



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in patologia osteo-oncologica

XXIII ciclo anno 2008

Studio preliminare sull'uso della concentrazione sierica di activina

**nel monitoraggio della terapia con bifosfonati nei pazienti con
metastasi ossee**

Elisabetta Ferraro

Coordinatore

Prof. Giuseppe Tonini

Tutori

Prof. Giuseppe Santini

Prof. Giordano Dicuonzo

16 gennaio 2012

Indice

METASTASI OSSEE	3
Epidemiologia	3
Fisiopatologia	3
Introduzione	3
I fondamentali fattori di metastatizzazione ossea	4
<i>Ricca vascolarizzazione midollare</i>	4
<i>Caratteristiche emodinamiche della circolazione intraossea</i>	5
<i>Plesso venoso di Batson</i>	5
<i>Elevato turnover osseo</i>	5
L'ipotesi del "circolo vizioso"	6
Nicchia metastatica, DTCs/CTCs e nicchia pre-metastatica.....	7
Diagnosi	9
Radiografia tradizionale (RX).....	9
Scintigrafia.....	10
F-18-PET	10
Tomografia computerizzata (TC)	10
Risonanza magnetica (RM).....	10
Biopsia ossea	10
Marcatori.....	10
Quadro clinico	11
Prognosi	13
Terapia	13
GLI AMINO-BIFOSFONATI	15
Introduzione	15
MECCANISMO D'AZIONE	16
Effetti antiproliferativi: apoptosi ed interruzione del ciclo cellulare	16
<i>Apoptosi</i>	17
<i>Perturbazione del ciclo cellulare</i>	17
<i>Effetti anti-invasivi</i>	17
<i>Effetti anti-angiogenetici</i>	18
<i>Effetti immunomodulatori: attivazione dei linfociti T γ/δ</i>	18
Efficacia clinica	19
Tumore della mammella	19
Tumore della prostata ed altre neoplasie.....	19
Eventi avversi ed osteonecrosi della mandibola	20
Fattori predittivi di risposta: i marker di riassorbimento osseo	21
TGF-BETA	22
La superfamiglia dei TGF-beta (fattori di crescita trasformanti-beta)	22
Meccanismo di attivazione dei recettori dei TGF-beta	28

ENDOGLINA E ACTIVINA	31
ENDOGLINA ED ACTIVINA: NUOVI MARKER.....	35
Background	35
Scopo del lavoro	37
Materiali e Metodi	38
Pazienti.....	38
Metodi ed apparecchiature	39
Analisi statistica	39
Risultati	40
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	45
BIBLIOGRAFIA	1

Metastasi ossee

Epidemiologia

L'osso rappresenta la terza sede più comune di metastasi, preceduto solo da polmone e fegato. In Italia è possibile stimare un'incidenza annuale di metastasi ossee di circa 35.000 nuovi casi/anno. Si sta osservando un progressivo aumento di incidenza correlato al fatto che il malato oncologico grazie a terapie più efficaci vive più a lungo.

Circa l'80% delle metastasi scheletriche diagnosticate è sostenuto dai tumori della mammella, della prostata, del polmone, del rene e della tiroide (1). Ad una valutazione autoptica, oltre il 50% dei pazienti per queste patologie presenta evidenza di concomitante localizzazione secondaria ossea (2).

Più frequentemente è interessato lo scheletro assiale: cranio, rachide (soprattutto dorsale), coste e bacino; meno frequentemente sono coinvolte le estremità, in particolare la porzione prossimale del femore e l'omero.

Circa il 25% dei pazienti con metastasi ossee rimane asintomatico, la diagnosi viene fatta con esami eseguiti per altri motivi o durante la stadiazione del tumore primitivo. Nel restante 75% le localizzazioni ossee sono responsabili, dal punto di vista clinico, di dolore e di una serie di complicanze, definite eventi scheletrici correlati (SRE) (3).

