Henle ad opera del Recettore-sensore del calcio (CaSR).

Il CaSR, attivato dal calcio, stimola la fosfolipasi A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) con produzione di acido arachidonico. Quest'ultimo inibisce il canale del potassio e il cotrasportatore di Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>, riducendo la differenza di potenziale transmembrana responsabile del trasporto intracellulare di cationi bivalenti; il CaSR inibisce, inoltre, l'adenilato-ciclasti attivata dal PTH (*Hebert SC et al., 1997; Marcocci C et al., 2002*).

A livello del tessuto osseo, il PTH determina sia un'azione catabolica (con stimolazione del riassorbimento osseo ed inibizione della sua neoformazione) che un'azione anabolica.

La stimolazione del riassorbimento osseo avviene attraverso l'aumento dell'attività degli osteoclasti. Queste cellule, tuttavia, non possiedono recettori che legano il PTH ad alta affinità.

L'azione del PTH sugli osteoclasti si esplica, infatti, attraverso la stimolazione degli osteoblasti, e forse anche dei loro precursori, che successivamente attivano gli osteoclasti con un meccanismo solo in parte noto.

L'effetto finale è un aumento del numero degli osteoclasti maturi attraverso una stimolazione della differenziazione dai loro precursori.

L'azione catabolica del PTH sull'osso deriva anche da una inibizione della neoformazione ossea, che si esplica attraverso alcuni effetti sugli osteoblasti. Il PTH, infatti, inibisce l'attività degli osteoblasti isolati riducendo la sintesi del collagene di tipo I (la proteina principale della matrice ossea), aumenta la produzione di proteasi che digeriscono la matrice, ed inibisce la conversione dei



precursori degli osteoblasti ad osteoblasti maturi.

L'effetto anabolico del PTH sull'osso è mediato da un pool di fattori di crescita, come IGF-I, IGF-II e TGF- $\beta$ , che sono rilasciati durante il riassorbimento osseo che avviene per opera degli osteoclasti attivi.

Il PTH comunque può stimolare direttamente il rilascio di IGF-I dagli stessi osteoblasti.

L'effetto netto del PTH sulla formazione dell'osso sia *in vivo* che *in vitro* dipende dalla concentrazione di PTH, dalla modalità di produzione o di somministrazione (intermittente o continua) e dal tipo di osso (corticale o trabecolare). Ciò è rilevante sia dal punto di vista clinico che terapeutico.

Nell'iperparatiroidismo (IPP), ad esempio, la secrezione continua del PTH determina riassorbimento osseo prevalentemente corticale con relativo risparmio dell'osso trabecolare ed ipercalcemia.

Al contrario, la somministrazione intermittente del PTH stimola la formazione ossea; ciò rappresenta la base dell'impiego terapeutico del PTH nell'osteoporosi (Marcocci C *et al.*, 2002).

## **L'omeostasi del calcio**

La quota di calcio extracellulare solubile costituisce solo una minima frazione del calcio corporeo totale (circa lo 0,1%, pari a 900 mg); tuttavia è la frazione che è più strettamente regolata da un complesso sistema omeostatico, che coinvolge le ghiandole paratiroidi ed altri tessuti contenenti cellule specializzate per il trasporto del calcio, quali l'intestino, l'osso e il rene.

Il 99% del calcio corporeo è contenuto, sotto forma di sali di calcio e fosfato, nello scheletro (circa 900-1400 g), dove consente la formazione di una rigida "impalcatura" che protegge gli organi vitali e permette il movimento.

Lo scheletro, pertanto, costituisce soprattutto una riserva di ioni calcio e fosfato.

Infatti, il calcio di un suo compartimento (pool di calcio scambiabile), in

costante equilibrio con il calcio del compartimento extracellulare, rappresenta la fonte principale di calcio nelle condizioni in cui i meccanismi omeostatici a livello intestinale e renale sono insufficienti al mantenimento di adeguati livelli di questo ione nel compartimento extracellulare.

Durante l'infanzia e l'adolescenza, quando si ha l'accrescimento somatico e scheletrico, l'organismo mantiene un bilancio positivo del calcio, cioè la quantità di calcio che entra nell'organismo è maggiore della quota eliminata.

Il bilancio è, invece, spesso negativo nell'anziano, dove la quantità di calcio totale corporeo si riduce principalmente a causa delle perdite dal tessuto osseo e per l'insufficiente apporto dietetico.

La fonte principale di calcio extracellulare è quella dietetica. L'introduzione alimentare giornaliera varia tra 0,4-1,5 g; il 30% circa è assorbito a livello intestinale.

Approssimativamente, 500 mg di calcio sono utilizzati quotidianamente dallo scheletro nei processi di formazione e riassorbimento osseo.

Per mantenere il bilancio del calcio in equilibrio, una quota variabile tra 0,15-0,30 g è escreta dal rene dopo i processi di filtrazione e di riassorbimento.

Del calcio totale sierico circolante il 47% è ionizzato (o calcio libero), il 46% è legato a proteine (75% del quale legato all'albumina), il 5-10% è complessato con piccoli anioni, tra cui fosfato, citrato, bicarbonato (*Walser M, 1961; Marcocci C et al. 2002*).

I principali effettori del sistema omeostatico che regola il flusso di calcio tra i vari compartimenti corporei e, in particolare, tra lo scheletro e lo spazio extracellulare, sono il PTH, la 25(OH)D, la 1,25(OH)<sub>2</sub>D, e la calcitonina (CT).

Questo sistema agisce principalmente a livello renale, intestinale ed osseo (*Steward AF e Broadus AE, 1987*).

Le cellule paratiroidi, attraverso il CaSR, localizzato sulla membrana plasmatica, risentono delle variazioni di concentrazione del calcio ionizzato (Ca<sup>2+</sup>), modificando la secrezione del PTH in modo inversamente proporzionale

ai livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  sierico.

Il CaSR è situato anche a livello delle cellule C della tiroide; queste cellule sono la principale sede di produzione della CT, un ormone polipeptidico di 32 aminoacidi, la cui secrezione è direttamente proporzionale ai livelli di calcio sierico.

La CT esercita il suo effetto biologico agendo su tre importanti punti del metabolismo osseo: sistema scheletrico, rene e tratto gastrointestinale.

La principale azione fisiologica della CT nel tessuto scheletrico è l'inibizione del riassorbimento osseo. Questa proprietà si esplica attraverso il legame della CT con specifici recettori sugli osteoclasti che vengono bloccati.

Nel rene, la CT aumenta la clearance urinaria del calcio e del fosfato. Infatti, in animali da laboratorio l'iniezione dell'ormone determina ipocalcemia e ipofosfatemia.

Nonostante i numerosi sforzi della ricerca, ad oggi il ruolo fisiologico della CT nell'uomo non è ancora ben definito.

L'aumento del PTH sierico in risposta ad un lieve calo del  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare (ipocalcemia) determina un aumento della sintesi della  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  nelle cellule del tubulo prossimale renale, un aumento dell'assorbimento intestinale di calcio e di fosfato, un aumento del riassorbimento di calcio nel rene e dell'escrezione di fosfato, accrescendo, così, la quota di calcio libero (non legato al fosfato in composti non solubili) e la fosfaturia.

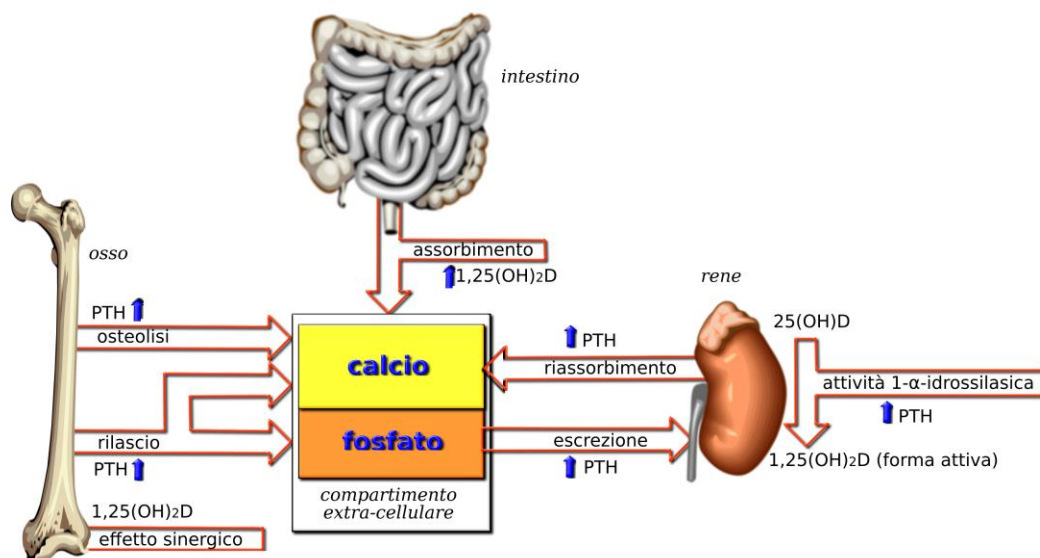
Quando la calcemia aumenta, lo stimolo alla secrezione di PTH ed alla formazione del metabolita attivo della vitamina D [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ] a partire dal suo precursore inattivo [ $25(\text{OH})\text{D}$ ] si riduce, e di conseguenza diminuiscono, attraverso un meccanismo opposto, l'assorbimento intestinale, il riassorbimento renale e la liberazione dall'osso (Marcocci C et al. 2002).

L'aumentata sintesi della  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , mediata dalla stimolazione dell'enzima  $1\alpha$ -idrossilasi, che aggiunge un ossidrile in posizione  $1\alpha$  alla  $25(\text{OH})\text{D}$  sintetizzata a livello epatico (Fraser DR e Kodicek E, 1973), stimola

direttamente l'assorbimento intestinale di calcio e fosfato, e, unitamente al PTH, aumenta il rilascio di calcio e fosfato dall'osso.

L'aumentato flusso di calcio nel compartimento extracellulare dall'intestino e dall'osso, insieme all'aumentata ritenzione renale, normalizzano i livelli di calcio circolante, con inibizione della sintesi e secrezione di PTH mediante un meccanismo a feed-back negativo (*Brown EM, 1991*).

L'eccesso di fosfato, mobilizzato dall'osso ed assorbito a livello intestinale, è compensato attraverso una sua aumentata eliminazione renale a causa dell'azione fosfaturica del PTH (Fig. 6).



**Figura 6** – Controllo ormonale dell'omeostasi del calcio e del fosforo (*Nussey SS e Whitehead SA, 2001*).

Sia gli ioni calcio che fosfato possono esercitare effetti diretti sulle cellule e sui tessuti che sono coinvolti nel loro meccanismo omeostatico.

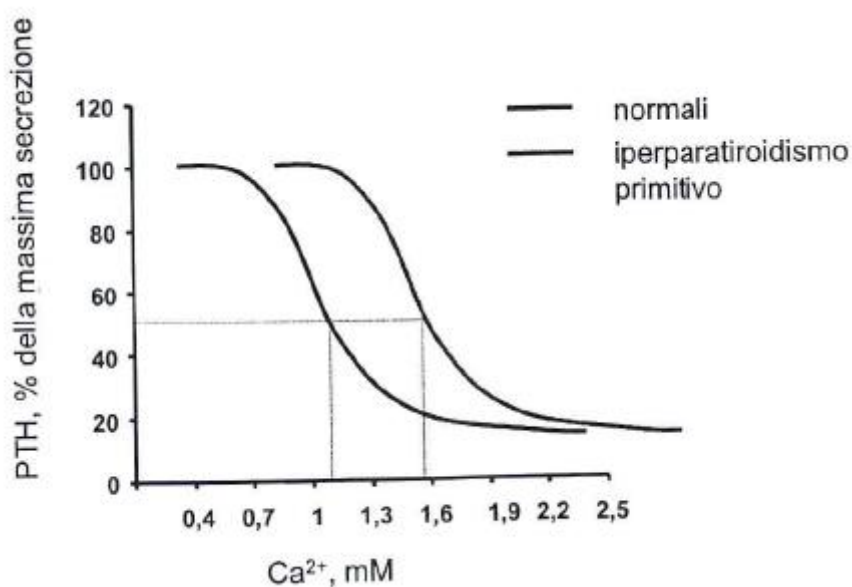
Gli ioni calcio non solo riducono la secrezione di PTH, ma inibiscono anche la sintesi della  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  a livello renale (*Weisinger JR et al., 1989*) e stimolano la funzione degli osteoblasti (*Quarles LD, 1997*), mentre inibiscono quella degli

osteoclasti (Zaidi M et al., 1999).

Gli ioni fosfato riducono l'attività dell'enzima  $1\alpha$ -idrossilasi renale, stimolano la funzione degli osteoblasti, inibiscono quella degli osteoclasti e stimolano vari aspetti della funzione paratiroidea.

Inoltre, i livelli sierici di calcio, fosfato e  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  regolano la proliferazione delle cellule paratiroidee.

La regolazione della secrezione del PTH da parte dei livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare (Fig. 7) è espressa da una relazione di tipo sigmoideale inverso, attraverso cui possono essere identificati alcuni importanti parametri: massima e minima capacità secretoria di PTH, e set-point.



**Figura 7** – Relazione di tipo sigmoideale inverso tra secrezione del PTH e livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  (Brown EM, 1999).

Questa curva sigmoideale inversa si ottiene valutando la concentrazione sierica di  $\text{Ca}^{2+}$  e PTH dopo induzione di ipocalcemia con somministrazione di citrato o EDTA, ed induzione di ipercalcemia mediante infusione di calcio.

La parte centrale della curva corrisponde al range normale delle concentrazioni

di  $\text{Ca}^{2+}$ .

Nella porzione ripida della curva si può rilevare come a piccole variazioni della concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  corrispondano notevoli variazioni della secrezione del PTH.

La massima capacità secretoria di PTH dà una misura della riserva di PTH che può essere liberata in risposta ad una marcata ipocalcemia. Essa aumenta in presenza di una iperplasia cellulare, come si ha nell'iperparatiroidismo primario (o primitivo IPP o pHPT) e nell'iperparatiroidismo secondario (SHPT). La secrezione di PTH non può essere totalmente inibita, anche a concentrazioni molto elevate di  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare.

Il set-point è definito come la concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  che determina una inibizione del 50% del rilascio di PTH.

In condizioni normali, il set-point delle cellule paratiroidee umane *in vitro* è circa 1,1-1,2 mmol/L.

Il controllo della secrezione del PTH da parte del  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare viene conservato anche nella patologia paratiroidea (Marcocci C et al., 2002).

Nell'IPP si assiste, tuttavia, ad uno spostamento del set-point verso destra, con media di 1,5 mmol/L, per una ridotta espressione cellulare del CaSR (Brown EM, 1999).

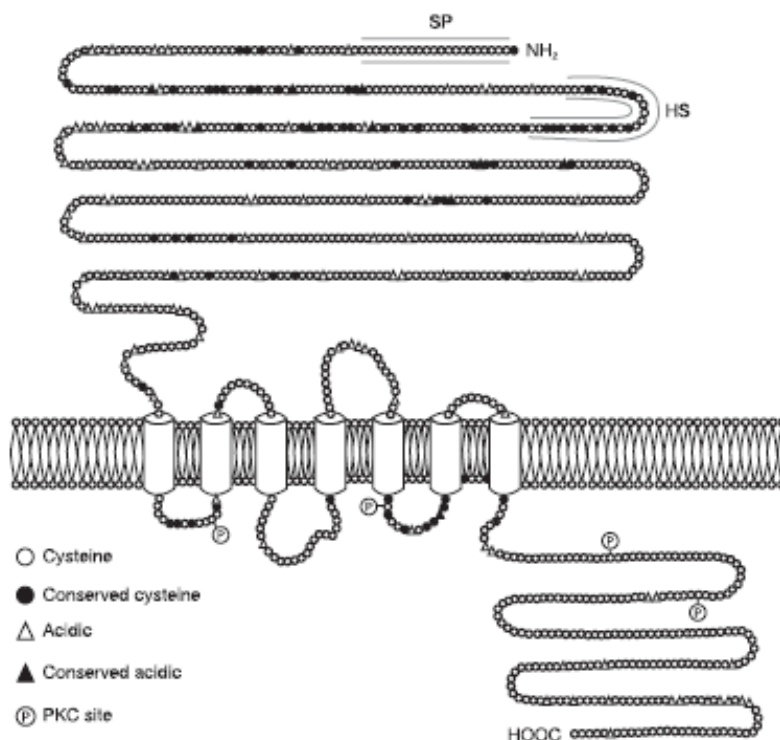
## **Recettore-sensore del calcio (CaSR)**

Il CaSR esplica un importante ruolo nel controllo della secrezione di PTH in funzione della concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare.

È una glicoproteina costituita da 1078 aminoacidi, che appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G, ed è espressa in membrana come un dimero a livello delle paratiroidi e di altri tessuti (cellule parafollicolari della tiroide, tubulo prossimale renale, osso, tessuto nervoso, ecc.).

Il CaSR è costituito da un ampio dominio N-terminale extracellulare (612

aminoacidi), probabilmente responsabile del legame di ioni calcio extracellulare, da una porzione transmembrana, e da una coda intracellulare (250 aminoacidi) (Fig. 8).



**Figura 8** – Struttura del CaSR (Marcocci C et al., 2002).

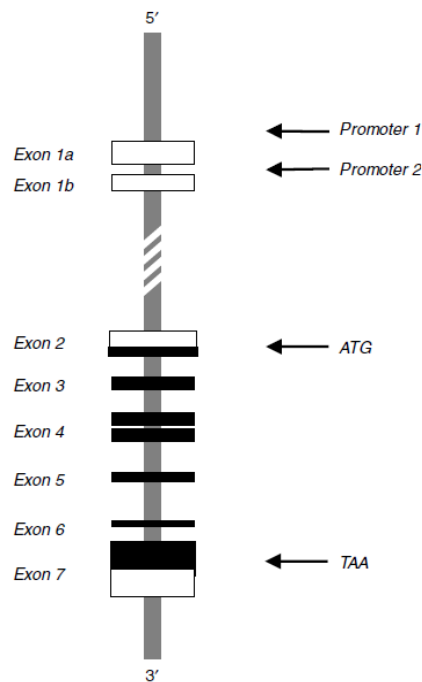
È attivato dall'aumento della concentrazione di ioni calcio extracellulare, che si legano al dominio extracellulare. Attraverso il suo dominio intracellulare, il CaSR stimola una proteina G (probabilmente Gq o G11), che attiva la fosfolipasi C (PLC), con conseguente aumento della produzione di inositolo 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>), aumento della mobilizzazione degli ioni calcio intracellulare, ed inibizione della secrezione di PTH (Brown EM, 1993) e del riassorbimento tubulare di calcio (Riccardi D et al., 1995).

Un'attivazione del metabolismo dei fosfatidilinositoli sembra mediare anche l'inibizione della secrezione del PTH in presenza di ipercalcemia.

L'attivazione del CaSR porta anche all'attivazione indiretta della fosfolipasi A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), che agisce, poi, sui fosfolipidi di membrana rilasciando acido arachidonico: saranno poi i metaboliti di questo, i leucotrieni, ad inibire direttamente la secrezione del PTH. Il CaSR, inoltre, influenza l'assorbimento intestinale di calcio (*Chattopadyay N et al., 1998*) ed il rimodellamento osseo (*Yamaguchi T et al., 2001*). Una stimolazione prolungata nel tempo del CaSR è, per di più, in grado di indurre, nell'arco di ore o giorni, una ridotta trascrizione dell'mRNA del PTH e, nell'arco di giorni o settimane, una riduzione degli eventi proliferativi cellulari.

Il gene che codifica il CaSR umano è stato clonato ed è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 13 (3q13.3-21). Si estende per 103 kb ed è composto da 7 esoni: gli esoni 1a e 1b codificano per 5'-UTRs alternativi, mentre gli esoni 2-7 codificano per la proteina CaSR. In particolare, l'esone 2 codifica parte del 5'-UTR, il codone di inizio della traduzione (ATG), e la parte N-terminale della proteina CaSR. L'esone 7 codifica la parte C-terminale della proteina CaSR, il codone di stop (TAA), e il 3'-UTR (Fig. 9) (*Vezzoli G et al., 2011*).





**Figura 9** – Struttura del gene *CaSR* (Vezzoli G et al., 2011).

Mutazioni inattivanti il gene del *CaSR* sono responsabili di alcune malattie genetiche caratterizzate da un'alterazione del sensore del  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare: pazienti con mutazione eterozigote hanno una lieve ipercalcemia, con livelli inappropriatamente normali di PTH (ipercalcemia ipocalciurica familiare FHH), mentre pazienti con mutazione omozigote presentano sin dalla nascita una ipercalcemia marcata associata ad elevati valori di PTH, iperplasia paratiroidea e patologia ossea (iperparatiroidismo neonatale grave NSHPT), condizione letale a meno che non si esegua la paratiroidectomia totale (Pollak MR et al., 1993).

Sono state, inoltre, descritte mutazioni attivanti il gene del *CaSR* in pazienti con ipocalcemia ed ipercalciuria familiare isolata (Pearce SHS et al., 1996).

Il *CaSR* è sensibile anche ad altri cationi polivalenti, quali il magnesio, cationi trivalenti e la neomicina.

Il magnesio, infatti, sia ad elevate concentrazioni (ottenibili solo farmacologicamente con la sua somministrazione endovenosa) che a basse

concentrazioni inibisce il rilascio di PTH.

Tre polimorfismi SNPs (polimorfismo a singolo nucleotide), determinanti variazioni aminoacidiche non conservative, codificanti la coda intracellulare del CaSR, sono stati descritti a livello dell'esone 7 (Cole DE et al., 1998).

Il polimorfismo più comune consiste nella sostituzione di una guanina con una timina al codone 986, che porta alla variante Ala986Ser (A986S) [dbSNP:rs1801725].

Gli altri due polimorfismi sono meno frequenti: una sostituzione adenina/guanina al codone 990 determina la variante Arg990Gly (R990G) [dbSNP:rs1042636]; una sostituzione citosina/guanina al codone 1011 determina la variante Gln1011Glu (Q1011E) [dbSNP:rs1801726].

Il polimorfismo A986S è piuttosto frequente nella popolazione generale e sembra avere un ruolo determinante nel controllo della concentrazione di  $Ca^{2+}$  extracellulare.

Cole e colleghi (Cole DE et al., 1998) hanno dimostrato come tale polimorfismo sia associato a più alti livelli sierici di calcio totale e ionizzato e possa predisporre donne adulte sane a patologie ossee o del metabolismo minerale, nelle quali la concentrazione di  $Ca^{2+}$  extracellulare svolge un ruolo prominente.

Alcuni autori hanno confermato questi effetti in pazienti caucasici (Lorentzon M et al., 2001; Vezzoli G et al., 2002), altri non li hanno confermati (Cetani F et al., 2002; Miedlich S et al., 2001; Bollerslev J et al., 2004).

Alcuni studi su soggetti umani (Pollak MR et al., 1993) e su cellule tubulari canine hanno evidenziato un effetto inibitorio del CaSR sul trasporto cellulare di calcio, suggerendo che esso giochi un ruolo chiave nella regolazione dell'escrezione di calcio.

Sulla base di queste osservazioni, Vezzoli e colleghi (Vezzoli G et al., 2002) hanno indagato la possibile associazione tra il CaSR e l'escrezione urinaria di calcio in pazienti calcolotici normocalciurici, in pazienti calcolotici ipercalciurici e in soggetti sani normocalciurici. Da questo studio è emerso che il polimorfismo

R990G sembra produrre un incremento della funzione del CaSR, che comporta un aumento dell'escrezione urinaria di calcio ed una maggiore suscettibilità all'iperparatiroidismo idiopatico.

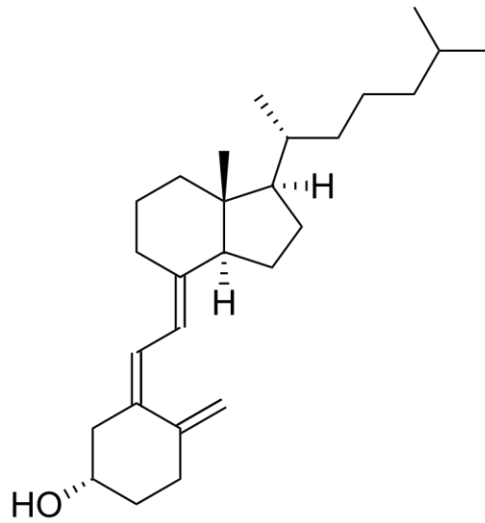
Scillitani e colleghi (*Scillitani A et al., 2004*) hanno valutato la frequenza dei tre polimorfismi e la loro associazione con il  $\text{Ca}^{2+}$  sierico in un'ampia popolazione adulta. Hanno confermato sia l'associazione tra l'aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  sierico e il polimorfismo A986S sia il ruolo dei polimorfismi R990G e Q1011E quali fattori predittivi significativi.

## **Vitamina D**

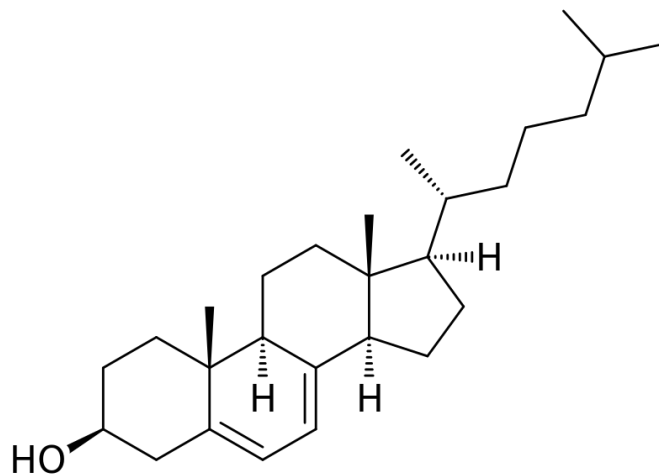
La principale fonte di vitamina D è costituita nell'uomo dall'esposizione cutanea alla luce solare (*Dusso AS et al., 2005*), mentre solo poche fonti alimentari naturali contengono quantità significative di tale ormone.

Il termine vitamina D si riferisce al nome generico di un gruppo di steroidi solubili, di cui le due principali forme sono l'ergocalciferolo (vitamina D2) e il colecalciferolo (vitamina D3).

Il colecalciferolo (Fig. 10) è derivante in minima parte dal colesterolo, ma soprattutto dal 7-deidrocolesterolo presente nella cute dopo irradiazione UVB (Fig. 11).



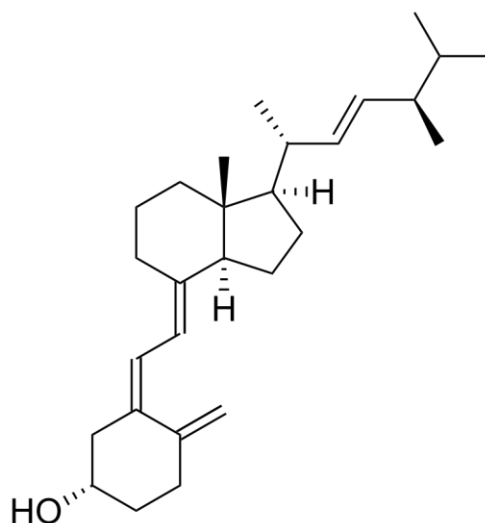
**Figura 10** – *Struttura del colecalciferolo (vitamina D3).*



**Figura 11** – *Struttura del 7-deidrocolesterolo.*

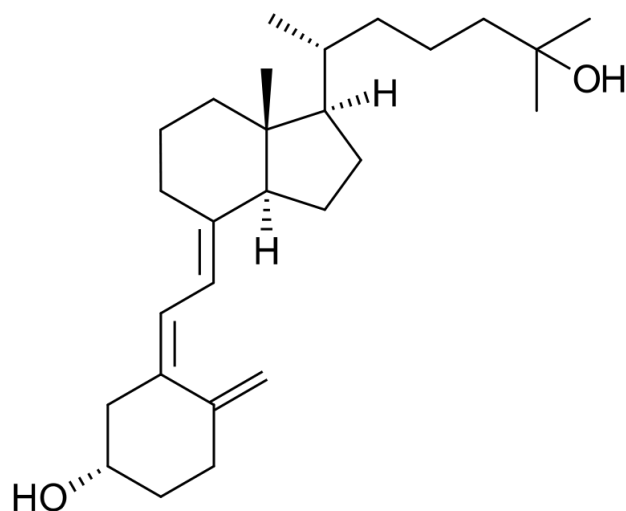
La migliore fonte alimentare di vitamina D3 è l'olio di pesce, in particolare salmone e sgombro.

L'ergocalciferolo, invece, è di provenienza solo vegetale, è prodotto dall'irradiazione UVB a partire dall'ergosterolo e può essere assunto esclusivamente con la dieta (verdure, lievito e funghi) (Fig. 12).



**Figura 12** – Struttura dell'ergocalciferolo (vitamina D2).

Entrambi sono composti biologicamente inerti e vengono trasformati, mediante due reazioni di idrossilazione, nella forma metabolicamente attiva (calcitriolo). Nel fegato, infatti, ergocalciferolo e colecalciferolo vengono convertiti nella 25-idrossivitamina D [25(OH)D] (chiamata anche calcidiolo o calcifediolo o 25-idrossicolecalciferolo) (Fig. 13), ad opera della 25-idrossilasi.



**Figura 13** – Struttura della 25-idrossivitamina D [25(OH)D].

La 25(OH)D è il migliore indicatore dello status di vitamina D. Fattori influenzanti i suoi livelli sono l'età, il tempo di esposizione ai raggi solari, la latitudine geografica, il colore della pelle e l'uso di protezione solare.

I livelli ottimali di 25(OH)D non sono stati definiti con esattezza. Molti suggeriscono che valori di 30 ng/mL possano essere considerati sufficienti, che livelli di 21-29 ng/mL siano insufficienti e che concentrazioni al di sotto di 20 ng/dL definiscano, invece, un vero e proprio stato deficitario (*Bischoff-Ferrari HA et al., 2006; Holick MF 2007; Holick MF 2006; Malabanan A et al., 1998; Thomas MK et al., 1998*).

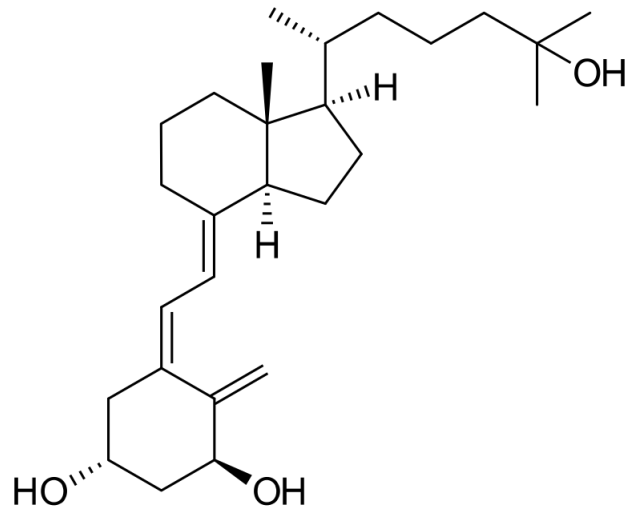
Tuttavia, l'insufficienza di vitamina D colpisce circa il 50% della popolazione mondiale. Questa alta prevalenza rappresenta un problema di salute pubblica particolarmente importante, poiché l'ipovitaminosi D è un fattore di rischio indipendente di mortalità nella popolazione generale. Inoltre, l'ipovitaminosi D è associata ad un incrementato rischio di eventi cardiovascolari (*Michal L et al., 2008; Pilz S et al., 2009*), di tiroiditi autoimmuni (*Wang J et al., 2015*) di alcuni tumori (*Feldman D et al., 2014; Buttigliero C et al., 2011; Li M et al., 2014*), di sclerosi multipla e di malattia di Alzheimer (*Gianfrancesco MA et al., 2017; Rhead B et al., 2017; Cédric A et al., 2012; Cédric A et al., 2016; M José Bagur et al., 2017*), di fenomeni depressivi.

Circa il 41% degli uomini e il 53% delle donne negli USA hanno livelli di vitamina D inferiori a 28 ng/mL (70 nmol/L) (*Zadshir A et al., 2005*).

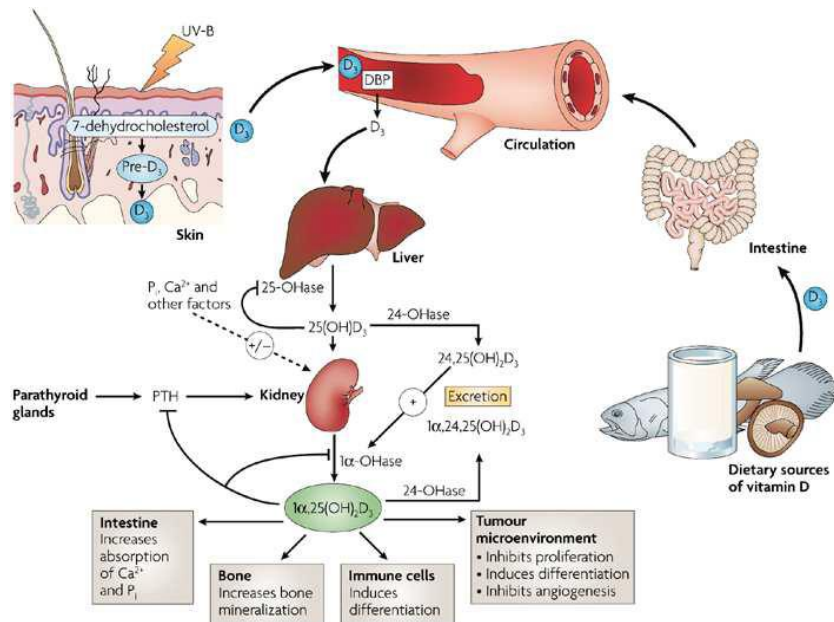
Una volta formata, la 25(OH)D passa nella circolazione generale e si lega ad una proteina trasportatrice specifica, nota come proteina legante la vitamina D (DBP).

Arrivata nel rene, la 25(OH)D può subire due diverse reazioni di idrossilazione, catalizzate da due differenti idrossilasi, l'1 $\alpha$ -idrossilasi e la 25-idrossivitamina D-24-idrossilasi, che danno origine, rispettivamente, alla 1,25-diidrossivitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] (denominata anche calcitriolo o 1,25-diidrossicolecalciferolo), la componente attiva, ed alla 24,25-diidrossivitamina D [24,25(OH)D] (nota

come acido calcitroico), una forma inattiva (Fig. 14-15) (De Luca HF, 2004; Prentice A et al., 2008; Fraser DR et al., 1970).



**Figura 14** – Struttura della 1,25-diidrossivitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D].



**Figura 15** – Metabolismo e funzioni della Vitamina D.

Sebbene il ruolo fondamentale della vitamina D nell'omeostasi del calcio e del fosforo e nei cambiamenti scheletrici sia conosciuto da lungo tempo, il suo ruolo extrascheletrico nell'uomo è stato ancora poco approfonditamente esplorato.

Esiste anche una produzione extrarenale di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  che, in questo caso, agisce per lo più come fattore autocrino/paracrino con funzioni cellulari specifiche. Recenti studi hanno, infatti, dimostrato la presenza di  $1\alpha$ -idrossilasi in numerose cellule e tessuti come mammella, prostata, colon, polmone, pancreas, cellule paratiroidi e monociti, dove la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  svolge funzioni differenti oltre a quelle riconosciute classicamente (*Dusso AS et al., 2005; Hewison M et al., 2004*), svolge un ruolo di regolazione della secrezione ormonale, regolazione della funzione immunitaria, nella proliferazione e differenziazione cellulare (come la differenziazione dei cheratinociti dell'epidermide e degli osteoclasti ossei).

L'attività dell' $1\alpha$ -idrossilasi renale è regolata dall'omeostasi del calcio e dall'attività del PTH. La restrizione dietetica di fosfato stimola, inoltre, tale attività indipendentemente dalle variazioni di PTH e calcio (*Dusso AS et al., 2005; Tanaka Y et al., 1973*). Tuttavia, la mancanza *in vitro* di un'azione diretta del fosfato su tale enzima suggerisce che questo effetto possa essere mediato da un ormone sistemico. Si presume che tale azione ormonale possa essere svolta dalle fosfatine (la più nota è il fattore di crescita dei fibroblasti 23 FGF-23), che modulano l'omeostasi del fosforo tramite regolazione del suo trasporto a livello tubulare renale, riducendo così il riassorbimento di fosfato e sopprimendo la formazione di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (*Dusso AS et al., 2005; Schiavi SC et al., 2004*). Altro fattore che regola negativamente l' $1\alpha$ -idrossilasi è klotho, una proteina transmembrana  $\beta$ -glucosidasi espressa nel tubulo distale del rene. Topi *klotho-null* presentano elevati livelli di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , calcio e fosfato e muoiono prematuramente per eccesso di calcificazioni ectopiche (*Dusso AS et al., 2005; Yoshida T et al., 2002*).

La regolazione dell' $1\alpha$ -idrossilasi extrarenale, invece, è differente da quella



dell'enzima renale; è difatti sotto il controllo di fattori locali, ossia citochine e fattori di crescita, che ottimizzano i livelli di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  necessari ad azioni autocrino/paracrine specifiche (*Dusso AS et al., 2005*).

I livelli di vitamina D sono regolati anche dall'enzima 25-idrossivitamina D-24-idrossilasi che catabolizza sia la  $25(\text{OH})\text{D}$  sia la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  in 24,25-diidrossivitamina D [ $24,25(\text{OH})\text{D}$ ], biologicamente inattivo e solubile in acqua.

I metaboliti della vitamina D sono molecole lipofile con bassa solubilità in acqua che vengono per il 99% trasportate in circolo legate a proteine plasmatiche. La più importante di queste proteine carrier è la proteina legante la vitamina D (DBP), che lega i metaboliti con alta affinità nell'ordine  $25(\text{OH})\text{D} = 24,25(\text{OH})_2\text{D} > 1,25(\text{OH})_2\text{D}$ .

La  $25(\text{OH})\text{D}$  legata alla DBP viene filtrata dal rene, captata dalle cellule dei tubuli prossimali attraverso un'endocitosi megalina-mediata ed idrossilata dall' $1\alpha$ -idrossilasi. In seguito, la DBP viene degradata.

I complessi DBP-metaboliti della vitamina D hanno accesso limitato alle cellule bersaglio e l'attività biologica della vitamina D è legata alla concentrazione di ormone libero. Topi *DBP null*, infatti, nonostante abbiano ridotti livelli di  $25(\text{OH})\text{D}$  e  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , non presentano rachitismo. Questa costituisce un'ulteriore dimostrazione del fatto che sia proprio la piccola quota libera di vitamina D ad espletare i suoi effetti biologici. La DBP svolge, quindi, un compito fondamentale nel tamponare i livelli liberi dei composti attivi della vitamina D impedendo, in questo modo, un'eventuale intossicazione (*Cooke NE et al., 1989*).

La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  favorisce il riassorbimento di calcio a livello renale, l'assorbimento intestinale di fosforo e calcio ed i processi di mineralizzazione dell'osso (cfr. Fig. 15). Ciò è fondamentale sia per la normale fisiologia cellulare, che per il mantenimento dell'integrità scheletrica.

Nell'intestino tenue, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  favorisce l'assorbimento di calcio, tramite la regolazione dell'espressione dei trasportatori per il calcio TRPV6 e TRPV5 e di

calbindina (una proteina intracellulare legante il calcio), ed aumenta il trasporto di fosfato, stimolando l'espressione del cotrasportatore sodio-fosfato.

La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  regola, inoltre, la risposta delle ghiandole paratiroidi alle concentrazioni dello ione calcio inibendo la sintesi di PTH.

A livello renale, inibisce l' $1\alpha$ -idrossilasi, stimola la 25-idrossivitamina D-24-idrossilasi, aumenta il riassorbimento di calcio, favorisce l'espressione di calbindina ed accelera il trasporto di calcio PTH-dipendente nel tubulo distale (*Dusso AS et al., 2005; Morris HA, 2004*).

La vitamina D espleta le sue attività biologiche attraverso il legame con il recettore nucleare VDR (conosciuto anche come recettore del calcitriolo o recettore della vitamina D o NR1I1), che agisce come un fattore di trascrizione nucleare. Il VDR viene codificato da un gene di grandi dimensioni ( $> 100$  kb), nominato gene VDR, situato sul cromosoma 12q12-14. Questo gene comprende due regioni promoter, otto esoni codificanti (in particolare 2-9) e sei esoni non tradotti (1a-1f).

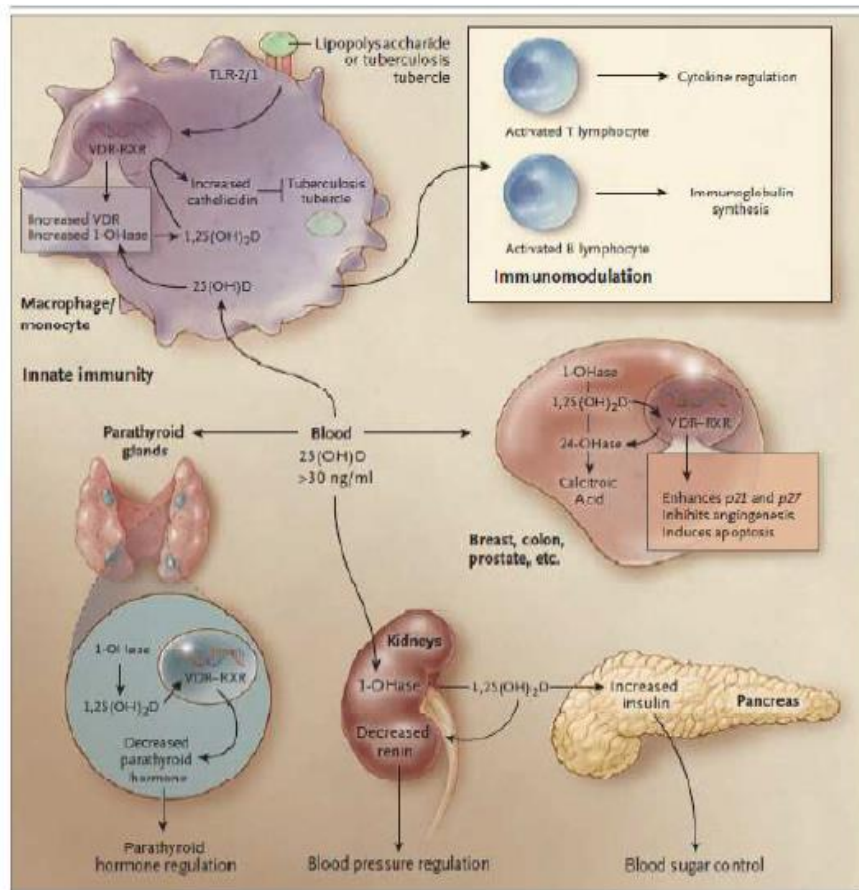
Dopo essere stato attivato dal calcitriolo, il VDR forma un complesso eterodimerico con il recettore dell'acido 9-cis retinico (o recettore X del retinoide RXR). Il complesso calcitriolo-VDR-RXR si lega ad una regione specifica del DNA, un sito di riconoscimento sul promotore di un gene bersaglio, chiamato elemento di risposta alla vitamina D (VDRE).

Al complesso calcitriolo-VDR-RXR si associano, inoltre, proteine accessorie dette coregolatori, la cui funzione consiste nel facilitare (coattivatori) o nel bloccare (corepressori) il legame con il complesso di inizio della trascrizione. Il VDR eterodimerizzato può difatti assumere due diverse conformazioni, che permettono l'esposizione di un sito di legame o per il corepressore o per il coattivatore; di conseguenza il calcitriolo sarà in grado di inibire o attivare la trascrizione di uno specifico gene, modulando così i valori del calcio nell'organismo.

L'ampia distribuzione del VDR a livello tissutale suggerisce che la vitamina D

possa avere ruoli fisiologici aggiuntivi.

Recettori VDR sono stati proprio identificati oltre che nel tessuto osseo, nelle cellule tubulari renali e nelle paratiroidi, anche nelle cellule endoteliali, nelle cellule muscolari lisce e in quelle del sistema immunitario (*Gonzalez-Parra E et al., 2012; Barnard K et al., 2010*). Pertanto, sono emerse ulteriori azioni della vitamina D, non note in precedenza, tra cui la regolazione della proliferazione/differenziazione cellulare, la modulazione del sistema immunitario, il mantenimento della funzionalità delle cellule  $\beta$  pancreatiche e l'influenza sulla contrattilità del miocardio (Fig. 16).



**Figura 16** – Funzioni extra-scheletriche della vitamina D.

Le prime alterazioni, in caso di carenza di vitamina D, consistono in diminuzione dei livelli sierici di calcio e fosforo con conseguente iperparatiroidismo secondario (SHPT) ed aumento della concentrazione di fosfatasi alcalina (ALP).

Inoltre, si hanno alterazione dei processi di mineralizzazione con rachitismo (nel bambino non esposto al sole) ed osteomalacia (nell'adulto non esposto al sole) e debolezza muscolare (*Tanner SB et al., 2015*), deformazione ossea (in caso di malattia ossea) e dolori (*Hsiao MY et al., 2015*).

### **Iperparatiroidismo primario (o primitivo IPP o pHPT)**

Con il termine *iperparatiroidismo* si intende ogni condizione anatomoclinica che sia caratterizzata da una patologica iperproduzione di PTH, da parte delle ghiandole paratiroidi, e dalle relative conseguenze.

A seconda della diversa eziopatogenesi, esistono varie forme di iperparatiroidismo. Ad oggi, infatti, ne sono distinguibili 4 tipi: iperparatiroidismo primario (o primitivo IPP o pHPT), iperparatiroidismo secondario (SHPT), iperparatiroidismo terziario ed iperparatiroidismo paraneoplastico (o pseudoiperparatiroidismo).

In particolare, l'IPP è una malattia endocrina caratterizzata dalla secrezione di PTH in eccesso rispetto alle esigenze omeostatiche, cui consegue l'ipercalcemia. Tale definizione è intesa a distinguere, sul piano nosografico, il pHPT dalle condizioni di SHPT, in cui i livelli calcemici sono ridotti o normali e l'aumentata secrezione di PTH rappresenta la risposta omeostatica delle ghiandole paratiroidi alla riduzione dei livelli di calcio, come nel caso di carenza di vitamina D o di malattia renale cronica.

Negli ultimi dieci anni, tuttavia, è stata riconosciuta una nuova forma di IPP, denominata iperparatiroidismo primario normocalcemico (NPHPT), caratterizzata da normali livelli di calcio totale e ionizzato, la cui diagnosi è

possibile solo dopo aver escluso tutte le cause note di SHPT.

Inoltre, molto recentemente, in diversi nuovi studi in letteratura è stato ben documentato un possibile nuovo fenotipo iperparatiroideo, caratterizzato da un'elevata concentrazione di calcio sierico con livelli di ormone paratiroideo costantemente normali (*Wallace LB et al., 2011; Applewhite MK et al. 2017; Lavryk OA e Siperstein AE, 2017; Lim JY et al., 2017; Amin AL et al., 2011; Kiriakopoulos A et al., 2018*). Questo nuovo tipo di pHPT è stato definito iperparatiroidismo primario normo-ormonale (NHpHPT).

Tra le cause di SHPT sono annoverate l'insufficienza renale cronica, la carenza di vitamina D (*Zink AR et al., 2001*), la sindrome da malassorbimento intestinale (dovuta, ad esempio, ad interventi di bypass intestinale), pseudoiperparatiroidismo per difetto di risposta nel recettore del PTH (PTHrP) e terapia cronica con litio (*Pomerantz JM, 2010*).

Il pHPT, che è stata una malattia abbastanza rara sino a 30 anni fa, è attualmente divenuta più frequente, grazie alla diffusione del dosaggio automatico della calcemia, fino a raggiungere il terzo posto tra le malattie endocrino-metaboliche dopo il diabete e le tireopatie (*Melton LJ III, 1991*).

La sua incidenza attuale è stimata intorno a 20-30 nuovi casi/anno/100.000 abitanti e la sua prevalenza si colloca intorno all'1% nella popolazione adulta, superando il 2% dopo i 55 anni, con un rapporto femmine/maschi di 3 a 1, soprattutto dopo la menopausa, mentre è rara prima della pubertà.

La storia clinica dell'IPP è notevolmente cambiata negli anni, soprattutto da quando la calcemia può essere routinariamente determinata nella popolazione generale.

Il pHPT può esistere sia nella forma sporadica che nelle forme ereditarie.

La forma sporadica è la più frequente (95% dei casi), di cui non sono noti fattori di rischio certi (*Bilezikian JP, 2007*), e può avvenire in conseguenza di un adenoma singolo (85% dei casi) o multiplo (4%), di un'iperplasia (10%) o, raramente, di un carcinoma (1%), cisti, lipoadenomi o lipoiperplasia.

Le forme ereditarie sono relativamente rare (< 5%) (Marx SJ et al., 2002) ed includono neoplasia endocrina multipla di tipo I MEN I (ereditata come carattere autosomico dominante e derivata da mutazioni germinali inattivanti il gene oncosoppressore MEN I), neoplasia endocrina multipla di tipo II A MEN II A (trasmessa come carattere autosomico dominante e causata, nella maggior parte dei casi, da mutazioni germinali attivanti il proto-oncogene c-RET), sindrome iperparatiroidismo-tumori mascellari pHPT-JT (ereditata come carattere autosomico dominante, causata da mutazioni germinali inattivanti il gene oncosoppressore HRPT2/CDC73 e caratterizzata da IPP associato a tumori fibroso-ossificanti della mandibola e/o mascella, cisti renali e ad altri tipi di lesioni), iperparatiroidismo primitivo familiare isolato FIHP (trasmesso come carattere autosomico dominante, ma di cui non si riconosce una precisa causa genetica), sindrome dell'ipercalcemia ipercalciurica familiare (ereditata come carattere autosomico dominante e prodotta da una mutazione germinale inattivante atipica a livello della coda intra-citoplasmatica del CaSR), ipercalcemia ipocalciurica familiare FHH (trasmessa come carattere autosomico dominante e provocata da mutazioni germinali inattivanti il gene codificante il CaSR) ed iperparatiroidismo neonatale grave NSHPT (forma molto rara e grave caratterizzata da severa ipercalcemia, ereditata come carattere autosomico recessivo e dovuta ad una mutazione germinale omozigote inattivante il gene codificante il CaSR).

La sintomatologia clinica dell'IPP comprende manifestazioni ossee (ridotta massa ossea, in particolare a livello del radio distale, del femore e della colonna lombare, cisti ossee, fratture patologiche, dolore osseo, granulazione del cranio "a sale e pepe", scomparsa della lamina dentaria, erosioni sub-periostali, specie a carico delle falangi), manifestazioni renali (calcolosi renale, ipofosforemia da ridotto riassorbimento tubulare di fosfati, lieve acidosi metabolica da perdita di bicarbonato, ipercalciuria da aumentato riassorbimento intestinale di calcio associato ad un incremento del riassorbimento osseo, rischio aumentato di



rilevazioni epidemiologiche in materia.

Infatti, la maggior parte dei pazienti è asintomatica e la condizione viene rilevata spesso incidentalmente, tramite esami del sangue o radiografie di controllo o eseguite per altri motivi (*Cipriani C et al., 2014; Adami S et al., 2002*).

La terapia di elezione dell'IPP è quella chirurgica, che va attuata appena possibile e che consiste nell'asportazione di uno o più adenomi, oppure, in caso di iperplasia di tutte le paratiroidi, nell'asportazione di 3 paratiroidi e nella resezione del 50% della quarta paratiroide.

In genere, se non ci sono porzioni di tessuto paratiroideo sfuggiti all'intervento oppure un ulteriore adenoma sfuggito all'esplorazione per le sue piccole dimensioni o metastasi funzionanti di un cancro paratiroideo, dopo la paratiroidectomia, il successo è manifestato dall'abbassamento netto della calcemia fin dal primo giorno.

Inoltre, dopo la paratiroidectomia possono comparire manifestazioni di tetania di breve o di lunga durata.

### **Iperparatiroidismo primario normocalcémico (NPHPT)**

Negli ultimi dieci anni, è comparso l'iperparatiroidismo primario normocalcémico (NPHPT), che è caratterizzato da un innalzamento persistente della concentrazione di PTH in associazione a calcemia totale ed a  $Ca^{2+}$  nei limiti della norma, in assenza di cause secondarie per l'aumento del PTH.

È stato proposto che il NPHPT sia la prima fase di un disordine bifasico, che successivamente potrebbe manifestarsi come pHPT ipercalcémico, occasionalmente "mascherata" dal deficit di estrogeni della menopausa.

Fino a tempi recenti, questa prima fase era sub-clinica, poiché i livelli di PTH venivano raramente misurati quando la calcemia era normale. La seconda fase coinciderebbe con l'IPP classicamente riconosciuto come ipercalcémico.

Il NPHPT è stato formalmente riconosciuto per la prima volta nel 2008



nell'ambito del Third International Workshop on the Management of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism (*Mazzuoli G e Minisola S, 2002; Cusano NE et al., 2013; Bilezikian JP et al., 2009; Marcocci C et al., 2015*).

Esistono pochi dati in letteratura sulla epidemiologia del NPHPT, ottenuti per bias metodologico (Tabella 1).

Infatti, Lundgren, in una coorte di 5202 donne svedesi in post-menopausa di età compresa tra i 55 ed i 75 anni, ha identificato 28 soggetti con PTH elevato e normali livelli di calcemia totale e  $\text{Ca}^{2+}$  (prevalenza dello 0,5%), non escludendo tuttavia le pazienti con carenza di vitamina D (*Lundgren E et al., 1997*).

I dati della coorte basata sulla popolazione del National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), comprendente uomini e donne di età superiore ai 45 anni, hanno mostrato una prevalenza dell'1% dopo aver escluso i pazienti affetti da insufficienza renale ( $\text{GFR} < 60 \text{ mL/min}$ ) e carenza di vitamina D [ $25(\text{OH})\text{D} < 30 \text{ ng/mL}$ ] (*Misra B et al., 2008*).

I dati dello studio multicentrico canadese dell'osteoporosi, che includeva uomini e donne tra i 31 ed i 97 anni (Canadian Multicentre Osteoporosis Study, CaMos), hanno mostrato una prevalenza del 16% dopo l'eliminazione di pazienti con  $25(\text{OH})\text{D} < 20 \text{ ng/mL}$ , ma non escludendo i pazienti con insufficienza renale (*Berger C et al., 2011*).

Infine, lo studio di Garcia-Martin ha identificato una prevalenza del 6% in una popolazione di 100 donne sane spagnole in post-menopausa, dopo aver escluso ipovitaminosi D, insufficienza renale e malnutrizione, non effettuando, tuttavia, il dosaggio del  $\text{Ca}^{2+}$  (*Garcia-Martin A et al., 2012*).

Dunque, l'ampio intervallo di prevalenza del NPHPT varia in base alla popolazione studiata riflette e le diverse metodologie utilizzate nell'esclusione delle cause di SHPT.

<b>Studio</b>	<b>Popolazione</b>	<b>Prevalenza</b>	<b>Commenti</b>
<i>Lundgren E et al., 1997</i>	5202 donne svedesi post-menopausa di età 55-75 anni	0,5%	Non escluse cause secondarie di iperparatiroidismo
<i>Misra B et al., 2008</i>	2370 donne e uomini americani di età > 45 anni (NHANES)	1%	Escluse insufficienza renale (GFR < 60 mL/min) e carenza di vitamina D (< 30 ng/mL). No Ca <sup>2+</sup>
<i>Berger C et al., 2011</i>	1871 uomini e donne canadesi di età 31-97 anni (CaMos)	16,7%	Esclusa carenza di vitamina D (< 20 ng/mL). No Ca <sup>2+</sup>
<i>Garcia-Martin A et al., 2012</i>	100 donne spagnole in post-menopausa	6%	Escluse patologie renali, carenza di vitamina D (< 30 ng/mL) e malnutrizione. No Ca <sup>2+</sup>

**Tabella 1** – Prevalenza dell'iperparatiroidismo primitivo normocalcemico (NPHPT) in varie popolazioni (Cusano NE et al., 2013).

Alcuni autori hanno suggerito che il NPHPT sia dovuto ad una resistenza degli organi bersaglio (osso e rene) all'azione del PTH (Maruani G et al., 2003).

Dopo aver confrontato pazienti con IPP ipercalcemico, secondo i parametri di età, sesso e livelli di PTH, i soggetti con valori normali di calcemia hanno dimostrato un'inadeguata soppressione del PTH in risposta ad un carico orale di calcio (Åkerström G e Hellman P, 2003; Rao DS et al., 2002; Marx SJ et al., 2002; Arnold A et al., 2002; Miedlich S et al., 2003; Maruani G et al., 2003).

Per quanto concerne la sintomatologia clinica del NPHPT, non ci sono dati sufficienti riguardo il quadro scheletrico dei pazienti con questa patologia.

Di particolare interesse è il lavoro di Charopoulos (Charopoulos I et al., 2006),

nel quale è stata utilizzata la tomografia computerizzata quantitativa periferica ad alta risoluzione (HRpQCT) per lo studio dello scheletro nei pazienti con NPHPT in confronto ai pazienti con IPP ipercalcemico.

Gli effetti catabolici sono stati riscontrati in entrambi i gruppi, ma più rilevanti nei pazienti ipercalcemici rispetto ai normocalcemici.

Le proprietà dell'osso corticale (situato a livello del radio distale e del femore) erano alterate anche nei pazienti con NPHPT, mentre era preservato l'osso trabecolare (posto nella colonna lombare e nel femore).

Il quadro renale, considerato una delle caratteristiche principali dell'IPP ipercalcemico, non era ugualmente presente nel NPHPT, in quanto determinato prevalentemente dall'ipercalcemia.

### **Aspetti diagnostici del NPHPT**

Come è stato precedentemente detto, il NPHPT è una variante dell'IPP classico con ipercalcemia ed è caratterizzato da concentrazioni sempre elevate di PTH sierico con valori persistentemente normali di calcemia totale e  $\text{Ca}^{2+}$ , in assenza di cause secondarie per l'aumento del PTH sierico.

Quindi, per distinguere i pazienti con pHPT da quelli affetti da NPHPT, i criteri diagnostici per quest'ultimo devono includere un valore di calcemia totale (corretta per il tasso di albumina sierica) e di  $\text{Ca}^{2+}$  sempre normali. Inoltre, devono essere escluse le possibili cause secondarie di aumento dei valori di PTH sierico.

Le condizioni che devono essere escluse per poter porre diagnosi di NPHPT sono descritte di seguito.

*Carenza di vitamina D.* Esiste una relazione inversa tra PTH e 25(OH)D. Per determinati livelli di riduzione di 25(OH)D, le ghiandole paratiroidi sono stimolate ad aumentare la secrezione di PTH. Vi è controversia riguardo quale sia il valore soglia a cui avviene l'aumento di secrezione del PTH.

L'Istituto di Medicina afferma che non vi sono evidenze conclusive che livelli di 25(OH)D maggiori di 20 ng/mL siano regolarmente associati ad incremento dei livelli di PTH. Ad ogni modo, per avere la certezza di una diagnosi di NPHPT, è necessario garantire dei livelli di 25(OH)D superiori a 30 ng/mL.