Fisiopatologia

Introduzione

Per la formazione di metastasi all'interno del tessuto osseo sono necessarie interazioni reciproche tra le cellule tumorali, le cellule ospiti ed il microambiente, concetto già noto nell'ambito dell'ipotesi del "*seed and soil*" formulata originariamente da Stephen Paget oltre 120 anni fa (4) e riproposta in termini biologici moderni e complessi da vari autori, tra cui Rosandra N. Kaplan (5) e Klaus Pantel (6).

Classicamente si considera che dopo il distacco dal tumore primitivo la cellula neoplastica acceda attraverso neovasi tumorali, tramite molecole di adesione come E-caderina o laminina, alla

circolazione sistemica; si arresti poi a livello dei capillari ossei e fuoriesca dal letto capillare cominciando ad invadere la matrice tissutale (7) [Figura 1].

Perché questo sia possibile la cellula deve disporre di enzimi proteolitici che le permettano di distaccarsi dalla massa tumorale primitiva, deve sopravvivere al sistema immunitario ed agli attriti meccanici nel torrente ematico e deve sviluppare uno specifico profilo recettoriale di membrana che le consenta di aderire nel distretto metastatizzato (8) (9).

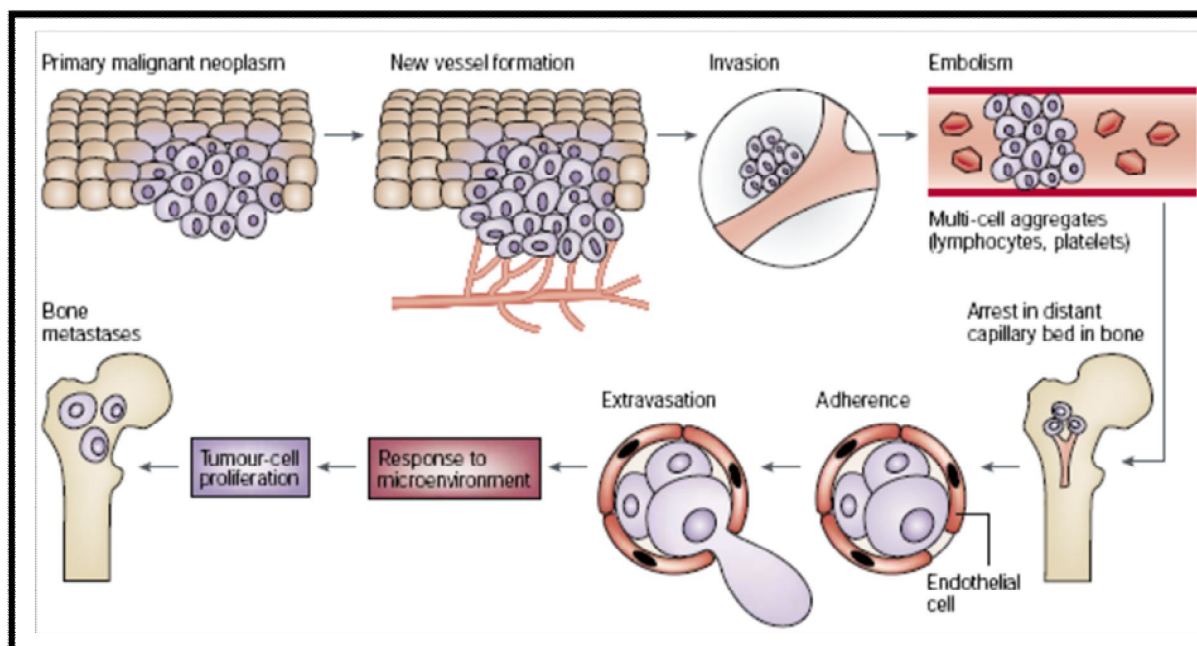


Figura 1: Invasione del tessuto osseo da parte di cellule neoplastiche (10).