Vi è anche un altro motivo per il raggiungimento di livelli di sufficienza di 25(OH)D: occasionalmente, alcuni pazienti normocalcemicici con valori di PTH elevati possono diventare ipercalcemicici quando i livelli di 25(OH)D sono portati al di sopra dei 30 ng/mL. In tale situazione, la diagnosi corretta è, quindi, l'IPP ipercalcemico classico mascherato da una carenza di vitamina D (*Ross AC et al., 2011*).

*Ridotta clearance della creatinina.* I valori di PTH iniziano ad aumentare con un filtrato glomerulare inferiore a 60 mL/min. Inoltre, è stato recentemente dimostrato che nell'IPP ipercalcemico la riduzione del filtrato glomerulare al di sotto di 60 mL/min è associata ad un aumento dei parametri del riassorbimento scheletrico. Pertanto, sembra ragionevole richiedere che il valore di filtrato glomerulare sia maggiore di 60 mL/min per porre diagnosi di NPHPT (*Martinez I et al., 1997; National Kidney Foundation, 2003; Kidney International, 2009; Walker MD et al., 2012*).

*Farmaci.* I tiazidici ed il litio sono stati entrambi associati ad un aumento dei livelli di PTH, per cui devono essere considerati come possibile causa di aumento dei valori di PTH nei soggetti che li assumono. Se il dato biochimico persiste dopo la sospensione di questi farmaci per alcuni mesi, la diagnosi di NPHPT può essere presa in considerazione (*Paloyan E et al., 1969; Mallette LE et al., 1989*).

*Ipercalciuria renale.* L'ipercalciuria come disordine primario renale può essere associata con un aumento secondario dei livelli del PTH (*Coe FL et al., 1973; Coe FL et al., 1992; Pak CYC et al., 1975*).

*Disordini gastrointestinali associati al malassorbimento di calcio.* Spesso, ma non sempre, la diagnosi di sindrome di malassorbimento è semplice ed evidente.

Il morbo celiaco, ad esempio, può essere presente anche in soggetti senza alcun sintomo del tratto gastroenterico. Tale patologia va, quindi, esclusa nei soggetti con carenza di vitamina D e bassi livelli di calciuria, prima di poter porre diagnosi di NPHPT (*Selby PL et al., 1999; Balsa JA et al., 2008*).

## **Polimorfismi del gene codificante per il CaSR ed iperparatiroidismo**

Le cellule paratiroidee, attraverso il CaSR, localizzato sulla membrana plasmatica, risentono delle variazioni di concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$ , modificando la secrezione di PTH in modo inversamente proporzionale ai livelli di calcio.

Pregressi lavori hanno documentato come lo sviluppo clinico di IPP sia associato a fattori genetici, in particolare a polimorfismi del VDR (*Carling T et al., 1995*).

Sulla base di tali osservazioni, alcuni autori hanno indagato il possibile ruolo dei polimorfismi del gene codificante per il CaSR nella determinazione dell'iperparatiroidismo.

Yano e colleghi (*Yano S et al., 2000*) hanno dimostrato come il polimorfismo R990G del CaSR sia associato ai livelli sierici di PTH in pazienti emodializzati con SHPT.

Yamauchi e colleghi (*Yamauchi M et al., 2001*) hanno studiato lo stesso polimorfismo nell'ambito del pHPT, dimostrando come esso condizioni la severità clinica della malattia.

Scillitani e colleghi (*Scillitani A et al., 2007*) hanno condotto uno studio da cui è emersa una stretta associazione tra l'aplotipo SRQ (986S + R990 + Q1011) del CaSR e lo sviluppo dell'IPP.

La variante A986S, che è la più frequente nella popolazione italiana affetta da pHPT, non sembra avere un ruolo nel determinismo della malattia (*Cetani F et al., 2002*). Sembra, tuttavia, rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasia delle paratiroidi nel sesso maschile. È quanto è emerso da uno studio

di Miedlich e colleghi (*Miedlich S et al., 2001*), che ha, inoltre, evidenziato come la presenza del genotipo Q1011E possa influenzare il decorso clinico della malattia.

Per quanto concerne l'SHPT con stadio terminale dell'insufficienza renale (uremia), recenti studi clinici e sperimentali hanno suggerito un importante ruolo del CaSR e del VDR nella regolazione del rilascio di PTH da parte delle ghiandole paratiroidi e nella proliferazione delle cellule paratiroidi. L'espressione di tali recettori è ridotta nei pazienti uremici con severo SHPT.

Il trapianto di rene corregge le anomalie del metabolismo minerale che, durante l'uremia, causano SHPT ed osteodistrofia renale.

Nonostante ciò, la diminuita espressione del CaSR e del VDR mRNA persiste suggerendo un loro possibile ruolo nel determinismo dell'SHPT persistente dopo trapianto di rene.

## SCOPO DEL LAVORO

La presentazione clinica dell'iperparatiroidismo primario (o primitivo IPP o pHPT) è andata modificandosi nel tempo, passando da una forma plurisintomatica ad una forma asintomatica e, negli ultimi dieci anni, alla comparsa della forma normocalcémica. Come mostrato precedentemente in tabella 1 (cfr. Pag. 41), molti studi hanno indagato la prevalenza dell'IPP normocalcémico (NPHPT), ma sono stati utilizzati diversi metodi per escludere le cause secondarie di aumento del PTH.

In più, diversi lavori scientifici hanno dimostrato l'importanza relativa di ogni singolo fattore nell'influenzare la secrezione di PTH.

Oltre alla consolidata relazione inversa tra  $\text{Ca}^{2+}$  sierico e PTH, alcuni recenti studi hanno esaminato la relazione tra la 25(OH)D e il PTH, ma i risultati sono stati contrastanti in termini di forza delle correlazioni (*Vieth R et al., 2005; Heaney RP, 2005*) e il valore putativo a cui il PTH inizia ad aumentare (*Souberbielle JC et al., 2017; Touvier M et al., 2014; Valcour A et al., 2012*).

La maggior parte dei lavori, che è stata condotta sia *in vitro* che *in vivo* per tentare di comprendere la regolazione della secrezione del PTH, ha indagato su un solo referente, come il calcio totale e il PTH (*Minisola S et al., 1993*), la 25(OH)D e il PTH (*Souberbielle JC et al., 2016*) e la 1,25(OH)<sub>2</sub>D e il PTH (*Ritter CS e Brown AJ, 2011*).

Molti di questi studi hanno incluso un numero relativamente piccolo di soggetti o pazienti afferenti a centri terziari per le Malattie Metaboliche Dello Scheletro, introducendo, così, bias inerenti che potrebbero essere significativi. Inoltre, è noto che la secrezione di PTH non è regolata dal calcio totale sierico, ma dalla sua frazione ionizzata, che rappresenta la porzione metabolicamente attiva (lo stesso è vero per il magnesio). Il  $\text{Ca}^{2+}$  può essere dedotto indirettamente dai valori del calcio totale sierico corretti per il tasso di albumina sierica; tuttavia, questo metodo è impreciso. Di conseguenza, la maggior parte dei professionisti

che operano in questo ambito medico ritiene che la determinazione quantitativa del  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare sierico rappresenti il gold standard, specialmente quando si differenziano i pazienti IPP dai soggetti normali (*Ong GS et al., 2012*).

Nel laboratorio di Malattie Metaboliche Dello Scheletro (presso il Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche dell'Ospedale Policlinico Umberto I di Roma), in cui ho svolto il lavoro sperimentale, si sta indagando l'epidemiologia del NPHPT dopo aver escluso tutte le possibili cause di aumento del PTH in presenza di normocalcemia, e si stanno sorvegliando nel tempo le modificazioni cliniche e biochimiche legate alla patologia. Il mio lavoro si inserisce in questo contesto e rappresenta un ulteriore tentativo di fornire nuovi strumenti sia per la valutazione della prevalenza del NPHPT in una popolazione sana di riferimento, che accede al Policlinico Umberto I di Roma per donare il sangue, sia per la comprensione delle basi genetiche di tale patologia.

Inoltre, questo studio mira a valutare l'importanza relativa del  $\text{Ca}^{2+}$ , del  $\text{Mg}^{2+}$ , della 25(OH)D e della 1,25(OH)<sub>2</sub>D nella regolazione della secrezione del PTH in una grande coorte di più di 2.000 volontari sani (*Ferrone F et al., 2019*).

Per quanto riguarda l'analisi genetica che ho condotto nel laboratorio dell'Unità di Genetica Medica (presso il Poliambulatorio "Giovanni Paolo II" dell'Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo, Foggia), l'obiettivo è stato quello di verificare una possibile relazione genetica tra i polimorfismi del gene CaSR, collegati al fenotipo iperparatiroideo, ed i soggetti volontari sani che mostrano valori di PTH al di sopra dei livelli normali, in assenza di ipercalcemia e dopo supplementazione con colecalciferolo.



## MATERIALI E METODI

### Donatori (pazienti e controlli)

Per valutare la prevalenza della forma di iperparatiroidismo primario normocalcemico (NPHPT) e per studiare l'influenza relativa del calcio ionizzato ( $\text{Ca}^{2+}$ ), del magnesio ionizzato ( $\text{Mg}^{2+}$ ), della 25-idrossivitamina D [25(OH)D] e della 1,25-diidrossivitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] nella regolazione della secrezione di paratormone (PTH) in soggetti sani è stata studiata una popolazione di 2355 donatori volontari di sangue risultati idonei (1731 uomini e 624 donne), di età compresa tra i 18 ed i 68 anni (età media  $40,5 \pm 12,05$ ) (*Ferrone F et al., 2019*). Tale popolazione è stata selezionata da donatori volontari di sangue giunti presso il Centro trasfusionale "Ad Spem" del Policlinico Umberto I di Roma, dopo aver volontariamente accettato di partecipare ad uno studio di prevalenza del NPHPT, condotto a partire da marzo 2014 fino a luglio 2015.

Lo studio è stato regolarmente accettato dal Consiglio del Dipartimento di Medicina Interna e Discipline Mediche e successivamente approvato dal Comitato Etico dell'Università "Sapienza" di Roma il 17 gennaio 2014. La ricerca è stata effettuata in conformità con la Dichiarazione delle Associazioni Mediche Mondiali di Helsinki (Principi etici per la ricerca medica che coinvolgono soggetti umani).

Sono stati scelti, come popolazione target di questo lavoro, i donatori volontari di sangue perché, per definizione, sono soggetti presumibilmente normali; prima della donazione, infatti, sono stati controllati per possibili anomalie biochimiche, quali elevate transaminasi sieriche, iperglicemia, anomalie dei fattori della coagulazione, ecc.

Il numero sbilanciato tra maschi e femmine che si osserva nella popolazione selezionata riflette il requisito primario nell'investigazione della prevalenza del NPHPT per il successivo arruolamento.

Ai soggetti presi in esame è stato fornito un questionario autosomministrato per

documentare lo stile di vita, le precedenti patologie o l'assunzione di farmaci che potrebbero interferire con il metabolismo del calcio e del fosforo.

Nessun individuo è stato escluso per le condizioni mediche, tranne alcuni che sono stati inizialmente eliminati dallo studio perché hanno dichiarato di aver assunto farmaci che influenzano il metabolismo minerale (cioè, i tiazidi).

Gli individui che hanno assunto calcio e/o vitamina D supplementari non sono stati esclusi.

Dopo la firma del consenso informato e l'inclusione nello studio, gli infermieri del centro trasfusionale hanno misurato, utilizzando una bilancia da bagno calibrata con la precisione fino a 0,1 kg, i soggetti possibilmente a digiuno con abiti leggeri e senza scarpe; l'altezza è stata misurata mediante uno stadiometro con la precisione fino a 0,001 m per il calcolo dell'indice di massa corporea (BMI).

In seguito, è stato prelevato un campione ematico per il dosaggio del  $\text{Ca}^{2+}$  sierico, del  $\text{Mg}^{2+}$ , della 25(OH)D, della 1,25(OH)<sub>2</sub>D e del PTH nello stato di digiuno. Ad eccezione del  $\text{Ca}^{2+}$  e del  $\text{Mg}^{2+}$ , dosati il giorno del prelievo (entro 2 ore dalla raccolta, mentre la temperatura ambiente è stata mantenuta a 4°C) (Cipriani C et al., 2010), i campioni di sangue aliquotato sono stati conservati a -80°C e dosati in un secondo momento.

A causa dei limiti tecnici imposti dallo strumento utilizzato per dosare la 25(OH)D e il PTH (LIAISON<sup>®</sup>, DiaSorin USA, Stillwater, MN, USA), i saggi di tali ormoni calciotropi sono stati eseguiti su base settimanale, mentre quelli della 1,25(OH)<sub>2</sub>D (LIAISON XL<sup>®</sup>, DiaSorin USA, Stillwater, MN, USA) sono stati raggruppati in 3 sessioni di lunga durata.

La popolazione presa in esame è stata poi approfonditamente analizzata (visita ambulatoriale, raccolta dell'anamnesi, determinazione di creatinina, proteine, alanina aminotransferasi, colesterolo, trigliceridi, ferro, ferritina glucosio, dosaggio degli anticorpi IgA anti-transglutaminasi, densitometria minerale ossea a livello lombare, femorale e radiale), e trattata, in caso di carenza di vitamina D

[25(OH)D < 30 ng/mL], con colecalciferolo al dosaggio di 50.000 UI settimanali per os per quattro settimane.

Tra questi 2355 soggetti, sono stati individuati 31 casi di NPHPT asintomatici (8 dei quali con ipercalciuria renale), caratterizzati da un aumento persistente dei livelli di PTH non attribuibile ad alcuna causa secondaria. Per conoscere il motivo per cui tali pazienti presentano una persistenza dei livelli di PTH al di sopra dei valori normali ( $6,5 \text{ pg/mL} \leq \text{PTH} \leq 36,8 \text{ pg/mL}$ ), è stato sottoposto il loro DNA ad un'analisi di associazione genetica con i polimorfismi del gene CaSR, collegati al fenotipo iperparatiroideo. Tutti i soggetti a cui non è stata diagnosticata alcuna forma di iperparatiroidismo sono stati utilizzati come controlli sani per questa prima parte dello scopo del presente lavoro.

Per quanto riguarda lo studio dell'influenza relativa del  $\text{Ca}^{2+}$ , del  $\text{Mg}^{2+}$ , della 25(OH)D e della 1,25(OH)<sub>2</sub>D nella regolazione della secrezione di PTH in soggetti sani, soltanto 2259 donatori su 2355 sono risultati soggetti sani (*Ferrone F et al., 2019*).

Sono stati esclusi per questa seconda parte dello scopo del presente lavoro 96 soggetti: 31 pazienti con NPHPT (8 dei quali con ipercalciuria renale) che sono al centro di una parte di questo studio; 30 pazienti con IPP; 26 pazienti che sono stati considerati come valori anomali in base ai valori di  $\text{Ca}^{2+}$  e PTH (vedi sezione analisi statistica); 7 pazienti con ipoparatiroidismo idiopatico; 2 soggetti per problemi tecnici (cioè, campioni di sangue inadeguati, problemi di conservazione).

I 2259 soggetti nella nostra analisi includono 1652 uomini e 607 donne di età compresa tra i 18 ed i 68 anni (età media  $40,3 \pm 11,85$ ).

## **Determinazione quantitativa degli elettroliti $\text{Ca}^{2+}$ extracellulare e $\text{Mg}^{2+}$ in siero mediante metodo iono-selettivo**

Le misurazioni degli elettroliti  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare e  $\text{Mg}^{2+}$  nel siero dei donatori volontari di sangue sono state condotte mediante il metodo iono-selettivo con l'analizzatore biochimico completamente automatizzato NOVA 8 (Nova Biomedical, Waltham, MA).

Questo metodo si basa sulla valutazione quantitativa dell'attività di una specie ionica  $a$  (definita come il prodotto tra la concentrazione di uno ione in soluzione  $C$  ed il coefficiente di attività ionica  $f$ ) in funzione del potenziale elettrodico prodotto dallo stesso ione sulla superficie del corrispettivo elettrodo iono-selettivo (o sensore iono-selettivo ISE), composto da un vetro elettroconduttivo multicompetente con ossido di litio o da una resina a scambio di ioni con una selettività elevata.

Oltre, a questi due elettroliti, l'analizzatore Nova 8 può misurare anche il sodio ( $\text{Na}^+$ ), il potassio ( $\text{K}^+$ ), il pH del sangue, l'ematocrito (Hct), il magnesio normalizzato ed il calcio normalizzato (sono un risultato calcolato sul  $\text{Mg}^{2+}$  o sul  $\text{Ca}^{2+}$  e sul pH del campione sottoposto ad analisi).

In dettaglio, a partire da campioni di sangue intero, raccolti in semplici provette BD (Becton Dickinson) Vacutainer tappo rosso (senza additivo) da 10 mL, si è proceduto come segue: i campioni di sangue intero sono stati lasciati coagulare per almeno 30-60 minuti dal momento del prelievo venoso; dopo la retrazione del coagulo, i campioni di sangue intero sono stati centrifugati a 1.000 RCF (Forza Centrifuga Relativa) per 10-15 minuti, al fine di separare fisicamente il siero dalla componente cellulare del sangue; in seguito, prima di iniziare le analisi, si è proceduto con la calibrazione dei sensori iono-selettivi (ISE) dello strumento.

Con una calibrazione su due punti completa, l'analizzatore Nova 8 misura gli analiti con determinati standard contenuti nella confezione reagenti e genera

un'equazione che viene usata per calcolare le concentrazioni dei campioni. Lo strumento calibra gli ISE ogni 2 ore circa.

Nel caso in cui non sia possibile analizzare subito il campione, è bene lasciare il siero separato a 22°C (temperatura ambiente) per non più di 8 ore. Se le analisi non vengono completate entro 48 ore o se il campione di siero va conservato per più di 48 ore, è opportuno congelare i campioni a -20°C.

Le analisi dei campioni con l'analizzatore Nova 8, che utilizza un microcomputer ed un sistema basato su un menù di impostazioni per l'elaborazione delle istruzioni e dei dati dei campioni, presuppone quattro fasi: selezione della modalità di analisi (singola o multipla); definizione del tipo di campione (siero, plasma o sangue intero) e dei dati del campione; selezione dei test per le analisi del campione; avvio dell'analisi (viene aspirato un volume di 180 µL di campione da una sonda ad ago estensibile, che lo invia ad un "treno" di ISE, dove viene analizzato).

Ad analisi ultimata, sullo schermo dell'analizzatore Nova 8 compaiono i risultati relativi alle concentrazioni degli ioni calcio e magnesio nel siero di ogni campione esaminato.

### **Determinazione quantitativa degli ormoni calciotropi PTH 1-84, 25(OH)D (e di altri metaboliti idrossilati della vitamina D), e 1,25(OH)<sub>2</sub>D tramite immunodosaggio a chemiluminescenza (CLIA)**

La misurazione degli ormoni calciotropi PTH 1-84, 25(OH)D (e di altri metaboliti idrossilati della vitamina D), e 1,25(OH)<sub>2</sub>D è stata realizzata mediante un immunodosaggio a chemiluminescenza (CLIA) con due analizzatori completamente automatizzati della DiaSorin: LIAISON<sup>®</sup> e LIAISON XL<sup>®</sup>.

Il primo è stato adoperato per la valutazione quantitativa del PTH 1-84 e della 25(OH)D (e di altri metaboliti idrossilati della vitamina D) nel siero dei donatori

volontari di sangue, mentre il secondo è stato utilizzato per quella della 1,25(OH)<sub>2</sub>D sugli stessi campioni.

Il meccanismo di funzionamento è il medesimo.

L'immunodosaggio (o immunoassay) sfrutta il legame specifico di un anticorpo verso il suo antigene, rivelando il prodotto primario della reazione immunochimica, cioè del complesso antigene-anticorpo; può utilizzare gli anticorpi come specifici reagenti o gli antigeni per la determinazione di specifici anticorpi.

La determinazione dell'analita non marcato, generalmente l'antigene, presente nel campione può essere determinata in due modi: determinazione competitiva e determinazione non competitiva (o sandwich).

Nella determinazione competitiva, l'antigene da quantificare, non marcato e presente nel campione, compete con l'antigene marcato dell'immunodosaggio nel legame all'anticorpo specifico.

Nella determinazione non competitiva (o sandwich), invece, l'antigene da quantificare, non marcato e presente nel campione, viene legato tra due anticorpi altamente specifici, di cui uno è marcato (analita marcato). La concentrazione dell'analita marcato è direttamente proporzionale alla quantità di antigene presente nel campione.

La dimostrazione diretta del complesso antigene-anticorpo non è possibile, ma richiede la marcatura di uno dei partner della reazione.

Nell'immunodosaggio a chemiluminescenza (CLIA), è l'anticorpo specifico ad essere marcato, in genere, con un estere di acridinio o con un derivato dell'isoluminolo.

La Chemiluminescenza, infatti, è una reazione chimica nella quale un particolare composto chimico viene ossidato, emettendo energia sotto forma di luce nel passaggio da uno stato di eccitazione elettronica allo stato basale.

I test DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> sono suddivisi in 3 grandi categorie, in base al numero richiesto di sequenze di incubazione (cioè, al numero di volte che un

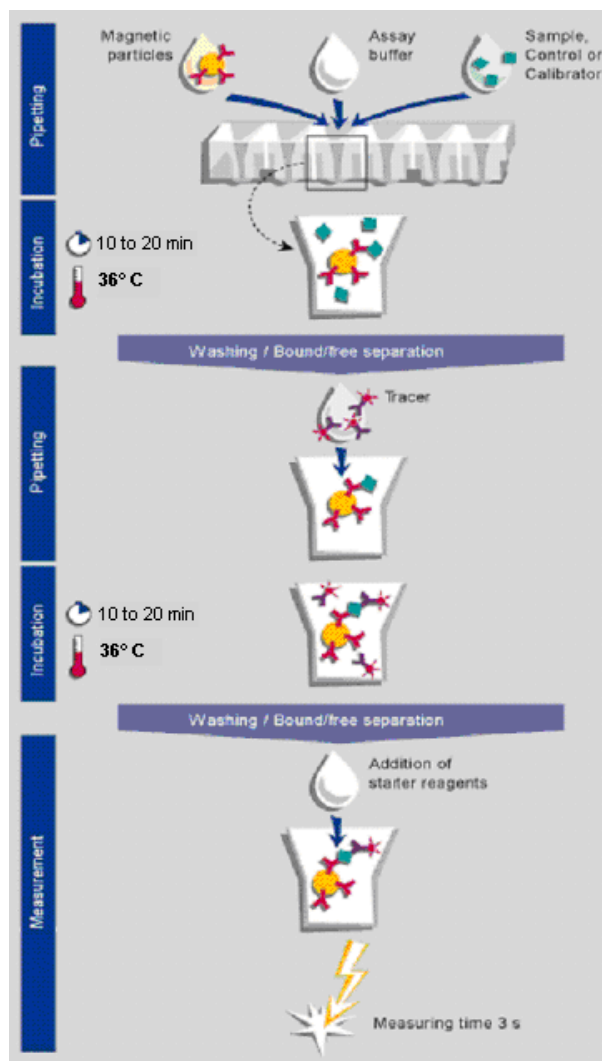
campione deve essere posto nell'incubatore durante l'esecuzione): test a 1 fase, test a 2 fasi e test a 3 fasi.

Il test DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> PTH 1-84 (1-84 PTH, DiaSorin USA, Stillwater, MN, USA) viene usato per la determinazione quantitativa del PTH 1-84 nel siero umano e nel plasma con EDTA. Ha una specificità del 100% rispetto al PTH 1-84 e non presenta reazione crociata con il frammento PTH 7-84. I coefficienti di variazione intra- e inter-dosaggio sono rispettivamente del 4,1% e del 5,2%.

Le misurazioni dei livelli di PTH sono utilizzate per la diagnosi differenziale di ipercalcemia ed ipocalcemia secondarie a disturbi del metabolismo del fosforo e del calcio, di iperparatiroidismo primario e secondario, di insufficienza renale, di sindrome da malassorbimento, di pseudoiperparatiroidismo e di pseudoipoparatiroidismo.

Il range di normalità dei livelli sierici o plasmatici di PTH 1-84 è compreso tra 6,5 pg/mL e 36,8 pg/mL.

Il test DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> PTH 1-84 è un CLIA di tipo sandwich in due step (test a 2 fasi), a due siti, che adopera due anticorpi policlonali per la cattura e il rilevamento della molecola PTH 1-84 (Fig. 18).



**Figura 18** – Esempi di procedura per “test a fasi” (DiaSorin USA, Stillwater, MN, USA).

Questa analisi utilizza un campione di 150  $\mu\text{L}$  di siero umano o plasma con EDTA incubato con un anticorpo policlonale coniugato con isoluminolo ad elevata specificità per la regione N-terminale del peptide PTH 1-84 (tracciante). Successivamente alla prima incubazione ed al primo ciclo di lavaggio, particelle paramagnetiche rivestite con un altro anticorpo policlonale, che si lega alla regione C-terminale della molecola PTH 1-84, vengono aggiunte alla reazione ed incubate (metodo di separazione). L’uso di questi anticorpi assicura che venga rilevato solo il PTH 1-84, senza cross-reattività con altri frammenti, quali il PTH



7-84.

In seguito, la cuvetta contenente il peptide PTH 1-84 legato tra i due anticorpi altamente specifici viene esposta ad un campo elettromagnetico che attira le particelle paramagnetiche verso i magneti, intrappolando la molecola PTH 1-84. Dopo la seconda incubazione, il materiale non legato è rimosso mediante un secondo ciclo di lavaggio. In un secondo momento, vengono aggiunti i reagenti starter che inducono una reazione di chemiluminescenza con andamento di tipo “flash”. La luce emessa chimicamente viene misurata da un fotomoltiplicatore (PMT) selezionato, molto sensibile ed a basso rumore. L'intervallo di misura lineare del fotomoltiplicatore è di 300-650 nm. Il picco di luce della chemiluminescenza viene emesso ad una lunghezza d'onda di 420 nm.

Il PMT funziona come un contatore di fotoni ultraveloce. Gli impulsi sono amplificati da un amplificatore elettronico molto veloce. Nella scatola del PMT è presente anche un circuito che sopprime il rumore dei segnali del PMT.

Il segnale luminoso (dati grezzi) è misurato in unità luminose relative (RLU, relative light units) ed è proporzionale alla concentrazione di PTH 1-84 presente nei calibratori, nei controlli o nei campioni.

L'analizzatore LIAISON<sup>®</sup> calcola automaticamente la concentrazione di PTH 1-84 nei campioni. Questa concentrazione è espressa in pg/mL.

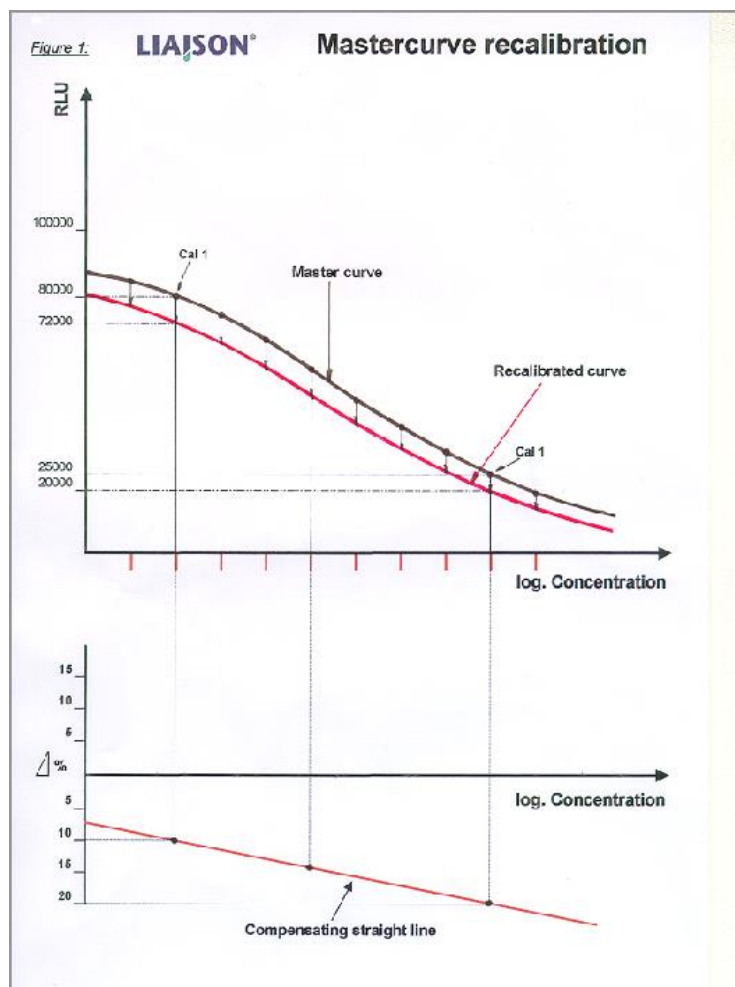
La riduzione dei dati (calibrazione) viene eseguita utilizzando una curva master con ricalibrazione a 2 punti.

Il punto di partenza della riduzione è la curva master memorizzata nell'analizzatore e, di solito, definita per mezzo di 10 punti di base.

Vengono, poi, misurati due calibratori con valori di concentrazione definiti. Questi segnali misurati (RLU) sono confrontati con il segnale della curva master delle corrispondenti concentrazioni dei calibratori.

In seguito, viene calcolata la differenza relativa tra le RLU misurate e le RLU master dei calibratori e viene eseguita un'extrapolazione lineare tra le RLU ricalcolate (asse Y) e le concentrazioni (asse X) logaritmiche (log.).

Sulla base di opportuni fattori di compensazione, viene eseguito un riaggiustamento dei punti della curva master in modo da ottenere, per mezzo di una “funzione spline cubica”, la curva di lavoro, che corrisponde alle effettive condizioni durante la misura (Fig. 19).



**Figura 19** – Concetto di calibrazione: esempio (DiaSorin USA, Stillwater, MN, USA).

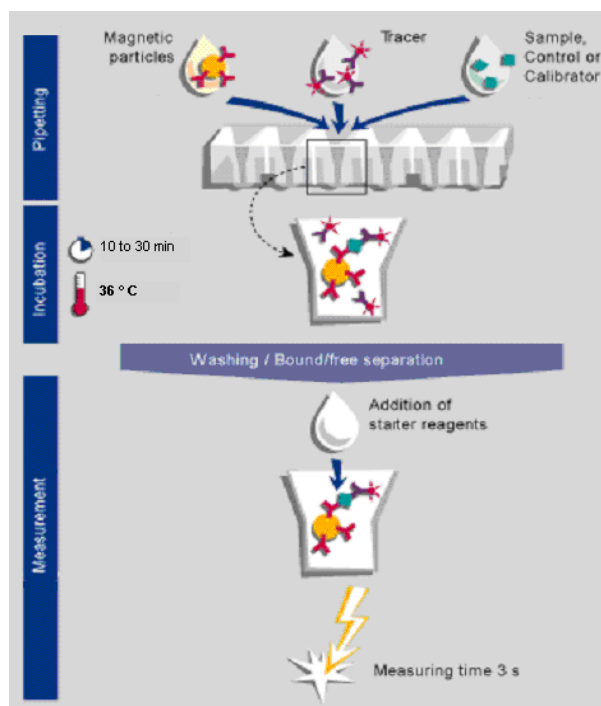
Il test DiaSorin LIAISON® 25 OH Vitamina D (Vitamin D TOTAL Assay, DiaSorin USA, Stillwater, MN, USA) viene usato per la determinazione quantitativa della 25-idrossivitamina D [25(OH)D] e di altri metaboliti idrossilati della vitamina D nel siero umano, nel plasma con EDTA o nel plasma con litio eparina.

Ha una specificità del 100% sia per la vitamina D2 che per la vitamina D3, un range di misurazione compreso tra 4 ng/mL e 150 ng/mL ed una sensibilità funzionale  $\leq 4$  ng/mL. I coefficienti di variazione intra- e inter-dosaggio sono rispettivamente dell'8,9% e del 12,8%.

La vitamina D (D3, D2 e loro metaboliti) viene convertita a 25-idrossivitamina D [25(OH)D] nel fegato. La misurazione della concentrazione sierica o plasmatica di 25(OH)D è il più valido indicatore di stato nutrizionale per la vitamina D.

Il livello ottimale di 25(OH)D è oggetto di dibattito anche se un livello  $> 30$  ng/mL ( $> 75$  nmol/L) è considerato sufficiente per la buona salute delle ossa (il range di normalità dei livelli sierici o plasmatici di vitamina D è compreso tra 30 ng/mL e 100 ng/mL).

Il test DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> 25 OH Vitamina D è un CLIA di tipo competitivo diretto (test a 1 fase) (Fig. 20).



**Figura 20** – Esempio di procedura per “test a 1 fase” (DiaSorin USA, Stillwater, MN, USA).

Questa analisi utilizza un campione di 175  $\mu\text{L}$  di siero umano o plasma con EDTA/litio eparina incubato con un anticorpo policlonale ad elevata specificità per la 25(OH)D, che riveste le particelle paramagnetiche (fase solida). Durante la prima incubazione, la 25(OH)D è dissociata dalla proteina legante la vitamina D (DBP).

In seguito, la cuvetta contenente la 25(OH)D legata all'anticorpo policlonale altamente specifico viene esposta ad un campo elettromagnetico che attira le particelle paramagnetiche verso i magneti, intrappolando la molecola 25(OH)D. Dopo 10 minuti, viene aggiunta come tracciante la 25(OH)D legata ad un derivato dell'isoluminolo.

Dopo una seconda incubazione di 10 minuti, il materiale non legato viene rimosso mediante un ciclo di lavaggio.

Successivamente, come per la determinazione quantitativa del PTH 1-84, vengono aggiunti i reagenti starter che inducono una reazione di chemiluminescenza di tipo "flash".

Il segnale luminoso è misurato da un fotomoltiplicatore (PMT) come unità luminose relative (RLU, relative light units) ed è inversamente proporzionale alla concentrazione di 25(OH)D presente nei calibratori, nei controlli o nei campioni.

La riduzione dei dati (calibrazione) viene eseguita nella medesima maniera di quella del PTH 1-84.

Il test DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> XL 1,25 diidrossivitamina D (1,25 Dihydroxyvitamin D, DiaSorin USA, Stillwater, MN, USA) viene usato per la determinazione quantitativa della 1,25-diidrossivitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] nel siero umano, nel plasma con EDTA o nel plasma con litio eparina.

Ha una specificità del 100% sia per la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> che per la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (senza cross-reattività con altre forme di vitamina D), un range di misurazione compreso tra 5 pg/mL e 200 pg/mL ed una sensibilità funzionale  $\leq 5$  pg/mL. I coefficienti di variazione intra- e inter-dosaggio sono rispettivamente del 2,1% e

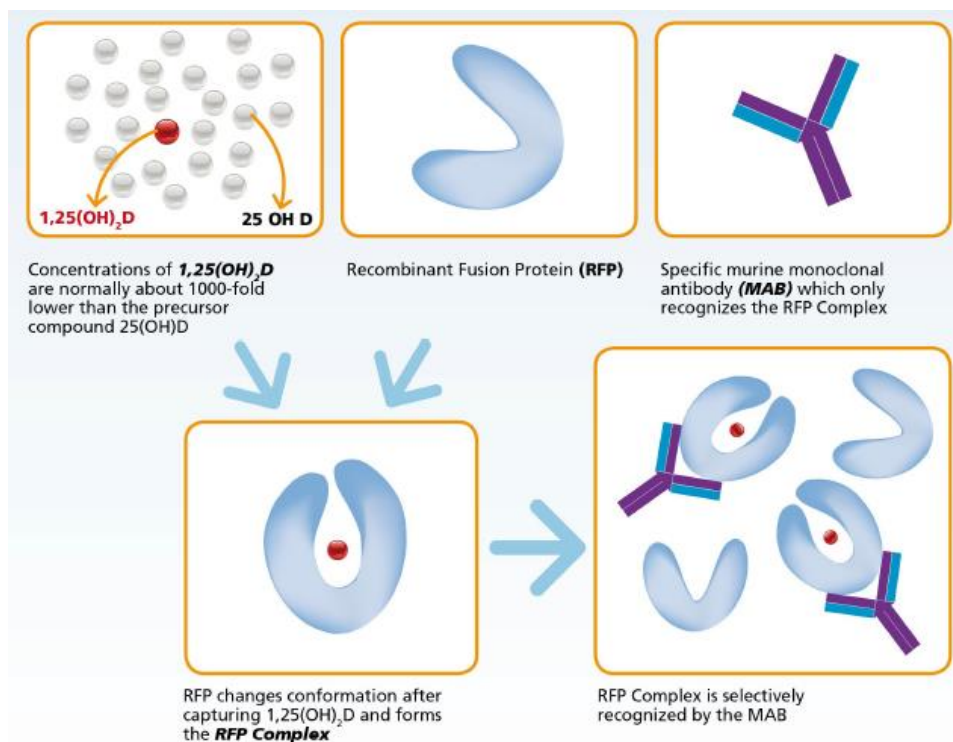
del 4,9%.

Il range di normalità dei livelli sierici o plasmatici di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  è compreso tra 19,9 pg/mL e 79,3 pg/mL.

Bassi livelli di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  si possono riscontrare nella malattia renale cronica (CKD), nel rachitismo dipendente dalla vitamina D di tipo 1, nel rachitismo ipofosfatemico e nell'ipoparatiroidismo.

Al contrario, elevati livelli di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  si possono rilevare nel rachitismo dipendente dalla vitamina D di tipo 2, nella sarcoidosi, nell'artrite reumatoide, nelle malattie infiammatorie intestinali (IBD, come colite ulcerosa e morbo di Crohn), e nell'IPP.

Il test DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> XL  $1,25$  diidrossivitamina D è un CLIA di tipo sandwich modificato in tre step (test a 3 fasi), che adopera una proteina di fusione ricombinate (RFP) per catturare le molecole di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  ed un anticorpo monoclonale murino specifico (MAB), che riconosce selettivamente il complesso RFP-molecola  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (Fig. 21).



**Figura 21** – Meccanismo di funzionamento del test DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> XL 1,25 diidrossivitamina D (DiaSorin USA, Stillwater, MN, USA).

Questa analisi utilizza un campione di 225 µL di siero umano o plasma con EDTA/litio eparina incubato con la proteina di fusione ricombinate (RFP) (agente legante) e il buffer del saggio. Quando la RFP cattura le molecole di 1,25(OH)<sub>2</sub>D subisce un cambio conformazionale e forma il complesso RFP, composto dalla RFP e dalla molecola di 1,25(OH)<sub>2</sub>D legata ad essa.

Dopo la prima incubazione, viene aggiunto un anticorpo monoclonale murino (MAB) ad elevata specificità per il complesso RFP, che riveste le particelle paramagnetiche (fase solida).

In seguito, la cuvetta contenente il complesso RFP legato al MAB viene esposta ad un campo elettromagnetico che attira le particelle paramagnetiche verso i magneti, intrappolando il complesso RFP.

Dopo la seconda incubazione, il materiale non legato viene rimosso mediante un

primo ciclo di lavaggio.

La terza fase consiste nell'aggiunta di un anticorpo monoclonale murino (MAB) coniugato con isoluminolo ad elevata specificità per il complesso RFP (tracciante).

Dopo la terza incubazione, il materiale non legato viene rimosso mediante un secondo ciclo di lavaggio.

Successivamente, come per la determinazione quantitativa del PTH 1-84 e della 25(OH)D, vengono aggiunti i reagenti starter che inducono una reazione di chemiluminescenza di tipo "flash".

Il segnale luminoso è misurato da un fotomoltiplicatore (PMT) come unità luminose relative (RLU, relative light units) ed è proporzionale alla concentrazione di 1,25(OH)<sub>2</sub>D presente nei calibratori, nei controlli o nei campioni.

La riduzione dei dati (calibrazione) viene eseguita nella medesima maniera di quella del PTH 1-84 e della 25(OH)D.

## **Estrazione DNA genomico**

L'estrazione del DNA genomico è stata condotta sia mediante il metodo manuale del "salting out" che tramite il sistema di purificazione del DNA ad alto rendimento automatizzato BioRobot™ EZ1 (Qiagen); quest'ultimo utilizza la tecnologia silice-particelle magnetiche.

Il metodo manuale del "salting out" prevede che i leucociti isolati vengano trattati con un tampone di lisi, SDS e proteinasi K allo scopo di estrarre gli acidi nucleici e degradare le proteine presenti che vengono allontanate mediante precipitazione con i sali.

In dettaglio, a partire da campioni di sangue intero reso incoagulabile con EDTA, citrato o eparina, si è proceduto come segue: a 200 µL di sangue sono stati aggiunti 600 µL di RCLB (Red Cell Lysis Buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 5

mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM NaCl), al fine di lisare gli eritrociti per osmosi; dopo aver centrifugato a 1.800 rpm per 10 minuti, si è proceduto alla rimozione del sovrnatante risospesando nuovamente il pellet in 600 µL di RCLB. Tali operazioni sono state ripetute per almeno 2-3 volte al fine di assicurare la lisi completa di tutti i globuli rossi e l'arricchimento progressivo di leucociti nel pellet. Questi ultimi sono stati, quindi, risospesi in 150 µL di WCLB (White Cell Lysis Buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 10 mM EDTA, pH 8.0; 50 mM NaCl), che provoca la lisi dei leucociti e l'inattivazione delle DNAsi tramite la chelazione da parte dell'EDTA dei cationi bivalenti, essenziali per l'attività catalitica.

Dopo un'accurata agitazione, sono stati aggiunti 2 µL di 10% SDS (sodiododecilsolfato, denaturante) e 2 µL di proteinasi K (200 mg/mL) per la precipitazione e l'eliminazione delle proteine ancora legate al DNA.

I campioni così trattati sono stati mantenuti a 56°C per un'ora, oppure in alternativa a 37°C per tutta la notte.

Successivamente, si è aggiunto 80 µL di una soluzione satura di acetato di sodio, che ha provocato la rimozione dei frammenti peptidici. Questi, dopo centrifugazione a 2.600 rpm a 4°C per 15 minuti, sono rimasti adesi alle pareti del tubo da microcentrifuga contenente il campione, mentre il sovrnatante con il DNA è stato trasferito in una nuova provetta.

Si è aggiunto, poi, ad esso 200 µL di alcool isopropilico (2-propanolo).

In questo stadio, agitando dolcemente ciascun campione per inversione, è possibile osservare la presenza del DNA che precipita sotto forma di un ammasso "medusoide" bianco.

Ciò è reso possibile dal fatto che l'alcool isopropilico (con una costante dielettrica minore dell'acqua) favorisce la formazione di legami ionici tra i cationi in soluzione (Na<sup>+</sup>) e i gruppi fosfato dell'impalcatura del DNA.

Dopo centrifugazione (15 minuti a 13.000 rpm a 4°C), si è eliminato l'alcool isopropilico e il DNA rimasto sul fondo della provetta è stato lavato con 300 µL



di etanolo al 70%, che permette la rimozione dei sali di DNA tramite l'allontanamento dei cationi ad esso complessati.

Quest'ultima operazione è stata ripetuta per una seconda volta al fine di assicurare un corretto lavaggio del pellet di DNA.

Infine, dopo aver eliminato l'etanolo per evaporazione, il DNA è stato risospeso in 30  $\mu$ L di Low-TE (1 mM Tris, pH 7.6; 0.1 mM EDTA, pH 8.0), un tampone standard contenente un agente chelante il magnesio, che è fondamentale per l'attività catalitica delle nucleasi.

Il DNA così ottenuto è stato quantificato sia attraverso la lettura spettrofotometrica in cuvette al quarzo che mediante la lettura allo spettrofotometro UV-visibile NanoDrop<sup>®</sup> (Thermo Scientific).

La concentrazione di DNA presente in ogni campione è stata determinata con una lunghezza d'onda di 260 nm, alla quale si ha il picco di assorbimento per le basi azotate del DNA.

Un'eccessiva contaminazione proteica è stata esclusa valutando che per ciascun campione estratto il rapporto dell'assorbanza a 260 nm con quella a 280 nm (picco di assorbimento per le proteine) fosse superiore a 1,8.

Un'ulteriore analisi del DNA estratto è stata effettuata tramite corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1.2% con 4,2  $\mu$ g/mL di bromuro d'etidio.

### **Analisi genetica dei polimorfismi del gene CaSR, collegati al fenotipo iperparatiroideo, nei 23 casi di NPHPT asintomatici individuati mediante sequenziamento Sanger tramite un processo di elettroforesi capillare completamente automatizzato**

Il sequenziamento è il metodo fondamentale per caratterizzare una macromolecola, sia che si tratti di determinare l'ordine degli aminoacidi di una proteina o la sequenza di basi di un acido nucleico.

Il metodo di sequenziamento del DNA con dideossinucleotermine o metodo

di Sanger consiste di 3 fasi: preparazione del campione; reazione di sequenziamento; elettroforesi.

Nella fase di preparazione del campione, il filamento di DNA che si vuole sequenziare viene copiato artificialmente, in modo da ottenere diverse copie identiche dello stesso. Sono due le tecniche che permettono questo processo di duplicazione: il DNA ricombinante e la reazione a catena della polimerasi (PCR, Polymerase Chain Reaction).

La PCR è una tecnica di biologia molecolare di fondamentale importanza, ideata nel 1983 da Kary Mullis (Nobel per la chimica nel 1993), che consente l'amplificazione *in vitro* di sequenze specifiche di DNA in quantità iniziali anche bassissime. Utilizzando una miscela di reazione contenente i quattro desossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), due primers ed una opportuna concentrazione di ioni magnesio, tramite ripetuti cicli termici, l'enzima Taq Polimerasi (DNA polimerasi termostabile estratta dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*) porta alla moltiplicazione della sequenza nucleotidica del template fiancheggiata dai primers. Ogni ciclo termico vede l'alternanza successiva di una temperatura cosiddetta "di melting", che consente la denaturazione dei filamenti complementari del dsDNA (double-strand DNA), una temperatura "di annealing", alla quale si ha l'appaiamento tra i primers e le sequenze complementari sul ssDNA (single-strand DNA) template, ed una temperatura "di estensione" ottimale per la reazione di polimerizzazione da parte della Taq polimerasi a partire dal 3'-OH dei primers. L'andamento temporale della PCR è costituito da una iniziale amplificazione di tipo esponenziale, che vede ad ogni ciclo termico il teorico raddoppiamento del numero di prodotti corti, seguita dall'instaurarsi di un andamento lineare nel momento in cui i reagenti iniziano a diventare fattori limitanti. La reazione termina in un plateau finale quando si ha l'esaurimento di uno o più reagenti. Il raggiungimento della fase plateau avviene a tempi diversi per i vari campioni amplificati, in relazione alla quantità iniziale di template. Tuttavia, la PCR classica, detta per questo motivo anche "end-

point”, permette la rilevazione del prodotto di amplificazione solamente alla fine del programma dei cicli termici, e ciò comporta un sostanziale appiattimento delle differenze tra le quantità iniziali dei campioni.

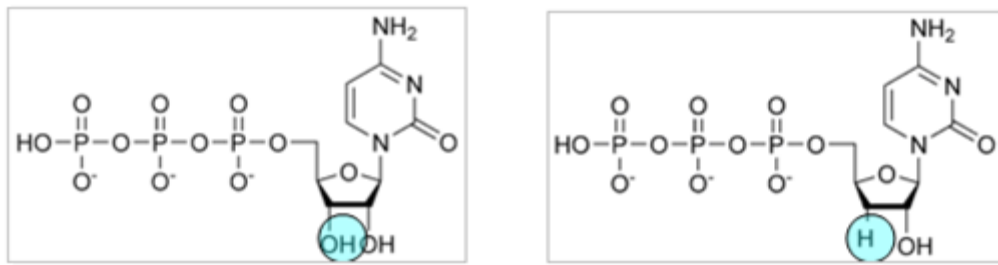
Durante la fase di reazione di sequenziamento, il campione di DNA viene sottoposto a quattro processi: denaturazione, primer annealing, copia del filamento, terminazione.

Con la denaturazione i singoli filamenti di DNA così separati sono posti in provetta.

Il primer annealing è la fase in cui viene aggiunto un primer all'estremità 3' di uno dei due filamenti. Il primer è sintetizzato artificialmente ed appositamente per la sequenza di DNA da sequenziare.

Se il sequenziamento è manuale, vengono allestite quattro miscele di reazione in quattro provette, una per ogni base. In ogni provetta viene aggiunta la DNA polimerasi (fase della copia del filamento), i quattro desossiribonucleotidi trifosfati (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in quantità equimolari, ed una piccola quantità di uno dei quattro possibili dideossiribonucleotidi trifosfati o dideossinucleotidi (ddATP, ddCTP, ddGTP o ddTTP) marcati radioattivamente.

Un dideossiribonucleotide trifosfato (ddNTP) è un nucleotide analogo al corrispondente desossiribonucleotide trifosfato (dNTP), che può essere aggiunto dalla DNA polimerasi ad un filamento di DNA in corso di sintesi, mediante la formazione di un legame fosfodiesterico tra il suo 5'-fosfato e il 3'-OH del residuo precedente, ma che, a causa della mancanza del gruppo -OH in posizione 3' dello zucchero, non permette il legame del nucleotide successivo (come avviene invece nella replicazione naturale del DNA), bloccando, in questo modo, la sintesi dei nuovi filamenti di DNA in tutte le possibili posizioni (fase di terminazione) e portando, di conseguenza, alla formazione di frammenti con nucleotidi terminali diversi (Fig. 22).



**Figura 22** – Rappresentazione di un desossiribonucleotide trifosfato (dNTP), a sinistra, e di un dideoxiribonucleotide trifosfato (ddNTP), a destra.

Al contrario, se il sequenziamento è automatico, non è necessario separare le quattro reazioni di terminazione in quattro provette differenti, ma si può allestire una singola reazione inserendo i quattro ddNTPs marcati mediante l'incorporazione di un composto fluorescente diverso per ogni base.

A differenza di quanto accade nella PCR, questa volta viene copiato solo il filamento specifico per il primer utilizzato, in direzione 5'-3'.

La replicazione del DNA procede e nella provetta si viene a trovare una miscela di filamenti stampo del DNA insieme ad una varietà di filamenti neosintetizzati più brevi. I filamenti nuovi, ognuno dei quali termina con un ddNTP, avranno lunghezze differenti.

Una volta terminata la replicazione del DNA, i filamenti neosintetizzati vengono denaturati e, tramite opportune tecniche di laboratorio, separati dai filamenti stampo.

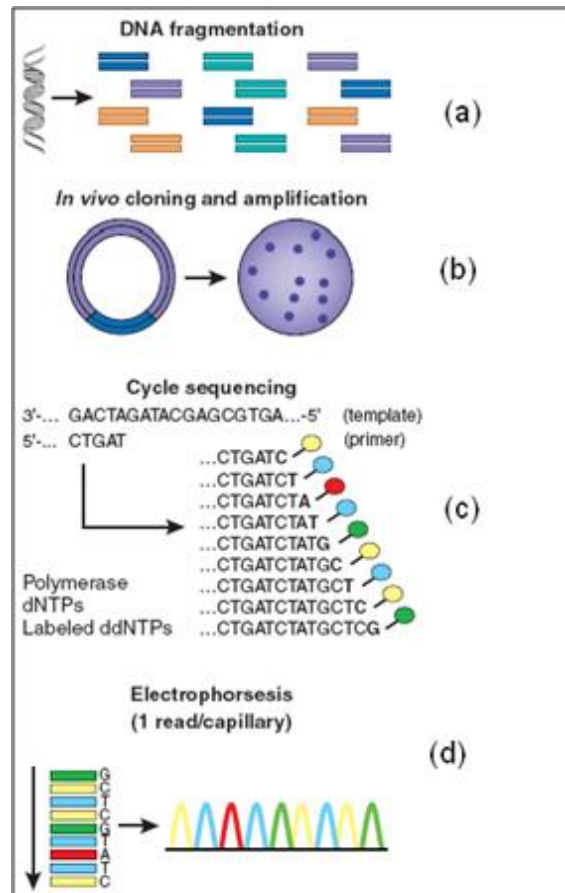
A questo punto, il preparato è pronto per la successiva fase di elettroforesi.

Nel sequenziamento manuale, le quattro miscele di frammenti di terminazione della catena, una per ogni analogo ddNTP marcato radioattivamente, vengono sottoposte ad elettroforesi su gel di poliacrilamide o gel di agarosio in differenti corsie. Durante la corsa elettroforetica, i frammenti più corti si muoveranno più agevolmente attraverso il gel rispetto ai frammenti più lunghi. Se il campo elettrico viene tolto prima che le molecole abbiano raggiunto il polo positivo

(anodo), si ha una separazione dei singoli componenti in base alla loro mobilità elettroforetica. La sequenza delle basi del DNA complementare a quella cercata viene letta dall' autoradiogramma delle quattro linee.

Nel sequenziamento automatico, invece, la singola reazione di terminazione, contenente una miscela di frammenti di terminazione della catena di lunghezze differenti e marcati con 4 fluorofori diversi, uno per ogni ddNTP, viene sottoposta ad elettroforesi lungo dei capillari in vetro-resina, all'interno dei quali è sempre ricostruita la rete di gel.

Durante la corsa elettroforetica, i frammenti vengono letti in ordine di lunghezza crescente da un fascio laser che eccita i marcatori fluorescenti. Quindi, l'intensità della luce emessa viene misurata e tale informazione (cioè quale colore di fluorescenza e dunque il tipo di ddNTP presente all'estremità di ogni filamento di differente lunghezza), viene inviata ad un computer (Fig. 23).



**Figura 23** – (a) estrazione del filamento di DNA da sequenziare; (b) preparazione del campione; (c) reazione di sequenziamento; (d) elettroforesi capillare (Applied Biosystems).

L'introduzione dell'elettroforesi capillare per la separazione dei frammenti marcati ha consentito un notevole aumento della processività. Sono stati, inoltre, sviluppati modelli di sequenziatori automatici che sono in grado di eseguire corse elettroforetiche multiple su apparecchi multicapillari.

La qualità e la quantità del DNA stampo, del primer, dei reagenti usati per la reazione di sequenziamento Sanger e la procedura di elettroforesi capillare sono fattori importanti che influiscono sulla qualità del segnale rilevato ed elaborato e, quindi, sull'accuratezza nella determinazione delle basi.

Per l'analisi genetica dei polimorfismi del gene CaSR, collegati al fenotipo iperparatiroideo, nei 23 casi di NPHPT asintomatici individuati è stato, pertanto,

effettuato il sequenziamento di tale gene con lo strumento Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer, collegato ad un PC (3130xl Data Collection Software, Applied Biosystems), mediante l'impiego di appositi kit contenenti Taq polimerasi, dNTPs ed i 4 ddNTPs marcati con fluorocromi diversi (BigDye® Direct Sequencing Master Mix, Applied Biosystems).

L'Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer è uno strumento per il sequenziamento del DNA che sfrutta il metodo di Sanger e che usa un sistema di elettroforesi a 16 capillari in vetro-resina, ognuno dei quali riempito col polimero di corsa POP-4 (costituisce la rete attraverso cui si muovono i frammenti) e lungo 36 cm, ed un sistema di rilevamento delle molecole di fluorescente contenute nei frammenti (UltraSeq36\_POP4).

La lunghezza del capillare (36 cm) non influisce sull'efficienza del processo di sequenziamento, ma gioca un ruolo importante sul tempo di migrazione e, pertanto, sulla durata dell'analisi.

Questo sequenziatore riesce a sequenziare circa 500 basi, utilizzando piastre con 96 pozzetti, permettendo, quindi, l'analisi di 96 campioni di DNA.

Per la fase di preparazione dei 23 campioni di DNA da sequenziare sono state condotte delle amplificazioni polimerasiche a catena utilizzando primers oligonucleotidici e condizioni specifiche per ciascun esone o porzione esonica del gene CaSR: esone 2, esone 3, esone 4a, esone 4b, esone 4c, esone 5, esone 6, esone 7a, esone 7b, esone 7c, esone 7d, esone 7e.

Ogni PCR è stata allestita in un volume finale di 25 µL, utilizzando 2 µL di DNA genomico estratto dai 23 casi di NPHPT asintomatici identificati, 2.5 µL di Buffer I con MgCl<sub>2</sub> 10x specifico per la AmpliTaq Gold® polimerasi (Applied Biosystems), 2.5 µL di dNTP mix a 2 mM da 1000 µL, 1 µL di primer forward specifico per la sequenza da amplificare da 50 µL (20 pmol/µL), 1 µL di primer reverse specifico per la stessa sequenza da amplificare da 50 µL (20 pmol/µL), 15.7 µL di H<sub>2</sub>O milli-Q sterile e 0.3 µL di AmpliTaq Gold® polimerasi a 5 U/µL (Applied Biosystems).

Le condizioni di amplificazione ottimale utilizzate per gli esoni 2-7 del gene CaSR sono le seguenti:

pre-ciclo	95°C per 12'	
denaturazione	95°C per 30''	} per 33 cicli
annealing	60°C per 30''	
estensione	72°C per 30''	
estensione finale	72°C per 7'	
∞	4°C oppure a 15°C overnight	

I prodotti di PCR sono stati poi separati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2% e visualizzati agli UV dopo colorazione con bromuro d'etidio.

Nella tabella 2 sono riportate le sequenze oligonucleotidiche utilizzate per le amplificazioni.



*Tabella 2*

<i>Esoni del gene CaSR</i>	<b>Primer forward</b>	<b>Primer reverse</b>
<b>Eson 2</b>	3'-CAATCTGTAGACATGTGTCCC-5'	5'-TGTGGGGGCAATAAGCTTCA-3'
<b>Eson 3</b>	3'-AAACCCAGCTTTGCCAGGTCT-5'	5'-TAAACCGTATGGCTATTGGGC-3'
<b>Eson 4a</b>	3'-GTTGATAAATGAGACCAAGGC-5'	5'-TCCTCATCAGAGTACTGGGA-3'
<b>Eson 4b</b>	3'-TGCAGCTGATGACGACTATG-5'	5'-CCTTGGCAAAACCATTTGTGG-3'
<b>Eson 4c</b>	3'-ATTGGATTTCGCTCTGAAGGCTG-5'	5'-TGGAGTTGCAGCCCAACTCT-3'
<b>Eson 5</b>	3'-GGCACAGCCTACCTAATTAGT-5'	5'-TTGGAAGTCCAGTGGGGAAA-3'
<b>Eson 6</b>	3'-AATGGGCCCAACGTCTGTCA-5'	5'-CCTTCATGGGCTTCACTGA-3'
<b>Eson 7a</b>	3'-TATGTAGTGACCACATCCA-5'	5'-TCACCAGGATGCATGAGATG-3'
<b>Eson 7b</b>	3'-TGTTCTTCATCGGGAGCCCA-5'	5'-CTTCATTGAAGTTCTCCGGCAGC-3'
<b>Eson 7c</b>	3'-CTTCCTGATCGGCTACACCTG-5'	5'-TCTTGCTGGGTTAGGGCCA-3'
<b>Eson 7d</b>	3'-CGAAGACCCATTCCCACAG-5'	5'-CGGTCAGATCTAAGTCCGTT-3'
<b>Eson 7e</b>	3'-CAGAAAAGCAGCGATACGCT-5'	5'-CTTCTCCTCAGAGGAAAGG-3'

Successivamente, i prodotti di PCR sono stati purificati con l'enzima ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Affymetrix), al fine di rimuovere i primers forward e reverse non incorporati ed i dNTP in eccesso.

In dettaglio, ogni purificazione enzimatica è stata allestita in un volume finale di 3.5 µL, utilizzando 2.5 µL di prodotto di PCR e 1 µL di enzima ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Affymetrix).