I fondamentali fattori di metastatizzazione ossea

È indubbio che lo scheletro rappresenti una sede preferenziale di metastasi per diversi tipi di neoplasie, ma le ragioni di tale dato risultano ancora oggi non del tutto comprese; verranno ora analizzati brevemente i principali fattori causali riconosciuti (11).

Ricca vascolarizzazione midollare

La metastatizzazione all'osso avviene per via ematogena, infatti la distribuzione delle lesioni scheletriche riflette quasi completamente quella del midollo osseo riccamente vascolarizzato: lo scheletro assiale (colonna vertebrale, coste, bacino) è, infatti, sede di più dell'80% delle localizzazioni secondarie.

Caratteristiche emodinamiche della circolazione intraossea

La particolare struttura dei sinusoidi midollari (p.e. la mancanza della membrana basale) fa sì che il flusso ematico midollare sia soggetto a continui arresti ed inversioni di direzione, che facilitano la stasi di circolo e l'impianto delle cellule tumorali.

Plesso venoso di Batson

Il sangue refluo dalla regione mammaria e pelvica può immettersi, oltre che nella vena cava, nella rete venosa perivertebrale consentendo alle cellule neoplastiche di metastatizzare direttamente all'osso by-passando il filtro polmonare (12).

Elevato turnover osseo

La digestione della matrice organica ossea libera localmente una considerevole quantità di fattori chemiotattici, adesivi e stimolanti la crescita della cellula neoplastica (13). Il paziente con carcinoma della mammella o della prostata, le due neoplasie che più frequentemente determinano secondarismi scheletrici, presenta quasi inevitabilmente un turnover osseo molto elevato anche in assenza di metastasi ossee (14). Questo è generalmente l'effetto dell'ipogonadismo indotto dalla terapia ormono-soppressiva con GnRH agonisti, con anti-androgeni ed inibitori dell'aromatasi (15).

Inoltre, le stesse cellule tumorali che raggiungono il tessuto osseo rilasciano una serie di mediatori e di citochine in grado d'interferire col normale turnover osseo (conferendo alla lesione aspetto osteolitico o osteoaddensante) (10). I fattori tramite i quali le cellule maligne inducono riassorbimento osseo sono in gran parte noti e ormai da tempo è emersa ed ha acquistato sempre più valore l'ipotesi del "*circolo vizioso*" (16) [Figura 2].