In seguito, la mix di reazione è stata prima incubata a 37°C per 15 minuti e poi ad 80°C per 15 minuti al fine di attivare l'enzima.

Per la fase di reazione di sequenziamento dei prodotti di PCR purificati così ottenuti sono state condotte delle amplificazioni polimerasiche a catena utilizzando un solo primer oligonucleotidico, forward o reverse, e condizioni specifiche per ciascun esone o porzione esonica del gene CaSR (esone 2, esone 3, esone 4a, esone 4b, esone 4c, esone 5, esone 6, esone 7a, esone 7b, esone 7c, esone 7d, esone 7e).

Ogni PCR è stata allestita in un volume finale di 10 µL, utilizzando 0.8 µL di

prodotto di PCR purificato, 1  $\mu\text{L}$  di BigDye<sup>®</sup> Sequencing Buffer 5x (Applied Biosystems), 0.3  $\mu\text{L}$  di primer forward o reverse da 50  $\mu\text{L}$  (20 pmol/ $\mu\text{L}$ ) specifico per il template (cfr. Tabella 2), 7.4  $\mu\text{L}$  di H<sub>2</sub>O milli-Q sterile e 0.5  $\mu\text{L}$  di BigDye<sup>®</sup> Direct Sequencing Master Mix (Applied Biosystems).

Il programma eseguito per la reazione di sequenziamento è illustrato nella tabella seguente:

<b>N° cicli</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Step</b>
1	96°C	1 min	denaturazione iniziale
25	96°C	10 s	denaturazione
	50°C	5 s	annealing
	60°C	1 min	estensione
$\infty$	4°C		

Terminata la reazione di sequenziamento, si è proceduto alla purificazione per eliminare i ddNTPs, marcati e non incorporati, e il primer, poiché questi potrebbero interferire con la corsa elettroforetica capillare.

La purificazione dei prodotti di sequenziamento così ottenuti è stata realizzata con metodo cromatografico, usando le colonnine DyeExe 2.0 SpinKit (Qiagen), seguendo le istruzioni del fornitore.

Prima di essere caricati nel sequenziatore, i frammenti purificati (1  $\mu\text{L}$  di campione in ogni pozzetto della piastra) sono stati miscelati con la formammide (10  $\mu\text{L}$  di formammide in ogni pozzetto della piastra) su una piastra da 96 pozzetti, denaturati per 3 minuti a 94°C e posti in ghiaccio per impedire il riappaiamento dei filamenti.

Precedentemente alla corsa elettroforetica, è stata eseguita una calibrazione spettrale dell'analizzatore con i 5 markers fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO.

La procedura di calibrazione crea una matrice che è usata per correggere la sovrapposizione degli spettri di emissione fluorescente dei coloranti.

In seguito, una volta applicata la differenza di potenziale (che varia tra 8.5 kV e 13.2 kV a seconda delle impostazioni del sequenziatore), inizia la corsa elettroforetica alla temperatura di 60°C.

La durata in media di una corsa elettroforetica è di 40-45 minuti.

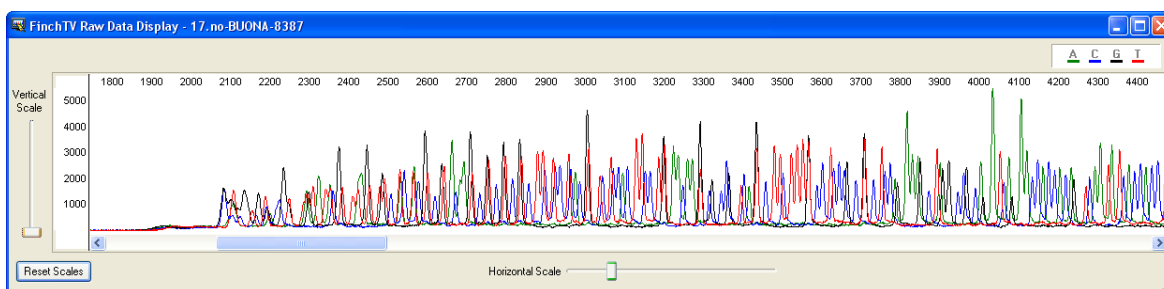
In ogni capillare, passando dalla finestra di rilevamento, i fluorocromi marcanti i frammenti di DNA di diversa lunghezza vengono colpiti da un raggio laser (emissione a 490 nm), si eccitano ed emettono luce.

Ciascuno dei quattro fluorocromi emette ad una lunghezza d'onda diversa.

Una cellula fotoelettrica rileva e memorizza sequenza, tipo ed intensità dei segnali fluorescenti (Raw Data).

Il Raw Data è la sequenza di dati grezzi raccolti durante l'emissione dei fluorescenti: è la combinazione dei segnali di fluorescenza associati ad ogni base azotata.

Il segnale associato ai nucleotidi contenenti Guanina (G) è di colore nero, per la Timina (T) è di colore rosso, per la Citosina (C) è di colore blu, per l'Adenina (A) è di colore verde (Fig. 24).



**Figura 24** – Esempio di Raw Data (Applied Biosystems).

Durante la corsa elettroforetica, i frammenti vengono letti in ordine di lunghezza crescente, per cui l'asse x del Raw Data rappresenta la lunghezza del filamento

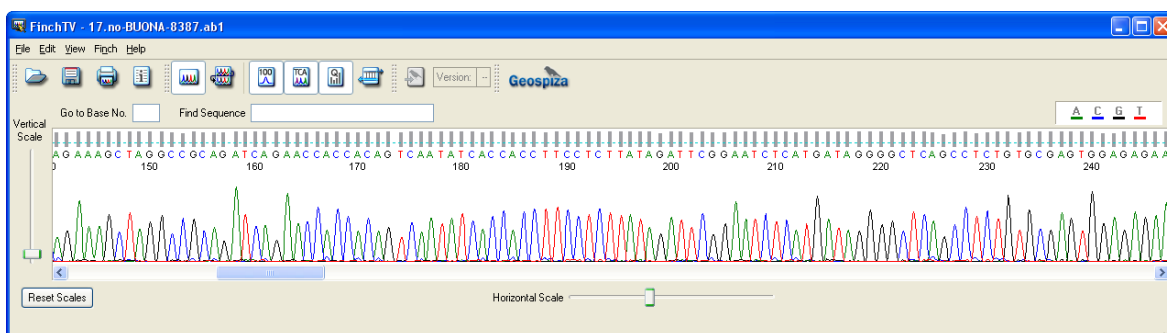
di DNA, mentre l'asse y rappresenta la scala d'intensità luminosa rilevata dalla fluorescenza dei marcatori.

Il 3130xl Data Collection Software legge ed interpreta i dati di fluorescenza (Raw Data), convertendoli in un sistema grafico, l'elettroferogramma (Analyzed Data), che riporta lo spettro di emissione dei vari fluorescenti in funzione del tempo.

L'elettroferogramma elaborato dal sequenziatore rappresenta la sequenza nucleotidica del DNA e si presenta sotto forma di una successione di picchi di colore diverso per ogni nucleotide (il colore del picco corrisponde al tipo di base azotata).

Dato che vengono identificati prima i nucleotidi terminali dei segmenti di DNA più corti, l'elettroferogramma rappresenta proprio la sequenza ordinata dei nucleotidi letti, detta read.

Durante questa procedura, chiamata basecalling, viene anche assegnato un punteggio ad ogni base identificata. Questi punteggi, definiti quality score, vengono determinati grazie ad un apposito algoritmo e sono legati alla probabilità di errore nella determinazione dell'identità delle basi a partire dal tracciato elettroforetico (Fig. 25).

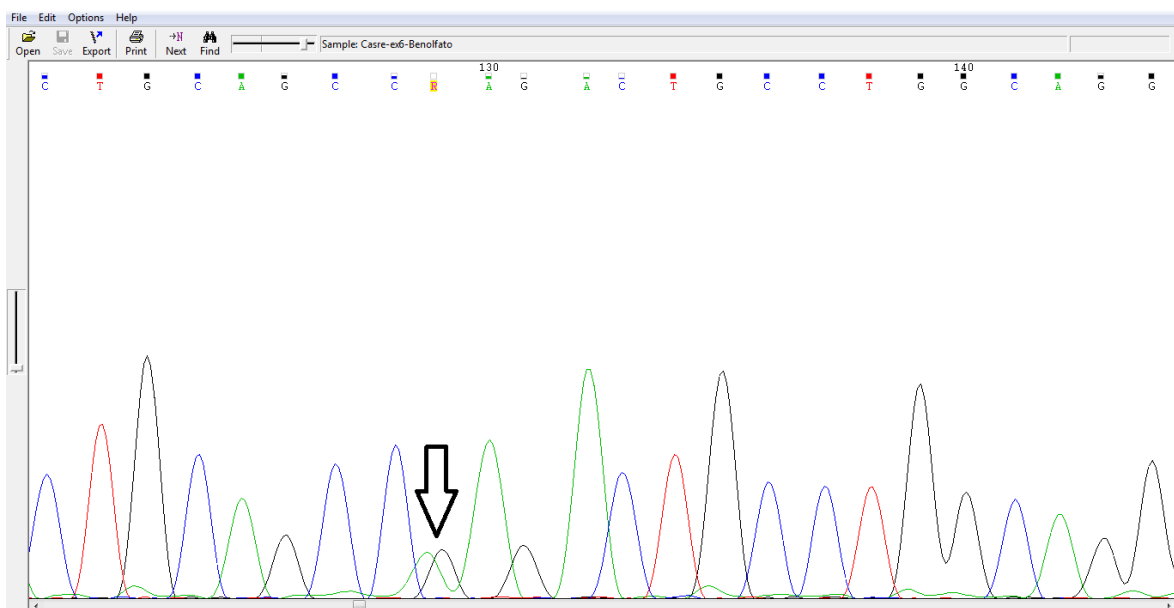


**Figura 25** – Elettroferogramma (Analyzed Data) associato al Raw Data di Fig. 24 (Applied Biosystems).

Una volta prodotte le reads, i risultati ottenuti sono analizzati mediante il programma Sequencher<sup>®</sup> 4.10.1 (Gene Code Corporation).

La ricerca dei polimorfismi, e di eventuali mutazioni, è stata effettuata analizzando le reads assemblate, relative ai diversi esoni sequenziati del gene CaSR, e confrontandole con la sequenza di riferimento per lo stesso esone, disponibile sui database in Internet.

Graficamente, la sostituzione di un aminoacido con un altro si presenta sotto forma di due picchi sovrapposti aventi intensità simile e, quindi, non confondibili con il rumore di fondo; anche i polimorfismi si presentano alla stessa maniera (Fig. 26).



**Figura 26** – Esempio di sostituzione aminoacidica (Applied Biosystems).

Le mutazioni frameshift sono, invece, riconoscibili per lo scorrimento della cornice di lettura.

## Analisi statistica

I dati sono riportati come medie  $\pm$  deviazione standard.

Il confronto tra le popolazioni prima e dopo la somministrazione di colecalciferolo al dosaggio di 50.000 UI settimanali per os per quattro settimane è stato effettuato utilizzando il two-tailed paired Student's t-test (o test t di Student), che permette di confrontare le medie di una variabile numerica di due campioni.

Nel test t di Student si considera il valore t calcolato mediante la seguente formula:

$$t = \frac{m_a - m_b}{s} = \sqrt{\frac{n_a \cdot n_b}{n_a + n_b}}$$

Differenza tra le due medie

Fattore di dimensione

Deviazione standard media

In particolare, al fine di stabilire se la differenza tra due medie è significativa, il valore t calcolato viene confrontato con quello critico tabulato a X gradi di libertà (numerosità primo campione – numerosità secondo campione – 2).

Se il valore t ottenuto supera il valore critico allora si può rifiutare l'ipotesi nulla, che sostiene che non c'è differenza significativa tra le due medie.

La significatività statistica è stata posta per un valore di  $p < 0.05$ .

La normalità delle covariate continue è stata valutata visivamente; per le variabili con distribuzione fortemente asimmetrica, i valori trasformati in log sono stati considerati se hanno portato a distribuzioni normali più simmetriche. Le singole variabili quantitative sono state esaminate adoperando i boxplot.

Pazienti che mostrano valori al di fuori dell'intervallo  $Q1 - 2 * IQR$ ;  $Q3 + 2 * IQR$  ( $Q1$  = primo quartile,  $Q3$  = terzo quartile,  $IQR$  = differenza interquartile), per ognuna delle variabili considerate, sono stati ulteriormente controllati per i valori anomali. Dove possibile, i valori anomali sono stati sostituiti con valori corretti, altrimenti sono stati eliminati dallo studio.

Le correlazioni tra le variabili sono state analizzate con il test di correlazione per ranghi di Spearman.

Come strumento preliminare di estrazione dei dati, è stato utilizzato un approccio ad albero di regressione per valutare l'insieme delle variabili rilevanti per la determinazione dei livelli di PTH. Gli alberi di regressione sono una potente tecnica di estrazione dei dati che utilizza un approccio ponderato clusterizzato per la costruzione di un modello che mira alla previsione del valore di una variabile di risposta quantitativa (target) in funzione di un insieme di variabili quantitative o qualitative indipendenti (input). Operano dividendo lo spazio variabile in regioni disgiunte che sono caratterizzate per minimizzare la varianza all'interno del gruppo della variabile di risposta quantitativa (target). La divisione si ottiene selezionando ad ogni iterazione la variabile che raggiunge la maggiore diminuzione all'interno della varianza. La crescita dell'albero di regressione si ferma quando la diminuzione all'interno della varianza diventa trascurabile o quando gli elementi in un nodo scendono al di sotto di una soglia predefinita. Gli alberi di regressione sono tecniche non parametriche che impongono assunzioni minime sui dati, possono gestire valori anomali e mancanti, e sono pertanto efficaci per set di dati di grandi dimensioni con diverse variabili quantitative o qualitative indipendenti (input). Sono anche i più efficaci per la selezione delle funzioni quando ci sono un gran numero di variabili, i cui sottoinsiemi possono essere più influenti nel determinare quale variabile di risposta quantitativa (target) deve essere scelta.

Dopo la selezione delle covariate più influenti tramite l'albero di regressione, la relazione tra log-PTH ed età,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , 25(OH)D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D, BMI e sesso è

stata valutata numericamente adoperando un modello lineare considerando l'effetto di interazione di tutte le covariate con il sesso:

$$\text{Log PTH} \sim (\text{età} + \text{Mg}^{2+} + \text{Ca}^{2+} + 25(\text{OH})\text{D} + 1,25(\text{OH})_2\text{D} + \text{BMI}) * \text{sesso}$$

Per selezionare il modello migliore tra una classe di modelli parametrici con un diverso numero di parametri è stata utilizzata una procedura graduale impiegando il Criterio Di Informazione Bayesiano (BIC).

La rilevanza dell'effetto di ciascuna covariata rimanente su log-PTH è stata valutata utilizzando l'errore Anova Tipo III.

I risultati sono stati considerati statisticamente significativi quando è stata ottenuta una probabilità  $< 0.05$ .

Le elaborazioni statistiche sono state condotte con il pacchetto statistico R v. 3.0.2.



## **RISULTATI**

### **Descrizione della popolazione selezionata per lo studio della prevalenza del NPHPT in Italia**

Nel periodo compreso tra marzo 2014 e luglio 2015, è stata reclutata una popolazione di 2355 donatori volontari di sangue (1731 uomini e 624 donne), di età compresa tra i 18 ed i 68 anni (età media  $40,5 \pm 12,05$ ), proveniente dal Centro trasfusionale “Ad Spem” del Policlinico Umberto I di Roma (*Ferrone F et al., 2019*).

Ad eccezione del  $\text{Ca}^{2+}$  e del  $\text{Mg}^{2+}$ , che devono essere dosati il giorno del prelievo (entro 2 ore dalla raccolta, mentre la temperatura ambiente è stata mantenuta a  $4^{\circ}\text{C}$ ), in 2355 individui sono stati determinati i valori ematici di PTH, 25(OH)D e  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ .

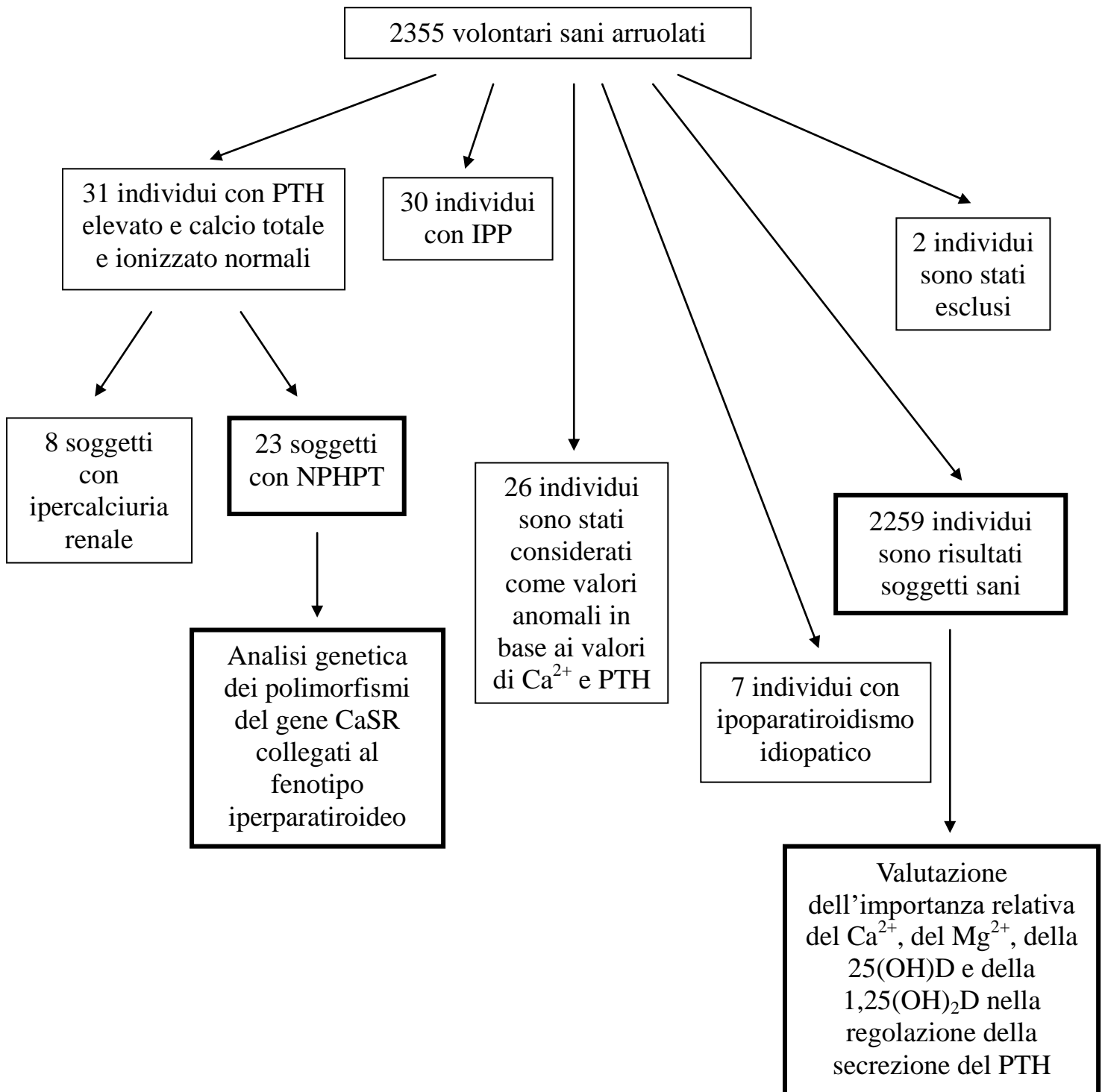
In seguito, la popolazione presa in esame è stata approfonditamente analizzata (visita ambulatoriale, raccolta dell’anamnesi, determinazione di creatinina, proteine, alanina aminotransferasi, colesterolo, trigliceridi, ferro, ferritina glucosio, dosaggio degli anticorpi IgA anti-transglutaminasi, densitometria minerale ossea a livello lombare, femorale e radiale), e trattata, in caso di carenza di vitamina D [ $25(\text{OH})\text{D} < 30 \text{ ng/mL}$ ], con colecalciferolo al dosaggio di 50.000 UI settimanali per os per quattro settimane.

Sulla base della concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  e dalla valutazione biochimica del PTH, della 25(OH)D e della  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , sono stati distinti 4 gruppi di donatori: 31 soggetti sono risultati NPHPT asintomatici (8 dei quali con ipercalciuria renale), con livelli di PTH al di sopra dei valori normali non attribuibili ad alcuna causa secondaria; 30 soggetti si sono rivelati IPP; 26 soggetti sono stati considerati come valori anomali in base ai valori di  $\text{Ca}^{2+}$  e PTH (vedi sezione analisi statistica); 7 soggetti sono risultati affetti da ipoparatiroidismo idiopatico; 2259 sono risultati soggetti sani.

Solamente 2 soggetti sono stati esclusi dallo studio per problemi tecnici (cioè, campioni di sangue inadeguati, problemi di conservazione).

I 2259 individui nella nostra analisi includono 1652 uomini e 607 donne di età compresa tra i 18 ed i 68 anni (età media  $40,3 \pm 11,85$ ).

Lo schema seguente riassume il percorso diagnostico effettuato con il raggiungimento della diagnosi di NPHPT in 23 soggetti, esclusi gli 8 con ipercalciuria renale (1,31% dei soggetti totali presi in esame).



## Screening dei polimorfismi del gene CaSR nei 23 pazienti NPHPT

Il DNA dei 23 individui volontari sani (i quali mostrano valori di PTH al di sopra dei livelli normali, in assenza di ipercalcemia e dopo supplementazione con colecalciferolo, e che, pertanto, sono stati individuati come iperparatiroidi normocalcemici), è stato sottoposto ad un'analisi di associazione genetica con i polimorfismi del gene CaSR, collegati al fenotipo iperparatiroideo e selezionati dalla banca dati NCBI (National Center for Biotechnology Information).

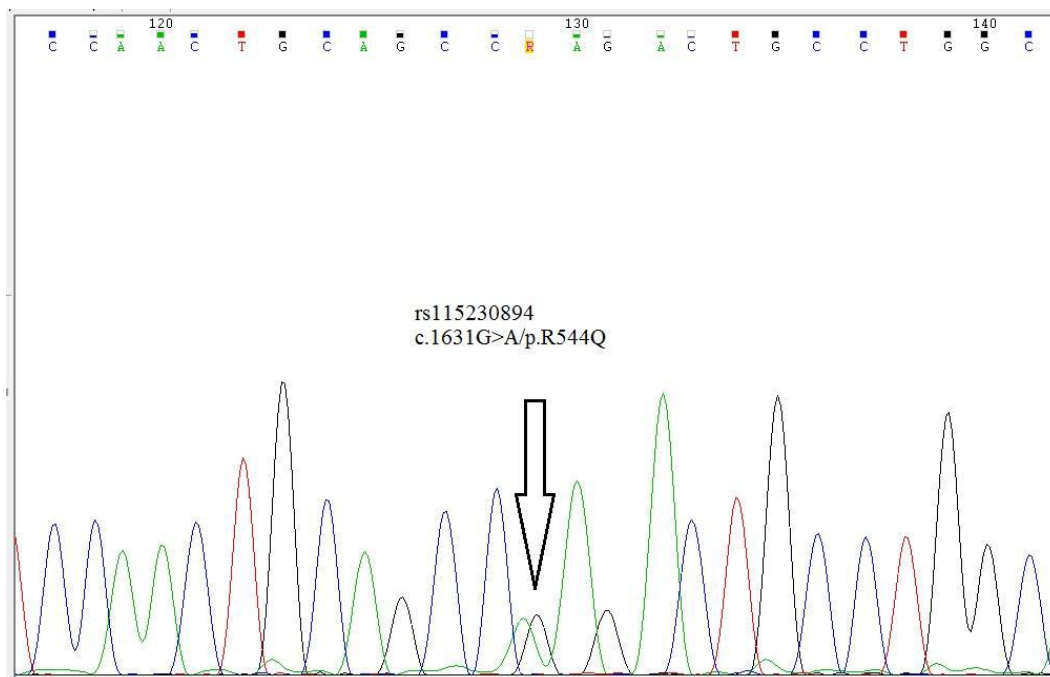
La tipizzazione genotipica degli SNPs è stata realizzata mediante sequenziamento Sanger con primers sequenza-specifica per gli esoni 2-7, che codificano per la proteina CaSR.

Dalla valutazione genetica del gene CaSR in questi soggetti NPHPT sono emersi i seguenti risultati illustrati nella tabella sottostante:

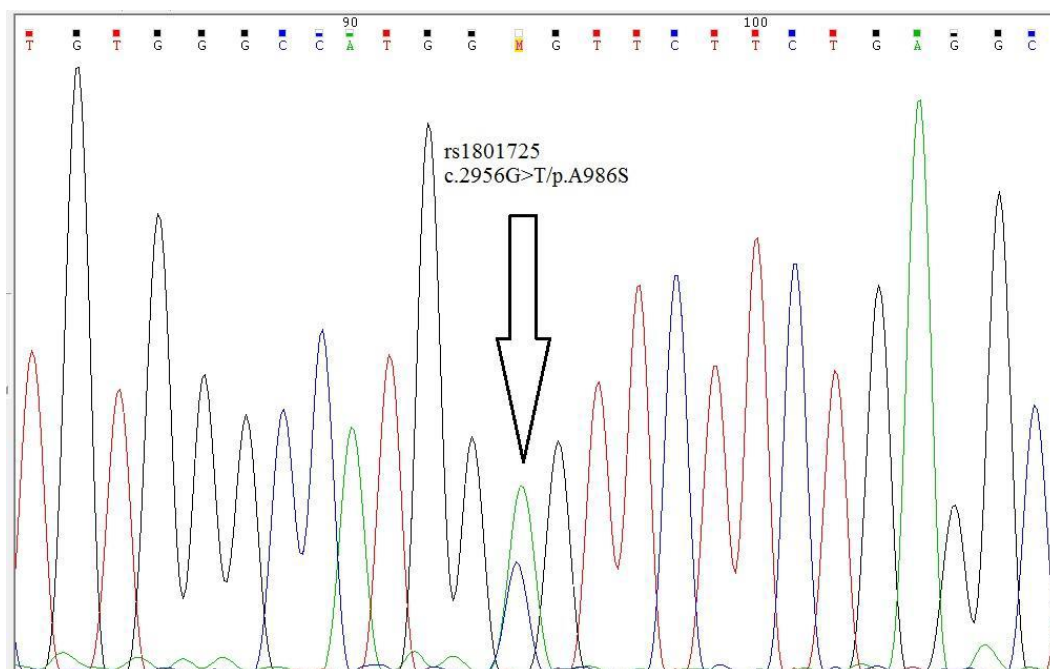
Numero pazienti aventi lo stesso SNP	Tipo di SNP identificato nell'esone o nella porzione esonica del gene CaSR	Frequenza allelica nella popolazione europea in 1000 Genomi	Frequenza genotipica nella popolazione europea in 1000 Genomi	Significato clinico (predisposizione)
17 individui sono omozigoti per lo stesso SNP  2 individui sono eterozigoti per lo stesso SNP	<b>rs9869985</b> <b>IVS3+19G&gt;A</b> (variante intronica)	<b>G</b> : 0.037 (37) <b>A</b> : 0.963 (969)	<b>G G</b> : 0.002 (1) <b>A G</b> : 0.070 (35) <b>A A</b> : 0.928 (467)	Ipercalcemia ipocalciurica familiare (FHH) (autosomica dominante)

1 individuo è omozigote	<b>rs12493789</b> <b>c.1333A&gt;G/p.T445A</b> (variante missenso)	<b>A:</b> 1.000 (1000) <b>G:</b> 0.000 (0)		Ipercalcemia ipocalciurica familiare (FHH) (autosomica dominante) Persistente ipocalcemia Ipoparatiroidismo familiare isolato Ipercalcemia ipocalciurica familiare di tipo 1 (FHH di tipo 1) (autosomica dominante) Iperparatiroidismo primitivo grave neonatale (NSHPT) (autosomica recessiva)
2 individui sono eterozigoti per lo stesso SNP	<b>rs2279802</b> <b>IVS5+52G&gt;A</b> (variante intronica)	<b>G:</b> 0.921 (927) <b>A:</b> 0.079 (79)	<b>G G:</b> 0.847 (426) <b>A G:</b> 0.149 (75) <b>A A:</b> 0.004 (2)	Ipercalcemia ipocalciurica familiare di tipo 1 (FHH di tipo 1) (autosomica dominante) Iperparatiroidismo primitivo grave neonatale (NSHPT) (autosomica recessiva)
3 individui sono eterozigoti per lo stesso SNP	<b>rs2270916</b> <b>IVS6+16T&gt;C</b> (variante intronica)	<b>T:</b> 0.860 (865) <b>C:</b> 0.140 (141)	<b>T T:</b> 0.732 (368) <b>C T:</b> 0.256 (129) <b>C C:</b> 0.012 (6)	
1 individuo è eterozigote	<b>rs115230894</b> <b>c.1631G&gt;A/p.R544Q</b> (variante missenso) (Fig. 27)	<b>G:</b> 0.999 (1005) <b>A:</b> 0.001 (1)	<b>G G:</b> 0.998 (502) <b>A G:</b> 0.002 (1)	Ipocalcemia autosomica dominante (ADH) e persistente ipocalcemia Ipercalcemia ipocalciurica familiare di tipo 1 (FHH di tipo 1) (autosomica dominante) Ipoparatiroidismo familiare isolato Iperparatiroidismo primitivo grave neonatale (NSHPT) (autosomica recessiva)

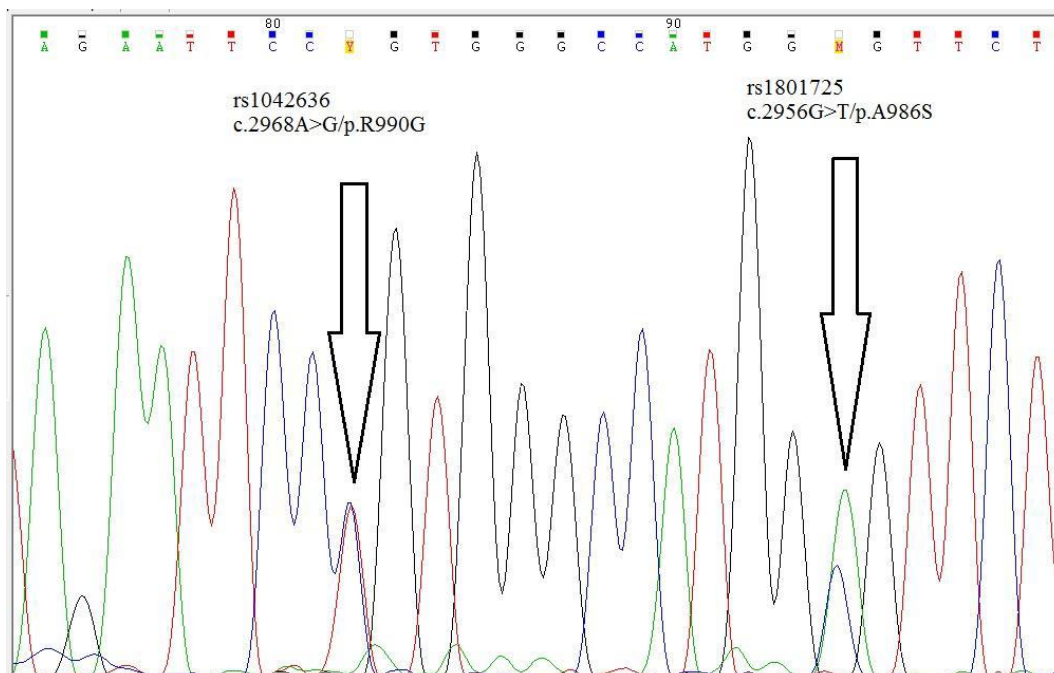
8 individui sono eterozigoti per lo stesso SNP	<b>rs1801725</b> <b>c.2956G&gt;T/p.A986S</b> (variante missenso) (Fig. 28-29)	<b>G</b> : 0.855 (860) <b>T</b> : 0.145 (146)	<b>G G</b> : 0.724 (364) <b>G T</b> : 0.262 (132) <b>T T</b> : 0.014 (7)	Elevati livelli di PTH intatto statisticamente significativi Calcolosi renale (KSD) Elevati livelli di calcio sierico accoppiati ad elevata secrezione di calcio nelle urine Sviluppo di neoplasia delle paratiroidi nel sesso maschile
3 individui sono eterozigoti per lo stesso SNP	<b>rs1042636</b> <b>c.2968A&gt;G/p.R990G</b> (variante missenso) (Fig.29)	<b>A</b> : 0.926 (932) <b>G</b> : 0.074 (74)	<b>A A</b> : 0.857 (431) <b>A G</b> : 0.139 (70) <b>G G</b> : 0.004 (2)	Ipercalciuria in pazienti con o senza calcolosi renale (KSD)
1 individuo è eterozigote	<b>rs4677984</b> <b>c.3234+63G&gt;A</b> (variante intronica)	<b>C</b> : 0.914 (919) <b>T</b> : 0.086 (87)	<b>C C</b> : 0.839 (422) <b>C T</b> : 0.149 (75) <b>T T</b> : 0.012 (6)	
1 individuo con nessun polimorfismo rilevato				



**Figura 27** – Tipizzazione genotipica dello SNP rs115230894 mediante sequenziamento Sanger con primer forward sequenza-specifica per l'esone 6.



**Figura 28** – Tipizzazione genotipica dello SNP rs1801725 mediante sequenziamento Sanger con primer reverse sequenza-specifica per l'esone 7d.



**Figura 29** – Tipizzazione genotipica degli SNPs rs1042636 e rs1801725 mediante sequenziamento Sanger con primer reverse sequenza-specifica per l'esone 7d.

Per quanto riguarda gli SNPs rs9869985, rs12493789 e rs2279802 del gene CaSR, individuati in alcuni dei 23 soggetti NPHPT analizzati, non ci sono studi tali da confermare l'esistenza di una correlazione genotipo-fenotipo tra questi polimorfismi e le patologie FHH di tipo 1, NSHPT ed ipoparatiroidismo familiare isolato.

Un solo individuo NPHPT non presenta alcun polimorfismo o mutazione sul gene CaSR.

Le frequenze alleliche e genotipiche degli SNPs del gene CaSR sono state ottenute dal database Ensembl Genome Browser.

## **Influenza relativa del $\text{Ca}^{2+}$ sierico e della 25(OH)D nella regolazione della secrezione di PTH nei 2259 soggetti sani individuati**

La tabella 3 mostra i principali parametri antropometrici e biochimici dei 2259 soggetti sani. Le tabelle 4 e 5 riprendono gli stessi parametri antropometrici e biochimici rispettivamente negli uomini e nelle donne.

<b>Variabile</b>	<b>Media</b>	<b>Deviazione standard</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Intervallo di normalità</b>
<b>Età (anni)</b>	40.3	11.85	18	68	-
<b>Peso (Kg)</b>	76.1	13.3	45	135	-
<b>Altezza (m)</b>	1.75	0.08	1.5	2.05	-
<b>BMI (<math>\text{Kg}/\text{m}^2</math>)</b>	24.9	3.4	14.6	46.5	18.5-25
<b><math>\text{Ca}^{2+}</math> (mmol/L)</b>	1.29	0.04	1.14	1.37	1.17-1.33
<b><math>\text{Mg}^{2+}</math> (mmol/L)</b>	0.53	0.05	0.33	1.56	0.45-0.6
<b>PTH (pg/mL)</b>	23.7	8.6	6.3	63.1	6.5-36.6
<b>25(OH)D (ng/mL)</b>	20.2	8.9	4	89.60	> 30
<b>1,25(OH)<sub>2</sub>D (pg/mL)</b>	50.7	13.3	5.7	109	19.9-79.3

*Tabella 3 – Parametri antropometrici e biochimici della popolazione in studio (n = 2259) (Ferrone F et al., 2019).*



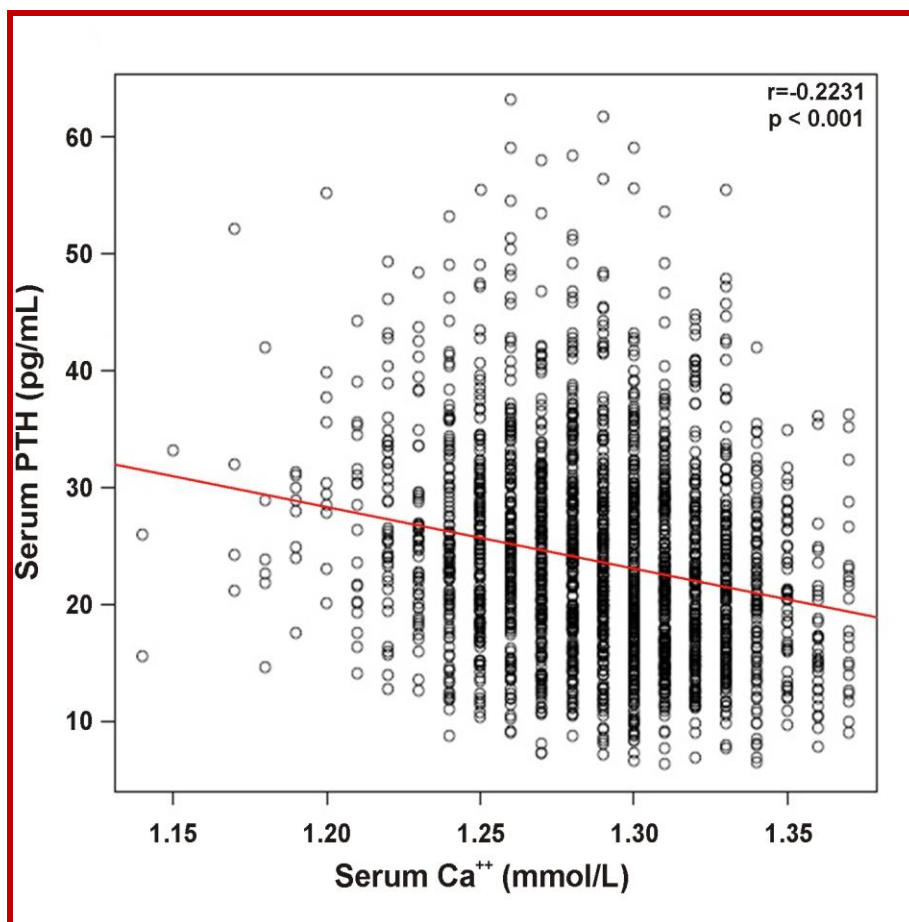
<b>Variabile</b>	<b>Media</b>	<b>Deviazione standard</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Intervallo di normalità</b>
<b>Età (anni)</b>	40.3	11.9	18	68	-
<b>Peso (Kg)</b>	76.1	13.3	50	135	-
<b>Altezza (m)</b>	1.75	0.08	1.58	2.05	-
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	24.9	3.4	14.6	41.2	18.5-25
<b>Ca<sup>2+</sup> (mmol/L)</b>	1.29	0.04	1.14	1.37	1.17-1.33
<b>Mg<sup>2+</sup> (mmol/L)</b>	0.53	0.05	0.33	1.56	0.45-0.6
<b>PTH (pg/mL)</b>	23.6	8.6	6.4	63.1	6.5-36.6
<b>25(OH)D (ng/mL)</b>	20.2	8.9	4	68.2	> 30
<b>1,25(OH)<sub>2</sub>D (pg/mL)</b>	50.7	13.3	5.7	98.5	19.9-79.3

*Tabella 4 – Parametri antropometrici e biochimici nei soggetti di sesso maschile (n = 1652)  
(Ferrone F et al., 2019).*

<b>Variabile</b>	<b>Media</b>	<b>Deviazione standard</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Intervallo di normalità</b>
<b>Età (anni)</b>	40.3	11.85	18	64	-
<b>Peso (Kg)</b>	76.1	13.3	45	116	-
<b>Altezza (m)</b>	1.75	0.08	1.46	1.86	-
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	24.9	3.4	17.4	46.5	18.5-25
<b>Ca<sup>2+</sup> (mmol/L)</b>	1.29	0.04	1.18	1.37	1.17-1.33
<b>Mg<sup>2+</sup> (mmol/L)</b>	0.53	0.05	0.40	0.68	0.45-0.6
<b>PTH (pg/mL)</b>	23.7	8.6	6.3	53.6	6.5-36.6
<b>25(OH)D (ng/mL)</b>	20.2	8.9	4	89.6	> 30
<b>1,25(OH)<sub>2</sub>D (pg/mL)</b>	50.7	13.3	8.9	109	19.9-79.3

*Tabella 5 – Parametri antropometrici e biochimici in soggetti di sesso femminile (n = 607) (Ferrone F et al., 2019).*

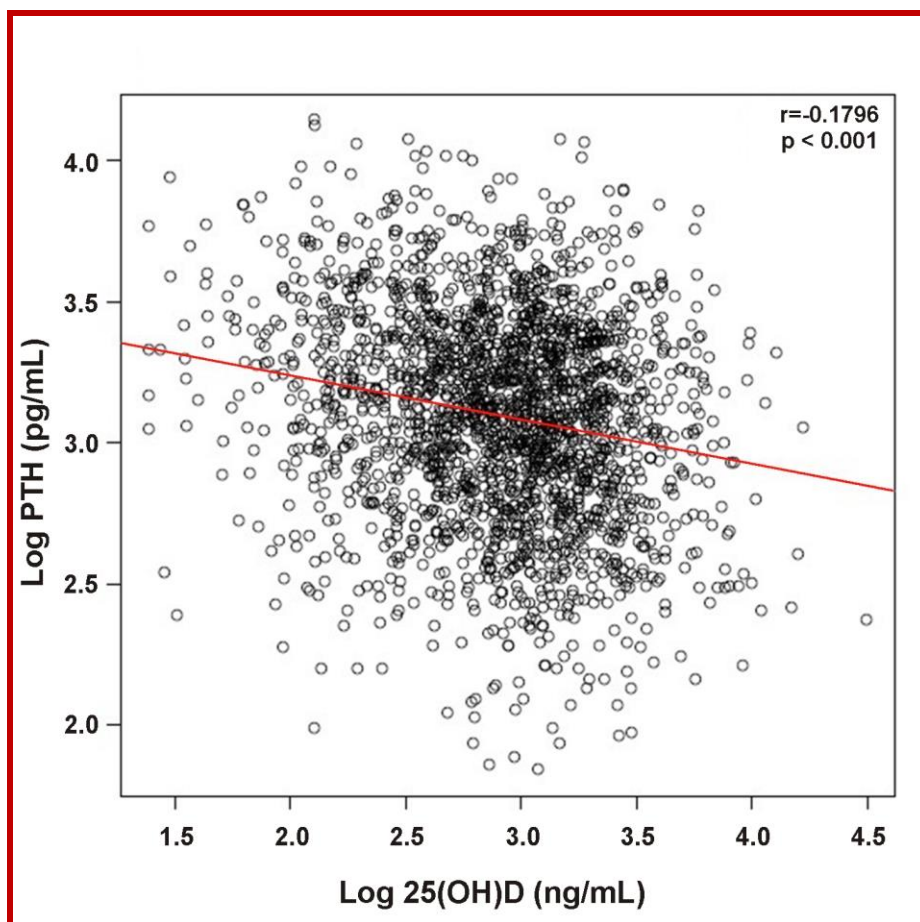
Per la popolazione in esame è stata osservata una correlazione inversa significativa tra i valori sierici di Ca<sup>2+</sup> e PTH (r = -0.2231; p < 0.001) (Fig. 30).



**Figura 30** – Correlazione inversa tra l'ormone paratiroideo (PTH) sierico e i valori di calcio ionizzato ( $Ca^{2+}$ ), nella popolazione nel suo complesso (2259 soggetti) (Ferrone F et al., 2019).

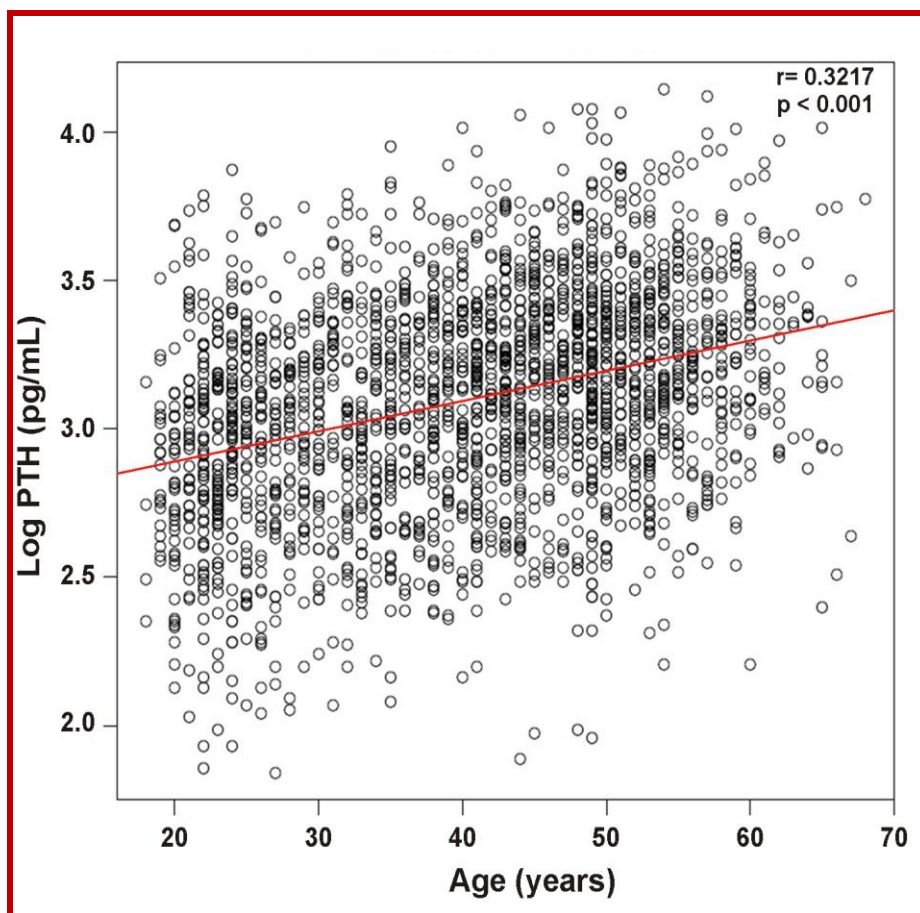
Questa correlazione è risultata essere leggermente più forte per gli uomini ( $r = -0.231$ ) rispetto alle donne ( $r = -0.186$ ), sebbene la differenza non sia statisticamente significativa ( $p = 0.323$ ).

Una correlazione negativa è stata trovata anche tra i valori sierici di 25(OH)D e PTH ( $r = -0.1796$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 31) con diversi, anche se non significativi, valori per il sesso ( $r = -0.161$  per gli uomini vs  $r = -0.232$  per donne;  $p = 0.121$ ).



**Figura 31** – Correlazione inversa tra l'ormone paratiroideo (PTH) e i valori sierici di 25(OH)D, nella popolazione nel suo complesso (2259 soggetti) (Ferrone F et al., 2019).

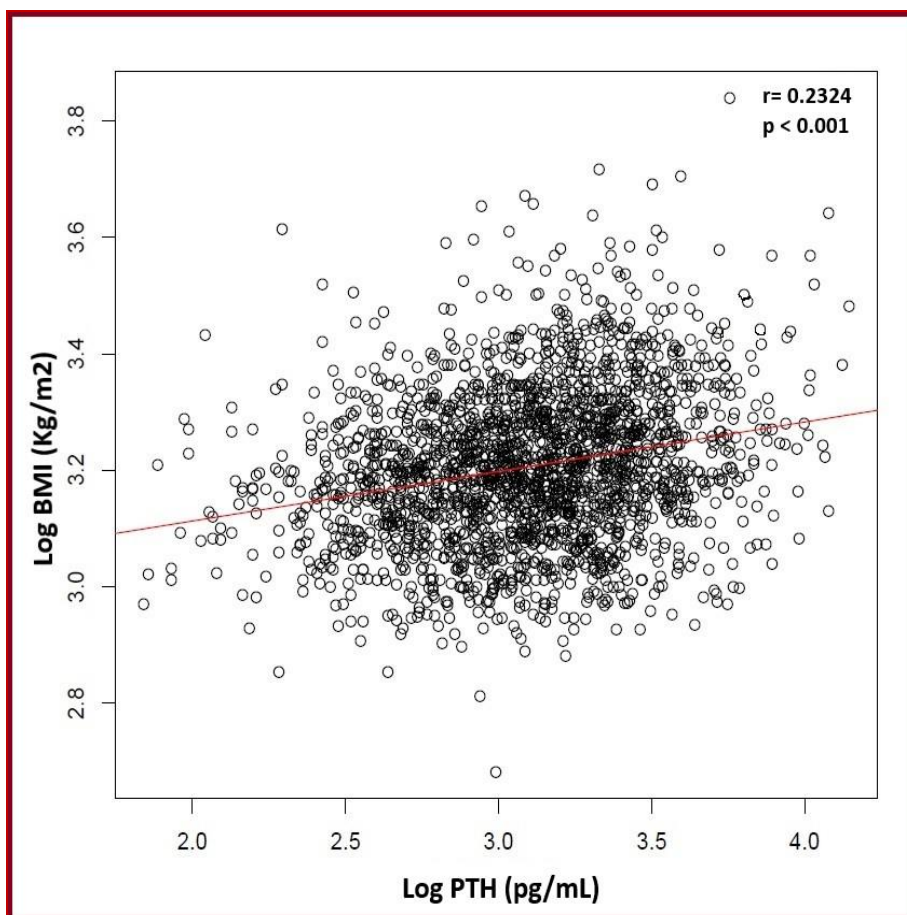
Una significativa correlazione diretta tra i valori sierici di PTH e l'età ( $r = 0.3217$ ;  $p < 0.001$ ) è stata riscontrata con misure, per uomini ( $r = 0.349$ ) e per donne ( $r = 0.225$ ), che sono significativamente differenti ( $p = 0.0044$ ) (Fig. 32).



**Figura 32** – Correlazione diretta tra l'ormone paratiroideo (PTH) e l'età, nella popolazione nel suo insieme (2259 soggetti) (Ferrone F et al., 2019).

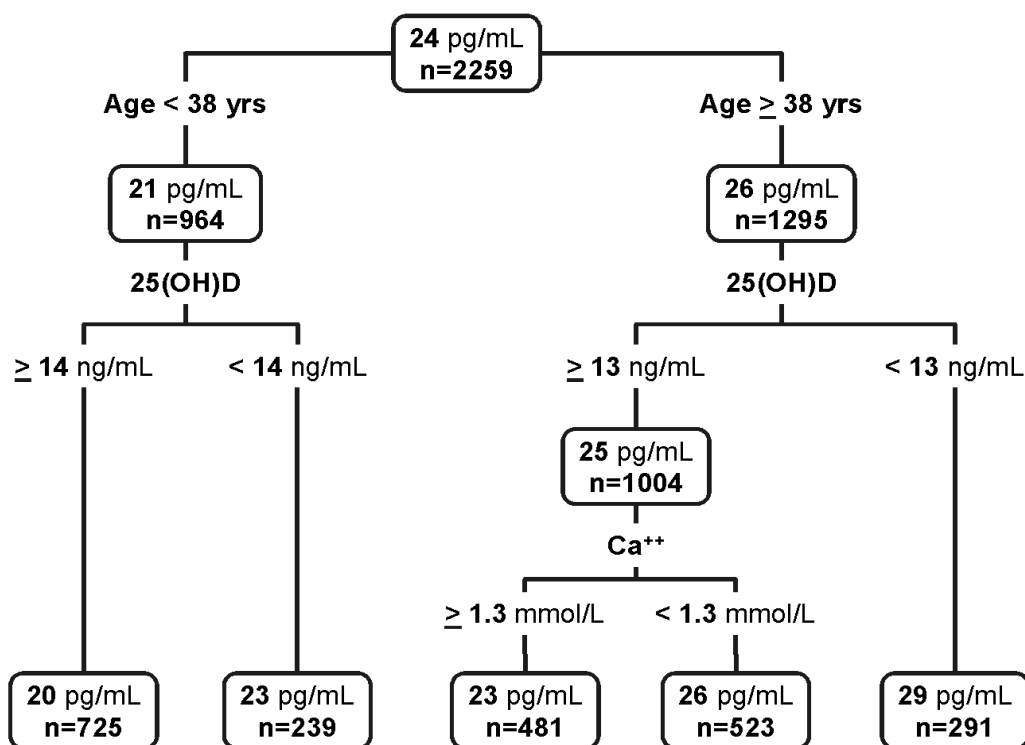
Una significativa correlazione diretta è stata rilevata anche tra i valori sierici di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  e PTH ( $r = 0.055$ ;  $p = 0.0089$ ) sebbene sia significativa solo per i maschi ( $r = 0.082$ ,  $p < 0.001$ ).

È stata osservata una correlazione positiva significativa tra i valori sierici di  $\text{Mg}^{2+}$  e PTH ( $r = 0.0469$ ;  $p = 0.026$ ) che è andata persa all'interno degli uomini e delle donne, rispettivamente, suggerendo la presenza di correlazioni spurie. Infine, è stata trovata una correlazione positiva tra BMI e i valori sierici di PTH ( $r = 0.2324$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 33) con una leggera differenza tra uomini ( $r = 0.208$ ) e donne ( $r = 0.219$ ).



**Figura 33** – Correlazione diretta tra indice di massa corporea (BMI) ed ormone paratiroideo (PTH), nella popolazione nel suo insieme (2259 soggetti) (Ferrone F et al., 2019).

Come passo preliminare per l'analisi multivariata, è stata effettuata un'analisi dell'albero di regressione utilizzando il PTH come variabile di risposta (target) ed età,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , 25(OH)D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D e sesso come variabili esplicative indipendenti (input) per determinare l'effetto di ogni covariata sulla variabile di risposta (target). Poiché gli alberi di regressione sono tecniche non parametriche, non è stata necessaria alcuna trasformazione logaritmica per i valori di PTH. In base ai risultati ottenuti, vi è una differenza nell'effetto delle covariate a livello del PTH per i pazienti al di sotto od al di sopra dei 38 anni di età; ciò è stato confermato dalla semplice analisi di regressione illustrata in Figura 34.



**Figura 34** – Albero di regressione montato sui dati, costruito attraverso un processo di partizionamento ricorsivo binario, ovvero un processo iterativo di suddivisione dei dati in partizioni, che poi vengono suddivisi ulteriormente su ciascuno dei rami, fino a raggiungere i nodi terminali (Ferrone F et al., 2019).

Per i pazienti più giovani, i valori di 25(OH)D sono il parametro più importante nella regolazione dei livelli di PTH; infatti, i soggetti con valori di 25(OH)D inferiori a 14 ng/mL hanno un livello medio di PTH pari a 23 pg/mL, mentre i soggetti con valori di 25(OH)D uguali o superiori a 14 ng/mL possiedono un livello medio di PTH uguale a 20 pg/mL. Per i pazienti di età pari o superiore a 38 anni, entrambi i valori di 25(OH)D e  $\text{Ca}^{2+}$  risultano essere efficaci nel regolare la secrezione di PTH. Tuttavia, i livelli di 25(OH)D mostrano di avere l'effetto più forte in quanto i pazienti con valori di 25(OH)D inferiori a 13 ng/mL presentano un livello medio di PTH pari a 29 pg/mL, mentre gli altri pazienti esibiscono un valore medio di PTH uguale a 25 pg/mL. Quest'ultimo

gruppo può essere ulteriormente suddiviso considerando i livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  che sono efficaci nello spiegare le variazioni del PTH solo in questo sottogruppo di pazienti. Infatti, i pazienti con valori di  $\text{Ca}^{2+}$  uguali o superiori a 1,30 mmol/L hanno un livello medio-basso di PTH (23 pg/mL) rispetto a quelli con livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  inferiori a 1,30 mmol/L (valore medio di PTH di 26 pg/mL).

Per descrivere l'effetto di ciascuna covariata sui livelli di PTH, è stata realizzata un'analisi multivariata tramite un modello lineare per valutare quantitativamente i parametri più importanti che influenzano i livelli sierici di PTH; i risultati sono riportati nella Tabella 6.

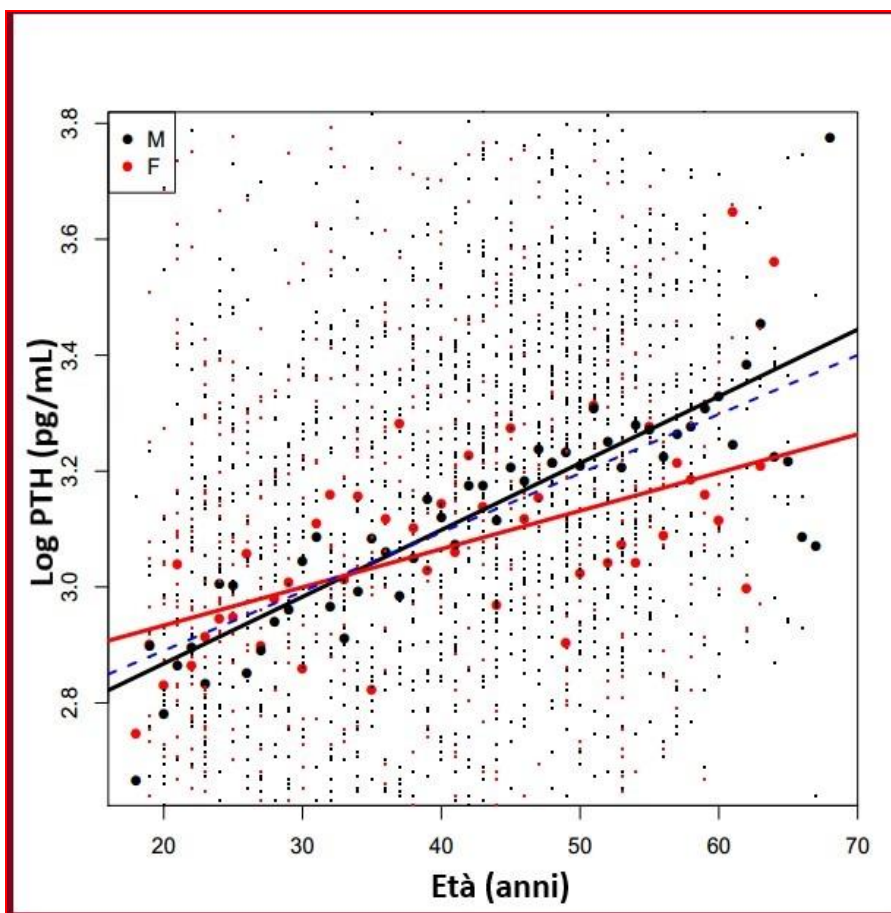
<b>Variabile</b>	<b>Stima</b>	<b>p-value</b>
<b>Intercetta</b>	4.43583	< 0.001
<b>Età (anni)</b>	0.00505	< 0.001
<b><math>\text{Ca}^{2+}</math> sierico (mmol/L)</b>	-1.49130	< 0.001
<b>25(OH)D sierica (ng/mL)</b>	-0.00795	< 0.001
<b>1,25(OH)<sub>2</sub>D sierica (pg/mL)</b>	0.00310	< 0.001
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	0.01482	< 0.001
<b>Sesso = M</b>	-0.17463	< 0.001
<b>Età * sesso = M</b>	0.00465	< 0.001

**Tabella 6** – Stima del parametro per il modello multivariato dopo la selezione graduale utilizzando il Criterio Di Informazione Bayesiano (Ferrone F et al., 2019).

Dopo la selezione graduale, tutte le variabili mantenute nel modello hanno avuto un effetto significativo ( $p < 0.001$ ) sul valore del PTH trasformato in logaritmo (Log PTH). Ad eccezione per l'età, non vi è stata interazione tra tutte le covariate e il sesso, suggerendo che non hanno determinato un effetto differenziato per maschi e femmine.



Per quanto riguarda l'età, in media, l'effetto per i pazienti di sesso femminile è stato positivo, vale a dire, i livelli di Log PTH aumentano con l'età (un aumento di 0.005 del Log PTH per ogni anno, corrispondente ad un incremento in percentuale dello 0,5% per il PTH). I soggetti di sesso maschile mostrano un effetto quasi raddoppiato dell'età sul Log PTH (un aumento di 0.00965 del Log PTH per ogni anno, corrispondente ad un incremento in percentuale di circa lo 0,97% per il PTH). La Figura 35 mostra un effetto divergente delle linee di regressione dei valori medi di PTH nei maschi e nelle femmine oltre l'età; in particolare, nelle femmine il punto di intersezione si trova intorno al periodo della menopausa.



**Figura 35** – Correlazione tra l'ormone paratiroideo (PTH) e l'età per i maschi (linea nera), le femmine (linea rossa) e l'intera popolazione (linea tratteggiata blu). I pallini indicano i valori medi di PTH per maschi e femmine (Ferrone F et al., 2019).

Esaminando per tutte le altre covariate, i maschi mostrano, in media, livelli di Log PTH inferiori a quelli delle femmine ( $r = -0.17463$ ;  $p < 0.001$ ) sebbene l'effetto dell'età sul PTH sia più forte per gli uomini. Pertanto, anche se gli uomini tendono a mostrare livelli più bassi di PTH in età giovanile, aumentano rapidamente i loro livelli di PTH con il tempo e mostrano livelli più elevati di PTH in media dopo i 40 anni.

Infine, gli errori Anova tipo III per il modello selezionato sono stati impiegati per valutare la percentuale di variabilità del Log PTH, dovuta a ciascuna covariata nel modello quando è stata immessa per ultima nella regressione.

Questo spiega la quantità di variabilità dovuta a quella particolare covariata poiché è la parte della variazione della variabile di risposta (target) che non è spiegata dalle altre covariate. Considerando la varianza totale spiegata dalle covariate nel modello senza l'intercetta, la 25(OH)D rappresenta il 32,1% della varianza totale nel PTH spiegata dalle covariate quando è stata inserita per ultima nel modello, il  $\text{Ca}^{2+}$  rappresenta il 18% della varianza totale nel PTH, il BMI il 14,3% e la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  l'11,1%. La restante percentuale è attribuibile all'età ed al sesso. Ciò è stato confermato dall'approccio dell'albero di regressione, in cui la 25(OH)D e il  $\text{Ca}^{2+}$  rappresentano la maggiore variazione nei livelli medi di PTH.

## DISCUSSIONE

L'iperparatiroidismo primario (o primitivo IPP o pHPT) è una malattia endocrina caratterizzata dalla iperproduzione di ormone paratiroideo, da parte delle paratiroidi, rispetto alle esigenze omeostatiche, cui consegue l'ipercalcemia.

La sua presentazione clinica è andata modificandosi nel tempo, passando da una forma plurisintomatica ad una forma asintomatica, che è la più comune modalità di presentazione dell'IPP, e negli ultimi dieci anni alla comparsa della forma normocalcemica.

L'iperparatiroidismo primario normocalcemico (NPHPT) è stato formalmente riconosciuto per la prima volta nel 2008 nell'ambito del Third International Workshop on the Management of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism (*Mazzuoli G e Minisola S, 2002; Cusano NE et al., 2013; Bilezikian JP et al., 2009; Marcocci C et al., 2015*), ed è caratterizzato da un innalzamento persistente della concentrazione di PTH in associazione a normali livelli di calcio totale e ionizzato, la cui diagnosi è possibile solo dopo aver escluso tutte le cause note di SHPT.

Esistono pochi dati in letteratura sulla epidemiologia del NPHPT, ottenuti per bias metodologico (cfr. Tabella 1).

Inoltre, la maggior parte dei lavori scientifici, che è stata condotta sia *in vitro* che *in vivo* per tentare di comprendere la regolazione della secrezione del PTH (*Minisola S et al., 1993; Souberbielle JC et al., 2016; Ritter CS e Brown AJ, 2011*), ha indagato su un singolo fattore, prendendo in esame un numero relativamente piccolo di soggetti o pazienti provenienti da centri terziari per le Malattie Metaboliche Dello Scheletro. Pertanto, in nessuno di questi studi è stata valutata l'importanza relativa dei diversi referenti ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , 25-idrossivitamina D, 1,25 diidrossivitamina D) nella regolazione della secrezione del PTH in una grande coorte di individui sani.

Per spiegare l'origine del NPHPT sono state proposte diverse ipotesi: 1) il

NPHPT è una patologia a se stante; 2) il NPHPT è una fase iniziale dell'SHPT non-classico (*Bordier P et al., 1977; Palmieri S et al., 2015*); 3) il NPHPT è la prima fase di un disordine bifasico, che successivamente potrebbe manifestarsi come pHPT ipercalcemico, occasionalmente “mascherata” dal deficit di estrogeni della menopausa (*Mazzuoli G e Minisola S, 2002; Cusano NE et al., 2013; Bilezikian JP et al., 2009; Marcocci C et al., 2015*); 4) il NPHPT è dovuto ad una resistenza degli organi bersaglio reni ed ossa all'azione del PTH (*Åkerström G e Hellman P, 2003; Rao DS et al., 2002; Marx SJ et al., 2002; Arnold A et al., 2002; Miedlich S et al., 2003; Maruani G et al., 2003*).

Progressi lavori hanno documentato come lo sviluppo clinico dell'IPP sia associato a fattori genetici, in particolare a polimorfismi del recettore della vitamina D (VDR) (*Carling T et al., 1995*) e del CaSR (*Yano S et al., 2000; Yamauchi M et al., 2001; Scillitani A et al., 2007; Cetani F, 2002; Miedlich S et al., 2001*).

In considerazione di quanto detto, il lavoro del gruppo di ricerca di cui faccio parte è il primo, a quanto ci risulta al momento, a: 1) stimare la prevalenza del NPHPT dopo aver escluso tutte le cause secondarie di aumento del PTH; 2) dosare il  $\text{Ca}^{2+}$  oltre alla calcemia totale; 2) misurare i livelli di PTH circolanti con un metodo accurato; 3) valutare simultaneamente l'importanza relativa dei diversi parametri noti per influenzare la secrezione del PTH in una grande coorte di più di 2.000 volontari sani (*Ferrone F et al., 2019*).

Infatti, ulteriori punti di forza di questo studio sono rappresentati dal fatto che la popolazione usata non è stata selezionata nell'ambito di soggetti afferenti al centro per le Malattie Metaboliche Dello Scheletro, bensì consiste in individui sani donatori di sangue, e che tutti i partecipanti con ipovitaminosi D sono stati supplementati con colecalciferolo, raggiungendo livelli di vitamina D sufficienti. Tuttavia, vi sono dei limiti in questo lavoro che riguardano la popolazione in esame. Essa, difatti, è caratterizzata da soggetti in maggioranza uomini e giovani (1731 uomini, 74% del totale; età media  $42 \pm 11,71$ ), mentre è noto che il pHPT

è una patologia che colpisce prevalentemente l'età adulta, con una maggiore prevalenza nelle donne in menopausa.

Ad ogni modo, essendo stato da noi ipotizzato che il NPHPT sia la prima fase di un disordine bifasico, che successivamente potrebbe manifestarsi come IPP ipercalcemico, l'età della popolazione da noi presa in analisi coinciderebbe con la fase iniziale di sviluppo della malattia.

La prevalenza del NPHPT riscontrata nel nostro studio è dell'1,31%.

Inoltre, in nessuno dei principali lavori sulla prevalenza del NPHPT, condotti fino a questo momento in coorti di pazienti non selezionati in una struttura dedicata al ricambio minerale scheletrico (*Lundgren E et al., 1997; Misra B et al., 2008; Berger C et al., 2011; Garcia-Martin A et al., 2012*), è stato dosato il  $\text{Ca}^{2+}$ .

In particolare, nello studio di Lundgren e colleghi (*Lundgren E et al., 1997*), in cui è stata riscontrata una prevalenza di PTH elevato e normali livelli di calcemia totale e  $\text{Ca}^{2+}$  dello 0,5%, non è stato effettuato né il dosaggio della vitamina D né l'analisi della funzione renale, per cui non sono state escluse la carenza di vitamina D e la ridotta clearance della creatinina come cause secondarie di aumento del PTH.

Al contrario, nello studio canadese (*Berger C et al., 2011*), in cui la prevalenza riscontrata è stata piuttosto elevata (16,7%), il cut-off di 25(OH)D preso in considerazione era di 20 ng/mL e non sono stati esclusi i soggetti con ridotta clearance della creatinina.

Infine, lo studio spagnolo (*Garcia-Martin A et al., 2012*), che ha evidenziato una prevalenza del 6%, è stato condotto su una popolazione numericamente piccola (100 soggetti in totale).

I polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs), che si originano per mutazioni puntiformi a carico di un singolo nucleotide, sono essenzialmente importanti per due principali motivi: 1) biomarcatori genetici per la localizzazione di possibili geni, adiacenti ad essi, coinvolti nella patogenesi delle malattie multigeniche

complesse, come le patologie iperparatiroidiche; 2) loro capacità di poter influenzare i livelli di espressione genica o la funzionalità proteica, determinando dei cambiamenti fenotipici più o meno rilevanti.

Considerato ciò, in questo lavoro sono stati selezionati dalla banca dati NCBI ed analizzati i polimorfismi del gene CaSR nei 23 individui volontari sani, che dalla valutazione biochimico-analitica sono risultati essere iperparatiroidici normocalcemici in assenza di ipercalciuria renale, al fine di trovare una possibile associazione genetica tra i suddetti SNPs e l'aumento persistente dei livelli del PTH in presenza di normocalcemia, non attribuibile ad alcuna causa secondaria.

Le analisi biochimiche ematiche ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , PTH, 25-idrossivitamina D, 1,25-diidrossivitamina D), prima e dopo la supplementazione con colecalciferolo 50.000 UI settimanali per os per quattro settimane, sono state realizzate mediante il metodo iono-selettivo e tramite l'immunodosaggio a chemiluminescenza (CLIA).

La tipizzazione genotipica degli SNPs del gene CaSR è avvenuta mediante sequenziamento Sanger tramite un processo di elettroforesi capillare completamente automatizzato.

I risultati ottenuti dal sequenziamento degli esoni 2-7 del gene CaSR nei 23 soggetti NPHPT, in particolare quelli relativi agli SNPs situati nell'esone 7d (rs1042636 e rs1801725), sembrano confermare l'ipotesi da noi sostenuta circa l'origine del NPHPT, ovvero che la forma iperparatiroidica normocalcemica sia la prima fase di un disordine bifasico, il quale successivamente potrebbe manifestarsi come pHPT ipercalcemico.

Infatti, in due recenti lavori (*Guha M et al., 2015; Díaz-Soto G et al., 2016*) è stato visto che i polimorfismi rs1042636 (c.2968A>G) e rs1801725 (c.2956G>T), situati nella coda intracellulare della proteina CaSR e determinanti variazioni aminoacidiche non conservative, rispettivamente R990G ed A986S, sono significativamente associati con la calcolosi renale (Kidney Stone Disease KSD), con l'ipercalciuria in pazienti con o senza i calcoli renali, o con elevati

livelli di PTH.

In particolare, nello studio di Guha e colleghi (*Guha M et al., 2015*) sono state trovate elevate concentrazioni di calcio sierico in individui portatori dell'allele T del polimorfismo A986S, suggerendo che il CaSR, in questi casi, eserciti un'azione inibitoria sul riassorbimento tubulare del calcio e sulla secrezione di PTH, determinando un aumento dei livelli plasmatici di calcio accoppiati ad un'elevata escrezione di calcio. Inoltre, studi *in vitro* hanno mostrato che il polimorfismo R990G può dare luogo ad un guadagno funzionale per il CaSR. Pertanto, l'allele G del polimorfismo R990G sembra aumentare la sensibilità del CaSR al calcio sierico, portando ad una maggiore inibizione del riassorbimento di calcio nelle cellule del segmento ascendente spesso dell'ansa di Henle e, di conseguenza, causando elevati livelli di escrezione di calcio (ipercalciuria) in pazienti con o senza KSD. Il lavoro di Guha e colleghi ha anche mostrato che gli individui che portano sia l'allele T del polimorfismo A986S che l'allele G del polimorfismo R990G, come tre dei 23 pazienti NPHPT, presentano un rischio maggiore di sviluppare la KSD rispetto agli individui che portano l'allele T del polimorfismo A986S o l'allele G del polimorfismo R990G.

Nello studio di Díaz-Soto e colleghi (*Díaz-Soto G et al., 2016*), invece, è stato visto che nei pazienti con NPHPT, l'allele T del polimorfismo A986S è associato ad elevati livelli di PTH intatto statisticamente significativi. Per questo motivo, hanno pensato che il polimorfismo A986S possa essere un predittore indipendente dei livelli di PTH nei pazienti NPHPT, ma non nei pazienti IPP asintomatici.

Riguardo al polimorfismo rs115230894 (c.1631G>A), situato nel sesto esone del gene CaSR e determinante la variazione aminoacidica non conservativa R544Q, esistono pochi dati in letteratura sull'effetto di questo SNP sul funzionamento della proteina CaSR in pazienti con NPHPT o IPP.

Tuttavia, in un recente lavoro (*Cavaco BM et al., 2018*) è stato rilevato tale polimorfismo in un caso insolito in cui il probando è presentato come



ipocalcemico autosomico dominante di tipo 1 (ADH1), ma è omozigote per questa variante CaSR.

Cavaco e colleghi hanno realizzato diversi studi funzionali *in vitro* per confrontare il comportamento del CaSR in presenza degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulari sia con la variante R544Q sia con le varianti ingegnerizzate mutanti R544K, E604K, F539A ed F539L.

I risultati hanno mostrato che nel legame con gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulari e nella conseguente dimerizzazione del CaSR ed attivazione della proteina  $G_i$ , a valle nel versante intracellulare, gioca un ruolo importante l'interazione cation- $\pi$  tra gli aminoacidi R544-F539, situati nel dominio extracellulare ricco in cisteine del CaSR. Tale interazione contribuirebbe a mantenere il recettore in una conformazione inattiva quando il ligando  $\text{Ca}^{2+}$  è assente.

Nel dettaglio, è stato osservato che: quando è presente la variante wild type R544, il CaSR viene attivato dal ligando  $\text{Ca}^{2+}$ , la distanza tra gli aminoacidi R544 ed F539 aumenta e le forze elettrostatiche dell'interazione cation- $\pi$  R544-F539 si indeboliscono; quando è presente la variante mutata Q544, l'interazione cation- $\pi$  R544-F539 viene persa e la potenza di attivazione del CaSR aumenta, determinando una stimolazione maggiore delle vie di segnalazione del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare e delle MAPK/ERK (polimorfismo iperattivante il CaSR). Pertanto, tali test funzionali *in vitro* hanno suggerito che la variante polimorfica Q544 in omozigosi è significativamente più attiva della variante wild type R544 nella curva dose-risposta al  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare, mentre la variante polimorfica Q544 in eterozigosi (come nel caso di uno dei nostri 23 pazienti NPHPT) non è significativamente più attiva della variante wild type R544 nel legame al  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare.

Dal momento che la variante R544Q è stata associata a casi di ADH e di persistente ipocalcemia ed essendo questo effetto opposto al fenotipo osservato nel nostro paziente NPHPT, avente questo SNP in eterozigosi, stiamo pensando di avviare un'analisi di segregazione familiare di tale polimorfismo per verificare

se altri parenti (genitori o figli) del soggetto in esame presentino la stessa variante e condividano anche lo stesso fenotipo clinico. Nel caso in cui dovessimo riscontrare che tali individui in analisi presentino lo stesso SNP e valori di PTH border line, si dovrebbe procedere con il sequenziamento dell'esoma degli altri geni che potrebbero causare il fenotipo NPHPT oltre al gene CaSR (come i geni GNA11, PTH, GCMb, TBX1).

Per quanto riguarda lo studio dell'influenza relativa del  $\text{Ca}^{2+}$ , del  $\text{Mg}^{2+}$ , della 25(OH)D e della 1,25(OH)<sub>2</sub>D nella regolazione della secrezione di PTH in soggetti sani, soltanto 2259 donatori su 2355 sono risultati sani (Ferrone F et al., 2019). Sono stati esclusi per questa seconda parte dello scopo del presente lavoro 96 soggetti: 31 pazienti con NPHPT (8 dei quali con ipercalciuria renale) che sono stati sottoposti ad un'analisi di associazione genetica con i polimorfismi del gene CaSR, collegati al fenotipo iperparatiroideo; 30 pazienti con IPP; 26 pazienti che sono stati considerati come valori anomali in base ai valori di  $\text{Ca}^{2+}$  e PTH (vedi sezione analisi statistica); 7 pazienti con ipoparatiroidismo idiopatico; 2 soggetti per problemi tecnici (cioè, campioni di sangue inadeguati, problemi di conservazione). I 2259 soggetti nella nostra analisi includono 1652 uomini e 607 donne di età compresa tra i 18 ed i 68 anni (età media  $40,3 \pm 11,85$ ).

I risultati ottenuti al termine delle analisi biochimiche ematiche ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , PTH, 25-idrossivitamina D, 1,25-diidrossivitamina D), prima e dopo la supplementazione con colecalciferolo 50.000 UI settimanali per os per quattro settimane, dimostrano che, in un ordine gerarchico in condizioni stabili non acute, la 25(OH)D svolge un ruolo significativo nella regolazione della secrezione di PTH rispetto alle altre variabili esaminate, incluso il  $\text{Ca}^{2+}$  sierico. È importante sottolineare che questo risultato è rimasto coerente in tre approcci statistici. L'influenza della 25(OH)D può riguardare non solo il suo effetto periferico sull'assorbimento intestinale di calcio (Heaney RP, 2005; Shapses SA, 2014), ma anche un suo effetto diretto sulla secrezione di PTH a livello centrale. Infatti, un certo numero di studi, compresi i lavori cardine pubblicati in

precedenza (*Pepe J et al., 2005*), hanno costantemente mostrato un'associazione inversa tra il PTH e la 25(OH)D (*Munns CF et al., 2016*). Questo è probabilmente correlato all'espressione della glicoproteina di membrana megalina (un recettore per la proteina legante la vitamina D DBP) da parte delle cellule paratiroidi, che consente l'interiorizzazione del substrato 25(OH)D legato alla DBP e la sua successiva idrossilazione nella forma attiva 1,25(OH)<sub>2</sub>D da parte dall'enzima 1 $\alpha$ -idrossilasi, CYP27B1 (*Christensen EI e Birn H, 2001; Chun RF et al., 2014*). L'obiettivo di questo lavoro non è quello di ignorare l'importanza del Ca<sup>2+</sup> sierico e il ruolo fondamentale del CaSR nel regolare la secrezione di PTH; nel nostro studio ciò è stato chiaramente stabilito in soggetti di età superiore ai 38 anni con valori di 25(OH)D superiori a 13 ng/mL. Inoltre, in caso di perturbazioni acute dell'omeostasi del calcio, come quelle riscontrate nell'ipo- o nell'iper-calcemia acuta, il più importante fattore trainante nella regolazione della secrezione di PTH è rappresentato dal Ca<sup>2+</sup> sierico, i cui livelli vengono rilevati dal CaSR espresso sulle ghiandole paratiroidi (*Brown EM, 2013; Goltzman D e Hendy GN, 2015*). Sia gli studi sperimentali che quelli umani supportano questi risultati.

Silver e colleghi (*Silver J et al., 1986*) hanno dimostrato che la somministrazione di 1,25(OH)<sub>2</sub>D ha marcatamente diminuito la trascrizione del gene PTH senza concomitanti cambiamenti nelle concentrazioni di calcio sierico. Quando studiato *in vivo*, invece, l'azione soppressiva della vitamina D sull'mRNA che codifica per il pre-pro PTH (precursore del PTH) è risultata essere dominante rispetto agli elevati livelli di Ca<sup>2+</sup> (*Silver J et al., 1986; Naveh-Many T et al., 1989*). Studi *in vitro* hanno dimostrato che la stimolazione del recettore della vitamina D (VDR) con doxercalciferolo e calcidiolo sopprime direttamente l'espressione genica dell'ormone paratiroideo. Questi studi costituiscono la base per l'utilizzo di analoghi della vitamina D nel contesto dell'iperparatiroidismo uremico secondario (*Chen CL et al., 2015; Zand L e Kumar R, 2017; Giannini S et al., 2018*) al fine di ridurre la secrezione di PTH con variazioni minime o nulle

nelle concentrazioni sieriche di calcio. Due studi precedenti sono di particolare importanza in questo contesto.

Il primo è uno studio di farmacocinetica sulla somministrazione orale ed intramuscolare di 300.000 UI di colecalciferolo, che ha rivelato che le variazioni nei livelli sierici di PTH sono indipendenti da concomitanti cambiamenti non significativi nel  $\text{Ca}^{2+}$  sierico. Il modello lineare generale ha dimostrato che, tra tutte le variabili considerate, la 25(OH)D gioca un ruolo significativo nell'influenzare i livelli sierici di PTH sia nel breve (3 giorni) che nel lungo termine (30 e 60 giorni) (*Romagnoli E et al., 2008*).

Il secondo studio ha esaminato la somministrazione di 600.000 UI ed ha riscontrato risultati simili, con l'unica eccezione di un incremento di 0,2 mg/dL di calcio sierico al terzo giorno di osservazione (*Cipriani C et al., 2010*); aumenti nei livelli sierici di 25(OH)D sono risultati essere inversamente correlati ai cambiamenti dei livelli circolanti di PTH.

Entrambi gli studi sono stati confermati dai dati successivi di altri ricercatori (*Rossini M et al., 2012*), che hanno dimostrato inequivocabilmente il ruolo preminente della 25(OH)D rispetto al calcio sierico nella regolazione della secrezione di PTH, almeno nelle precedenti condizioni cliniche.

Un'altra importante scoperta di questo studio è legata al comportamento dei livelli sierici di PTH con l'età. Diversi lavori hanno mostrato un aumento del PTH con l'avanzare dell'età (*Minisola S et al., 1993; Young G et al., 1987; Haden ST et al., 2000*). Ciò è stato attribuito a molte ragioni, tra cui la diminuzione dell'assorbimento intestinale di calcio, secondaria alla diminuzione della produzione di  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  (*Nordin BE et al., 2004*) e/o, ipoteticamente, all'aumentata resistenza agli organi bersaglio.

A quanto ci risulta al momento, questo studio è il primo condotto in una grande coorte di più di 2.000 volontari sani che ha analizzato separatamente i cambiamenti nei livelli sierici di PTH in funzione dell'età in entrambe i sessi (*Ferrone F et al., 2019*). È interessante notare che abbiamo trovato un

comportamento divergente tra maschi e femmine in modo che a circa 40 anni le linee iniziano a divergere. Questo potrebbe essere correlato al periodo peri- e menopausale in cui il riassorbimento osseo aumenta, in seguito alla carenza di estrogeni, con l'efflusso di calcio dall'osso, limitando poi temporaneamente l'aumento del PTH nelle femmine (*Pacifici R et al., 1989*). Un importante corollario della nostra indagine è rappresentato dal fatto che i valori normali di PTH sierico dovrebbero essere specifici per età e sesso.

Per quanto riguarda le altre correlazioni, la relazione tra i livelli di PTH e il BMI è probabilmente mediata dai livelli di 25(OH)D. Diversi studi hanno riportato che il sequestro del calcidiolo nel tessuto adiposo è alla base di questa associazione (*Heaney RP et al., 2009*); tuttavia, altri fattori, come gli elevati livelli di leptina e l'interleuchina 6 (IL-6) prodotta dal tessuto grasso, che hanno un effetto inibitorio sulla sintesi della 25(OH)D, potrebbero anche avere un ruolo nella regolazione del PTH (*Cipriani C et al., 2014*).

La correlazione diretta tra la 1,25(OH)<sub>2</sub>D e livelli sierici di PTH può essere spiegata dalla conversione della 25(OH)D nella 1,25(OH)<sub>2</sub>D come funzione del PTH circolante. Questo è simile a quello che generalmente ci si aspetta che si verifichi nell'IPP (*Carnevale V et al., 2004; Shah VN et al., 2014; Rao DS et al., 2000*) o dopo la somministrazione di PTH a scopo terapeutico (*Piemonte S et al., 2009; Cosman F et al., 2012*). L'assenza di correlazioni quando si considerano solo le femmine può essere attribuita al ben noto effetto della carenza di estrogeni sulla produzione di 1,25(OH)<sub>2</sub>D (*Gennari C et al., 1990*).

Non abbiamo una spiegazione ovvia per la correlazione tra Mg<sup>2+</sup> e PTH; tuttavia, l'assenza di qualsiasi correlazione quando si considera l'effetto del sesso suggerisce una scoperta spuria o casuale e quindi sono necessari ulteriori studi in questo settore.

La principale limitazione nel valutare contemporaneamente l'importanza relativa dei diversi parametri noti per influenzare la secrezione del PTH in una grande coorte di più di 2.000 volontari sani è stata quella di non aver incluso la velocità

di filtrazione glomerulare come stima della funzione renale. Tuttavia, i soggetti studiati sono volontari donatori di sangue, controllati periodicamente per i principali problemi di salute, compresa la funzione renale; pertanto, è improbabile che abbiano delle malattie che danneggino significativamente il rene. Inoltre, è ipotizzabile che l'aggiunta di altri fattori noti per contribuire anche alla secrezione del PTH, come ad esempio l'FGF23, possa modificare i risultati ottenuti nel nostro modello.

## CONCLUSIONI

Questo studio ha dimostrato che in condizioni clinicamente stabili, in assenza di perturbazioni acute dell'omeostasi del calcio, la vitamina D gioca un ruolo significativo nella regolazione della secrezione del PTH. In condizioni cliniche di sufficienza relativa di vitamina D, anche il  $\text{Ca}^{2+}$  sierico svolge un ruolo importante.

La prevalenza del NPHPT riscontrata nella nostra coorte di soggetti volontari sani è dell'1,31%.

I 23 soggetti attualmente identificati come affetti da NPHPT ed analizzati geneticamente non presentano, per adesso, manifestazioni cliniche correlate all'iperfunzione paratiroidea, ma la maggior parte di essi è risultata positiva ai polimorfismi del gene CaSR che predispongono all'ipercalcemia accoppiata o meno all'iper calciuria, alla formazione di calcoli renali, ad elevati livelli di PTH intatto statisticamente significativi, e/o allo sviluppo di neoplasia delle paratiroidi nel sesso maschile. Tutto ciò suggerisce che l'ipotesi della forma iperparatiroidea normocalcemia come prima fase di un disordine bifasico, che successivamente potrebbe manifestarsi come IPP ipercalcemico, sia quella più plausibile.

Per questo motivo, i 23 pazienti in esame saranno seguiti longitudinalmente per conoscere la storia naturale a lungo termine della patologia.

## BIBLIOGRAFIA

**Adami S, Marcocci C, Gatti D**, 2002. Epidemiology of primary hyperparathyroidism in Europe. *J. Bone Miner. Res.*; 17: N18-N23.

**Åkerström G, Hellman P**, 2003. Primary hyperparathyroidism. *Curr. Opin. Oncol.*; 16: 1-7.

**Amin AL, Wang TS, Wade TJ et al.**, 2011. Normal PTH levels in primary hyperparathyroidism: still the same disease?. *Ann. Surg. Oncol.*; 18 (12): 3437-3442.

**Applewhite MK, White MG, Tseng J et al.**, 2017. Normohormonal primary hyperparathyroidism is a distinct form of primary hyperparathyroidism. *Surgery*; 161 (1): 62-69.

**Arnold A, Shattuck TM, Mallya SM, et al.**, 2002. Molecular pathogenesis of primary hyperparathyroidism. *J. Bone Miner. Res.*; 17: N30-N36.

**Balsa JA, Botella-Carretero JJ, Peromingo R, et al.**, 2008. Role of calcium malabsorption in the development of secondary hyperparathyroidism after biliopancreatic diversion. *J. Endocrinol. Invest.*; 31: 845-50.

**Barnard K, Colón-Emeric C**, 2010. Extraskeletal effects of vitamin D in older adults: cardiovascular disease, mortality, mood, and cognition. *Am. J. Geriatr. Pharmacother.*; 8(1):4-33.

**Berger C, Langsetmo L, Hanley D et al.**, 2011. Relative Prevalence of Normocalcemic and Hypercalcemic Hyperparathyroidism in a Community-Dwelling Cohort. *Program of the 33rd Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research*; San Diego, California. 2011. p. SU0173.

**Bilezikian JP**, 2007. Primary Hyperparathyroidism. *De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, et al., editors*. www.endotext.org. Chapter 5.

**Bilezikian JP, Khan AA, Potts JT Jr**, 2009. Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: summary statement from the third international workshop. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 94: 335-9.

**Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B**, 2006. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *American Journal of Clinical Nutrition*; 84(1): 18-28.

**Bollerslev J, Wilson SG, et al.**, 2004. Calcium-sensing receptor gene polymorphism A986S does not predict serum calcium level, bone mineral density, calcaneal ultrasound indices, or fracture rate in a large cohort of elderly women. *Calcif. Tissue Int.*; 74: 12-17.

**Bordier P, Ryckewart A, Gueris J, Rasmussen H**, 1977. On the pathogenesis of the so-called idiopathic hypercalciuria. *Am. J. Med.*; 63: 398-409.

**Bringhurst FR, Demay MB, Kronenberg HM**, 1998. Hormones and disorders of mineral metabolism. Wilson, Foster, Kronenberg, Larsen. *Williams Textbook of endocrinology*, W. B. Saunders Company. Philadelphia. 9<sup>th</sup> edition; 1160-2.

**Brown EM**, 1991. Extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor, regulation of parathyroid cell function, and role of calcium and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol. Rev.*; 71: 371-411.



**Brown EM, Gamba G, Riccardi D et al., 1993.** Cloning and characterization of an extracellular Ca-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*; 366: 575-580.

**Brown EM, Vassilleu PM, Quinn S, Hebert SC, 1999.** G protein coupled extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor: a versatile regulator of diverse cellular functions. *Vitamines and Hormones*; 55: 1-71.

**Brown EM, 2013.** Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*; 27 (3): 333-343.

**Buttigliero C, Monagheddu C, Petroni P, Saini A, Dogliotti L, Ciccone G, Berruti A, 2011.** Prognostic role of vitamin D status and efficacy of vitamin D supplementation in cancer patients: a systematic review. *The Oncologist*; 16 (9): 1215-27.

**Carling T, Kindmark A, Hellman P, Lundgren E, Ljunghall S, Rastad J, Akertstrom G, Melhus H, 1995.** Vitamin D receptor genotypes in primary hyperparathyroidism. *Nature Med.*; 1: 1309-1311.

**Carnevale V, Manfredi G, Romagnoli E, et al., 2004.** Vitamin D status in female patients with primary hyperparathyroidism: does it play a role in skeletal damage?. *Clin. Endocrinol.*; 60 (1): 81-86.

**Cavaco BM, Canaff L, Nolin-Lapalme A, Vieira M, Silva TN, Saramago A, Domingues R, Rutter MM, Hudon J, Gleason JL, Leite V, Hendy GN, 2018.** Homozygous Calcium-Sensing Receptor Polymorphism R544Q Presents as Hypocalcemic Hypoparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 103 (8): 2879-2888.

**Caverzasio J, Rizzoli R, Bonjour JP, 1986.** Sodium-dependent phosphate transport inhibited by parathyroid hormone and cyclic AMP stimulation in an opossum kidney cell line. *J. Biol. Chem.*; 261: 3233-7.

**Cédric Annweiler, Yves Rolland e Anne M Schott, 2012.** Higher vitamin D dietary intake is associated with lower risk of Alzheimer's disease: a 7-year follow-up. *The Journals of Gerontology*; 67 (11): 1205-1211.

**Cédric Annweiler, David J. Llewellyn e Olivier Beauchet, 2016.** Low serum vitamin D concentrations in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's disease*; 33 (3): 659-674.

**Cetani F, Borsari S et al., 2002:** Calcium-sensing receptor gene polymorphism in primary hyperparathyroidism. *J. Endocrinol. Invest.*; 25: 614-619.

**Charopoulos I, Tournis S, Trovas G, et al., 2006.** Effect of primary hyperparathyroidism on volumetric bone mineral density and bone geometry assessed by peripheral quantitative computed tomography in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 91: 1748-1753.

**Chattopadhyay N, Cheng I et al., 1998.** Identification and localization of extracellular Calcium-sensing receptor in rat intestine. *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver. Physiol.*; 274: G122-G130.

**Chen CL, Chen NC, Hsu CY, et al., 2014.** An open-label, prospective pilot clinical study of denosumab for severe hyperparathyroidism in patients with low bone mass undergoing dialysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 99 (7): 2426-2432.

**Chen CL, Chen NC, Liang HL, et al., 2015.** Effects of denosumab and calcitriol on severe secondary hyperparathyroidism in dialysis patients with low bone mass. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 100 (7) (2015) 2784-2792.

**Christensen EI, Birn H, 2001.** Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*; 280 (4): F562-F573.

**Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS, Hewison M, 2014.** Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*; 144 (Pt A): 132-137.

**Cipriani C, Carnevale V, Biamonte F, Piemonte S, Pepe J, Nieddu L, Bilezikian JP, Minisola S, 2014.** Hospital care for primary hyperparathyroidism in Italy: a 6-year register-based study. *Eur. J. Endocrinol.*; 171: 481-7.

**Cipriani C, Pepe J, Piemonte S, Colangelo L, Cilli M, Minisola S, 2014.** Vitamin D and its relationship with obesity and muscle; *Int. J. Endocrinol.*; 2014: 841248.

**Cipriani C, Romagnoli E, Scillitani A, et al., 2010.** Effect of a single oral dose of 600,000 IU of cholecalciferol on serum calciotropic hormones in young subjects with vitamin D deficiency: a prospective intervention study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 95 (10): 4771-4777.

**Coe FL, Canterbury JM, Firpo JJ, Reiss E, 1973.** Evidence for secondary hyperparathyroidism in idiopathic hypercalciuria. *J. Clin. Invest.*; 52: 134-42.

**Coe FL, Parks JH, Asplin JR, 1992.** The pathogenesis and treatment of kidney stones. *New Eng. J. Med.*; 327 :1141-1152.

**Cole DE, Peltekova VD et al., 1998.** A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor and circulating calcium concentration. *Lancet*; 353: 112-115.

**Cooke NE and Haddad JG, 1989.** Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr. Rev.*; 10: 294-307.

**Cosman F, Dawson-Hughes B, Wan X, Krege JH, 2012.** Changes in vitamin D metabolites during teriparatide treatment. *Bone*; 50 (6): 1368-1371.

**Cusano NE, Silverberg SJ, Bilezikian JP, 2013.** Normocalcemic Primary Hyperparathyroidism. *J. Clin. Densitom.*; 16: 33-9.

**D'Amour P, Lazure C, LaBelle F, 1985.** Metabolism of radioiodinated carboxy-terminal fragments of bovine parathyroid hormone in normal and anephric rat. *Endocrinology*; 177: 127-34.

**De Luca HF, 2004.** Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am. J. Clin. Nutr.*; 80 (6 Suppl): 1689S-1696S.

**Di Stefano A, Wittner M, Nitschke R, et al., 1998.** Effects of parathyroid hormone and calcitonin on Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> transport in cortical and medullary thick ascending limbs of mouse kidney. *Pfuegers Arch*; 603: 28-34.

**Díaz-Soto G, Romero E, Castrillón JLP, Jauregui OI, de Luis Román D, 2016.** Clinical Expression of Calcium Sensing Receptor Polymorphism (A986S) in Normocalcemic and Asymptomatic Hyperparathyroidism. *Horm. Metab. Res.*; 48: 163-168.

**Dusso AS, Brown AJ and Slatopolsky E, 2005.** Vitamin D. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*; 289: F8-F28.

**Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ, 2014.** The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat. Rev. Cancer.*; 14(5): 342-57.

**Ferrone F, Pepe J, Danese VC, Fassino V, Cecchetti V, De Lucia F, Biamonte F, Colangelo L, Ferrazza G, Panzini E, Scillitani A, Nieddu L, Blocki F, Rao SD, Minisola S, Cipriani C, 2019 Aug (Epub 2019 May 23).** The relative influence of serum ionized calcium and 25-hydroxyvitamin D in regulating PTH secretion in healthy subjects. *Bone*; 125: 200-206.

**Fraser DR, Kodicek E, 1973.** Regulation of 25-hydroxy-cholecalciferol-hydroxylase activity in kidney by parathyroid hormone. *Nature New Biol.*; 241: 163-6.

**Fraser DR, Kodicek E, 1970.** Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature*; 228: 764-766.

**Friedman PA and Goodman G, 2006.** PTH(1–84)/PTH(7–84): a balance of power. *Am. J. Physiol. Renal., Physiol.*; 290: F975-F984.

**Garcia-Martin A, Reyes-Garcia R, Munoz-Torres M, 2012.** Normocalcemic primary hyperparathyroidism: one-year follow-up in one hundred postmenopausal women. *Endocrine*; 42: 764-6.

**Gennari C, Agnusdei D, Nardi P, Civitelli R, 1990.** Estrogen preserves a normal intestinal responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in oophorectomized women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 71 (5): 1288-1293.

**Gianfrancesco MA, Stridh P, Rhead B, Shao X, Xu E, Graves JS, Chitnis T, Waldman A, Lotze T, Schreiner T, Belman A, Greenberg B, Weinstock-Guttman B, Aaen G, Tillema JM, Hart J, Caillier S, Ness J, Harris Y, Rubin J, Candee M, Krupp L, Gorman M, Benson L, Rodriguez M, Mar S, Kahn I, Rose J, Roalstad S, Casper TC, Shen L, Quach H, Quach D, Hillert J, Bäärnhielm M, Hedstrom A, Olsson T, Kockum I, Alfredsson L, Metayer C, Schaefer C, Barcellos LF, Waubant E, 2017.** Evidence for a causal relationship between low vitamin D, high BMI, and pediatric-onset MS. *Neurology*; 88 (17): 1623-1629.

**Giannini S, Mazzaferro S, Minisola S, De Nicola L, Rossini M, Cozzolino M, 2018.** Raising awareness on the therapeutic role of cholecalciferol in CKD: a multidisciplinary-based opinion. *Endocrine*; 59 (2): 242-259.

**Goltzman D, Hendy GN, 2015.** The calcium-sensing receptor in bone—mechanistic and therapeutic insights. *Nat. Rev. Endocrinol.*; 11 (5): 298-307.

**Gonzalez-Parra E, Rojas-Rivera J, Tuñón J, Praga M, Ortiz A, Egido J, 2012.** Vitamin D receptor activation and cardiovascular disease. *Nephrol. Dial., Transplant.*; 27 (Supple 4): iv17-21.

**Guha M, Bankura B, Ghosh S, et al., 2015.** Polymorphisms in CaSR and CLDN14 Genes Associated with Increased Risk of Kidney Stone Disease in Patients from the Eastern Part of India. *PLoS One*; 10(6): e0130790.

**Haden ST, Brown EM, Hurwitz S, Scott J, El-Hajj Fuleihan G, 2000.** The effects of age and gender on parathyroid hormone dynamics. *Clin. Endocrinol.*; 52 (3): 329-338.

**Hsiao MY, Hung CY, Chang KV, Han DS, Wang TG, 2015.** Is Serum Hypovitaminosis D Associated with Chronic Widespread Pain Including Fibromyalgia? A Meta-analysis of Observational Studies. *Pain. Physician.*; 18 (5): E877-87.

**Heaney RP, 2005.** Serum 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone exhibit threshold behavior. *J. Endocrinol. Investig.*; 28 (2): 180-182.

**Heaney RP, 2005.** The vitamin D requirement in health and disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*; 97 (1-2): 13-19.

**Heaney RP, Horst RL, Cullen DM, Armas LA, 2009.** Vitamin D3 distribution and status in the body. *J. Am. Coll. Nutr.*; 28 (3): 252-256.

**Hebert SC, Brown EM, Harris HW, 1997.** Role of calcium sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis. *J. Exp. Biol.*; 200: 295-302.

**Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS, 2004.** Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 $\alpha$ -hydroxylase. *Mol. Cell. Endocrinol.*; 215: 31-38.

**Holick MF, 2007.** Vitamin D Deficiency. *N. Engl. J. Med.*; 357:266-81.

**Holick MF, 2006.** High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo. Clin. Proc.*; 81:353-73.

**Horiuchi N, Suda T, Takahashi H, 1977.** In vivo evidence for the intermediary role of 3'-5'-Cyclic AMP in parathyroid hormone induced stimulation of 1  $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D synthesis in rats. *Endocrinology*; 101: 969-72.

**Kidney International, 2009.** KDIGO Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int. Suppl.*; S1-130.

**Kiriakopoulos A, Petralias A, Linos D, 2018.** Classic Primary Hyperparathyroidism Versus Normocalcemic and Normohormonal Variants: Do They Really Differ?. *World J. Surg.*; 42 (4): 992-997.

**Kronenberg HM, Richard Bringham F, Segre GV, et al., 2001.** Parathyroid hormone biosynthesis and metabolism. In: *Bilezikian et al., (ed). The parathyroid, Raven Press, New York 2001, 17-30.*

**Lavryk OA, Siperstein AE, 2017.** Use of calcium and parathyroid hormone nomogram to distinguish between atypical primary hyperparathyroidism and normal patients. *World J. Surg.*; 41 (1): 122-128.

**Li M, Chen P, Li J, Chu R, Xie D, Wang H, 2014.** Review: the impacts of circulating 25-hydroxyvitamin D levels on cancer patient outcomes: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 99 (7): 2327-36.

**Lim JY, Herman MC, Bubis L et al., 2017.** Differences in single gland and multigland disease are seen in low biochemical profile primary hyperparathyroidism. *Surgery*; 161 (1): 70-77.

**Lorentzon M, Lorentzon R et al., 2001.** Calcium sensing-receptor gene polymorphism, circulating calcium concentration and bone mineral density in healthy adolescent girls. *Eur. J. Endocrinol.*; 144: 257-261.

**Lundgren E, Rastad J, Thrufjell E, et al., 1997.** Population-based screening for primary hyperparathyroidism with serum calcium and parathyroid hormone values in menopausal women. *Surgery*; 121: 287-94.

**Mace ML, Gravesen E, Nordholm A, Olgaard K, Lewin E, 2018.** Fibroblast growth factor (FGF) 23 regulates the plasma levels of parathyroid hormone in vivo through the FGF receptor in normocalcemia, but not in hypocalcemia. *Calcif. Tissue Int.*; 102 (1): 85-92.

**Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF, 1998.** Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet*; 351:805-6.

**Mallette LE, Khouri K, Zengotita H, et al., 1989.** Lithium treatment increases intact and midregion parathyroid hormone and parathyroid volume. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 68: 654-60.

**Marcocci C, Brandi ML, Scillitani A, Corbetta S, Faggiano A, Gianotti L, Migliaccio S, Minisola S, 2015.** Italian Society of Endocrinology Consensus Statement: definition, evaluation and management of patients with mild primary hyperparathyroidism. *J. Endocrinol. Invest.*; 38: 577-93.

**Marcocci C, Cianferrotti L, Ambrogini E, 2002.** Pathophysiology of parathyroid function. *Ligand Assay*; 7 (1) 2002.

**Martin KJ, Hruska KA, Freitag JJ, et al., 1979.** The peripheral metabolism of parathyroid hormone. *N. Engl. J. Med.*; 302: 1092-8.

**Martinez I, Saracho R, Montenegro J, Llach F, 1997.** The importance of dietary calcium and phosphorous in the secondary hyperparathyroidism of patients with early renal failure. *Am. J. Kidney Dis.*; 29 :496-502.

**Maruani G, Hertig A, Paillard M, Houillier P, 2003.** Normocalcemic primary hyperparathyroidism: evidence for a generalized target-tissue resistance to parathyroid hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 88: 4641-8.

**Marx SJ, Simonds WF, Agarwal SK, et al., 2002.** Hyperparathyroidism in hereditary syndromes: special expression and special managements. *J Bone Min Res*; 17 (suppl 2): N37-N43.

**Mazzuoli G, Minisola S, 2002.** Malattie delle paratiroidi. *Trattato di Medicina Interna*. Padova, Piccin; pp. 985-1001.

**Mazzuoli G, Minisola S, Scarnecchia L, et al., 1990.** Two-site assay of intact parathyroid hormone in primary hyperparathyroidism: studies in basal conditions, following adenoma removal and during calcium and EDTA infusion. *Clin. Chim. Acta*; 190 (3): 239-248.

**Melton LJ III, 1991.** Epidemiology of primary hyperparathyroidism. *J. Bone Mineral Res.*; 6 (suppl 2): S25-S30.

**Michal L et al., 2008.** 25-hydroxyl Vitamin D Levels and the Risk of Mortality in the General Population. *Arch. Intern. Med.*; 168(15): 1629-1637.

**Miedlich S, Krohn K, Paschke R, 2003.** Update on genetic and clinical aspects of primary hyperparathyroidism. *Clin. Endocrinol.*; 59: 539-554.

**Miedlich S, Lamesch P et al., 2001.** Frequency of the calcium-sensing receptor variant A986S in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur. J. Endocrinol.*; 145: 421-427.

**M José Bagur, M Antonia Murcia, Antonia M Jiménez-Monreal, Josep A Tur, M Mar Bibiloni, Gonzalo L Alonso and Magdalena Martínez-Tomé, 2017.** Influence of Diet in Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Adv. Nutr.*; 8 (3): 463-472.

**Minisola S, Pacitti MT, Scarda A, et al., 1993.** Serum ionized calcium, parathyroid hormone and related variables: effect of age and sex. *Bone Miner.*; 23 (3): 183-193.

**Misra B, McMahon DJ, Silverberg SJ, Bilezikian JP, 2008.** New data on the impact of renal function on the relationship between 25-hydroxyvitamin D and Parathyroid Hormone. *Program of the 30th Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research*; Montreal, Canada, 2008. p. 1031.

**Morris HA, 2014.** Vitamin D Activities for Health Outcomes. *Ann. Lab. Med.*; 34 (3): 181-6.

**Munns CF, Shaw N, Kiely M, et al., 2016.** Global consensus recommendations on prevention and management of nutritional rickets. *Horm. Res. Paediatr.*; 85 (2): 83-106.

**National Kidney Foundation, 2003.** K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.*; 42: S1-201.

**Naveth-Many T, Silver J, 1990.** Regulation of parathyroid hormone gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia and Vitamin D in the rat. *J. Clin. Invest.*; 86: 1313-9.

**Naveh-Many T, Friedlaender MM, Mayer H, Silver J, 1989.** Calcium regulates parathyroid hormone messenger ribonucleic acid (mRNA), but not calcitonin mRNA in vivo in the rat. Dominant role of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology*; 125 (1): 275-280.

**Nordin BE, Need AG, Morris HA, O'Loughlin PD, Horowitz M, 2004.** Effect of age on calcium absorption in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.*; 80 (4): 998-1002.

**Nussey SS, Whitehead SA, 2001.** *Endocrinology: an integrated approach.* Taylor & Francis, London.

**Ong GS, Walsh JP, Stuckey BG, et al., 2012.** The importance of measuring ionized calcium in characterizing calcium status and diagnosing primary hyperparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 97 (9): 3138-3145.

**Pacifici R, Rifas L, McCracken R, et al., 1989.** Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 86 (7): 2398-2402.

**Pak CYC, Kaplan R, Bone H, Townsend J, Waters O, 1975.** A simple test for the diagnosis of absorptive, resorptive and renal hypercalciurias. *New Eng. J. Med.*; 292: 497-50.

**Palmieri S, Eller-Vainicher C, Cairoli E, Morelli V, Zhukouskaya VV, Verga U, Filopanti M, Vicentini L, Ferrero S, Spada A, Chiodini I, 2015.** Hypercalciuria may persist after successful parathyroid surgery and it is associated with parathyroid hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 100: 2734-2742.

**Paloyan E, Farland M, Pickleman JR, 1969.** Hyperparathyroidism coexisting with hypertension and prolonged thiazide administration. *JAMA*; 210: 1243-5.

**Pearce SHS, Williamson C et al., 1996.** A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutation in the calcium-sensing receptor. *New Engl. Med.*; 335: 1115-1122.

**Pepe J, Romagnoli E, Nofroni I, et al., 2005.** Vitamin D status as the major factor determining the circulating levels of parathyroid hormone: a study in normal subjects, Osteoporos. *Int.*; 16 (7): 805-812.

**Piemonte S, Romagnoli E, Cipriani C, et al., 2009.** The effect of recombinant PTH (1-34) and PTH (1-84) on serum ionized calcium, 1,25-dihydroxyvitamin D, and urinary calcium excretion: a pilot study. *Calcif. Tissue Int.*; 85 (4): 287-292.

**Pilz S et al., 2009.** Vitamin D status and arterial hypertension: A systematic review. *Nature Reviews Cardiology*; 6: 621-630.

**Pollak MR, Brown EM et al., 1993.** Mutation in the human calcium-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell*; 75: 1297-303.

**Pomerantz JM, 2010.** Hyperparathyroidism resulting from lithium treatment remains underrecognized. *Drug Benefit Trends*; vol. 22, pp. 62-63.

**Prentice A, Goldberg GR, Schoenmakers I, 2008.** Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers. *Am. J. Clin. Nutr.*; 88: 500S-506S.

**Quarles LD, 1997.** Cation-sensing receptors in bone: a novel paradigm for regulation bone remodeling?. *J. Bone Miner. Res.*; 12: 1271-4.

**Rao DS, Agarwal G, Talpos GB, et al., 2002.** Role of vitamin D and calcium nutrition in disease expression and parathyroid tumor growth in primary hyperparathyroidism: a global perspective. *J. Bone Miner. Res.*; 17: N75-N80.

**Rao DS, Honasoge M, Divine GW, et al., 2000.** Effect of vitamin D nutrition on parathyroid adenoma weight: pathogenetic and clinical implications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 85 (3): 1054-1058.

**Rasmussen H, 1986.** Calcium messenger system. *N. Engl. J. Med.*; 314: 1094-101.

**Rhead B, Bäärnhielm M, Gianfrancesco M, Mok A, Shao X, Quach H, Shen L, Schaefer C, Link J, Gyllenberg A, Hedström AK, Olsson T, Hillert J, Kockum I, Glymour MM, Alfredsson L, Barcellos LF, 2017.** Mendelian randomization shows a causal effect of low vitamin D on multiple sclerosis risk. *Neurol Genet.*; 2(5): e97.

**Riccardi D, Park JI, Lee WS et al., 1995.** Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 92: 131-135.

**Ritter CS, Brown AJ, 2011.** Suppression of PTH by the vitamin D analog eldecalcitol is modulated by its high affinity for the serum vitamin D-binding protein and resistance to metabolism. *J. Cell. Biochem.*; 112 (5): 1348-1352.

**Romagnoli E, Mascia ML, Cipriani C, et al., 2008.** Short and long-term variations in serum calcitropic hormones after a single very large dose of ergocalciferol (vitamin D<sub>2</sub>) or cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>) in the elderly. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 93 (8): 3015-3020.

**Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB, 2011.** Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. *Dietary Reference Intakes. Washington, D.C: The National Academies Press; 2011.*

**Rossini M, Gatti D, Viapiana O, et al., 2012.** Short-term effects on bone turnover markers of a single high dose of oral vitamin D(3). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 97 (4): E622-E626.

**Sahota O, Munday MK, San P, Godber IM, Hosking DJ, 2006.** Vitamin D insufficiency and the blunted PTH response in established osteoporosis: the role of magnesium deficiency. *Osteoporos. Int.*; 17 (7): 1013-1021.

**Schiavi SC and Kumar R, 2004.** The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int.*; 65: 1-14.

**Scillitani A, Garnieri V et al., 2007.** Primary hyperparathyroidism and the presence of kidney stones are associated with different haplotypes of the calcium sensing receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 92: 277-283.

**Scillitani A, Guarnieri V, Battista C, De Geronimo S, Muscarella LA, Chiodini I, Cignarelli M., Minisola S, Bertoldo F, Francucci CM, Malavolta N, Piovesan A, Mascia ML, Muscarella S, Hendy GN, D'Agruma L, 2004.** Blood ionized calcium is associated with clustered polymorphism in the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 92: 277-283.

**Selby PL, Davies M, Adams JE, Mawer EB, 1999.** Bone loss in celiac disease is related to secondary hyperparathyroidism. *J. Bone Miner. Res.*; 14: 652-7.

**Shah VN, Shah CS, Bhadada SK, Rao DS, 2014.** Effect of 25(OH)D replacements in patients with primary hyperparathyroidism (PHPT) and coexistent vitamin D deficiency on serum 25(OH)D, calcium and PTH levels: a meta-analysis and review of literature. *Clin. Endocrinol.*; 80 (6): 797-803.

**Shapses SA, Lee EJ, Sukumar D, Durazo-Arvizu R, Schneider SH, 2013.** The effect of obesity on the relationship between serum parathyroid hormone and 25-hydroxyvitamin D in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 98 (5): E886-E890.

**Shapses SA, 2014.** No vitamin D threshold for calcium absorption: why does this matter?. *Am. J. Clin. Nutr.*; 99 (3): 429-430.

**Silver J, Naveh-Manly T, Mayer H, Schmelzer HJ, Popovtzer MM, 1986.** Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription in vivo in the rat. *J. Clin. Invest.*; 78 (5): 1296-1301.

**Souberbielle JC, Brazier F, Piketty ML, Cormier C, Minisola S, Cavalier E, 2017.** How the reference values for serum parathyroid hormone concentration are (or should be) established?. *J. Endocrinol. Investig.*; 40 (3): 241-256.



**Souberbielle JC, Massart C, Brailly-Tabard S, et al., 2016.** Serum PTH reference values established by an automated third-generation assay in vitamin D-replete subjects with normal renal function: consequences of diagnosing primary hyperparathyroidism and the classification of dialysis patients. *Eur. J. Endocrinol.*; 174 (3): 315-323.

**Steward AF, Broadus AE, 1987.** Mineral metabolism. In: Felig P., Baxter J.D., Broadus A.E., Frohman L.A., editors. *Endocrinology and Metabolism*. McGraw Hill; New York: 1987. pp. 1317-1453.

**Tanaka Y and Deluca HF, 1973.** The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch. Biochem. Biophys.*; 154: 566-574.

**Tanner SB and Harwell SA, 2015.** More than healthy bones: a review of vitamin D in muscle health. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.*; 7 (4): 152-9.

**Thomas L, Bettoni C, Knopfel T, Hernando N, Biber J, Wagner CA, 2017.** Acute adaption to oral or intravenous phosphate requires parathyroid hormone. *J. Am. Soc. Nephrol.*; 28 (3): 903-914.

**Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT et al., 1998.** Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N. Engl. J. Med.*; 338:777-83.

**Touvier M, Deschasaux M, Montourcy M, et al., 2014.** Interpretation of plasma PTH concentrations according to 25OHD status, gender, age, weight status, and calcium intake: importance of the reference values. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 99 (4): 1196-1203.

**Valcour A, Blocki F, Hawkins DM, Rao SD, 2012.** Effects of age and serum 25-OHvitamin D on serum parathyroid hormone levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 97 (11): 3989-3995.

**Vezzoli G, Alfredo S, Corbetta S, Terranegra A, Dogliotti E, Guarnieri V, Arcidiacono T, Paloschi V, Rainone F, Eller-Vainicher C, Borghi L, Nouvenne A, Guerra A, Meschi T, Allegri F, Cusi D, Spada A, Cole DEC, Hendy GN, Spotti D and Soldati L, 2011.** Polymorphisms at the regulatory regions of the CASR gene influence stone risk in primary hyperparathyroidism. *European Journal of Endocrinology*; 164: 421-427.

**Vezzoli G, Tanini A et al., 2002.** Influence of calcium sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-former patients. *J. Am. Soc. Nephrol.*; 13: 2517- 2523.

**Vieth R, El-Hajj Fuleihan G, 2005.** There is no lower threshold level for parathyroid hormone as 25-hydroxyvitamin D concentrations increase., *J. Endocrinol. Investig.*; 28 (2): 183-00186.

**Walker MD, Dempster DW, McMahon DJ, et al., 2012.** Effect of renal function on skeletal health in primary hyperparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 97: 1501-7.

**Wallace LB, Parikh RT, Ross LV et al., 2011.** The phenotype of primary hyperparathyroidism with normal parathyroid hormone levels: how low can parathyroid hormone go?. *Surgery*; 150 (6): 1102-1112.

**Walser M, 1961.** Interaction between calcium, magnesium, inorganic phosphate, citrate, and protein in normal human plasma. *J. Clin. Investigation*; 40: 723.

**Wang J, Lv S, Chen G, Gao C, He J, Zhong H, Xu Y, 2015.** Meta-analysis of the association between vitamin D and autoimmune thyroid disease. *Nutrients*; 7(4): 2485-98.

**Weisinger JR, Favus MJ, Langman CB, Bushinsky DA, 1989.** Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D, by calcium in the parathyroidectomized, parathyroid-replete rat. *J. Bone Mineral Res.*; 4: 929-435.

**Yamaguchi T, Chattopadhyay N et al., 2001:** Expression of extracellular calcium sensing receptor in human osteoblast MG-63 cell-line. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*; 280: C382-393.

**Yamamoto M, Igarashi T, Muramatsu M, et al., 1989.** Hypocalcemia increases and hypercalcemia decreases the steady state level of parathyroid hormone messenger ribonucleic acid in the rat. *J. Clin. Invest.*; 83: 1053-8.

**Yamauchi M, et al., 2001.** Association of polymorphic alleles of calcium sensing receptor gene with the clinical severity of primary hyperparathyroidism. *Clin. Endocrinol.*; 55: 373-379.

**Yano S, Sugimoto T, et al., 2000.** Association of polymorphic alleles of calcium sensing receptor gene with parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients. *Nephron.*; 85: 317-323.

**Yoshida T, Fujimori T, Nabeshima Y, 2002.** Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1 $\alpha$ -hydroxylase gene. *Endocrinology*; 143: 683–689.

**Young G, Marcus R, Minkoff JR, Kim LY, Segre GV, 1987.** Age-related rise in parathyroid hormone in man: the use of intact and midmolecule antisera to distinguish hormone secretion from retention. *J. Bone Mineral Res.*; 2 (5): 367-374.

**Zadshir A et al., 2005.** The prevalence of hypovitaminosis D among US adults: data from the NHANES III. *Ethn. Dis.*; 15 (4 Suppl 5): S5–97. 101.

**Zaidi M, Adebajo OA, Moonga BS, et al., 1999.** Emerging insights into the role of calcium ions in osteoclast regulation. *J. Bone Miner. Res.*; 14: 669-74.

**Zand L, Kumar R, 2017.** The use of vitamin D metabolites and analogues in the treatment of chronic kidney disease. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.*; 46 (4): 983-1007.

**Zink AR, Panzer S, Fesq-Martin M, Burger-Heinrich E, Wahl J, Nerlich AG, 2001.** Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev.*; Volume 22, n° 4, pp. 477-501.