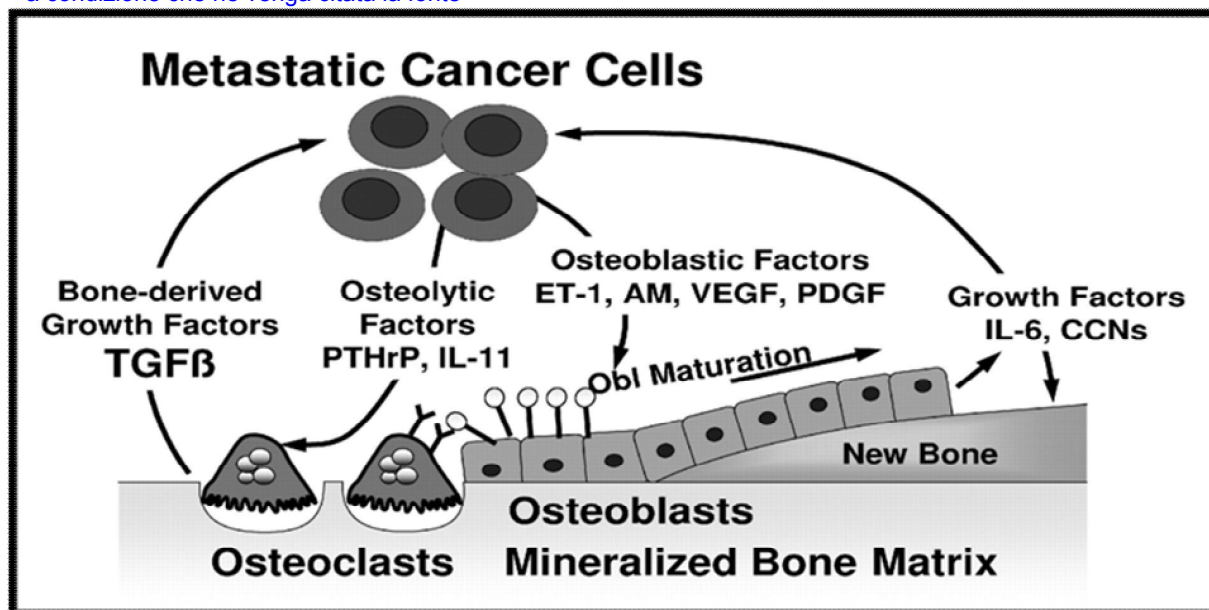


Figura 2: Ipotesi del “circolo vizioso” nell’osteolisi maligna (16).

L’ipotesi del “circolo vizioso”

Il circolo vizioso è costituito da una parte dalle cellule neoplastiche, che rilasciano fattori osteolitici denominati OAF (Osteoclast Activating Factors), tra cui i più importanti sono il peptide analogo al PTH (PTHrP) e l’interleuchina 11 (IL-11), che stimolano il riassorbimento osseo RANKL/RANK-mediato; dall’altra il circolo si autoalimenta tramite la degradazione della matrice ossea da parte degli osteoclasti e delle stesse cellule tumorali, che determina il rilascio di molecole promuoventi la proliferazione delle cellule tumorali, per esempio TGFβ (tissue growth factor beta), BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) e diversi fattori di crescita, tra cui PDGF (Platelet Derived Growth Factor) ed FGF (Fibroblast Growth Factor). Pertanto alla progressione dell’osteolisi corrisponde l’aumento del numero delle cellule che la provocano (16) (17).

L’espressione del PTHrP è aumentata nelle cellule di metastasi ossea da tumore mammario rispetto a quelle prelevate dal tumore primitivo o da metastasi extrascheletriche. Tale dato conferma l’ipotesi del PTHrP come mediatore principale del riassorbimento osseo metastatico e pone nuovi interrogativi, infatti la differenza tra metastasi e tumore primitivo lascia supporre o che le cellule neoplastiche con up-regolazione del PTHrP abbiano un particolare tropismo per l’osso o che sia il microambiente osseo stesso ad indurre un incremento dell’espressione del PTHrP nelle cellule che vi si sono stabilite (18).

I recenti studi sull'asse RANK/RANKL/OPG hanno aperto un nuovo capitolo nell'ambito della fisiopatologia delle metastasi ossee: è infatti emerso che diverse linee di cellule tumorali esprimono RANK (19); in particolare una up-regolazione di tale recettore è stata dimostrata nelle cellule tumorali derivate da metastasi ossee di tumore mammario (20), tumore prostatico (21) (22) e melanoma (19) nonché da focolai osteolitici di mieloma multiplo (23). Tale osservazione ha portato a chiedersi se la spiccata tendenza di alcuni tumori a dare metastasi scheletriche non sia l'effetto dell'azione chemiotattica di RANKL, la cui concentrazione a livello osseo è assai elevata, nei confronti del suo recettore. Questa ipotesi è stata confermata dagli studi di Jones (19), il quale ha dimostrato il ruolo di RANKL nell'indurre la migrazione delle cellule tumorali positive per RANK. La teoria del "circolo vizioso" acquista ancora più forza perché l'iperespressione di RANKL a livello dei focolai osteolitici tumorali sarebbe in grado di promuovere ulteriormente l'invasività ossea della neoplasia favorendo lo sviluppo di nuove metastasi (24).

All'estremo opposto rispetto all'osteolisi maligna si colloca l'abnorme apposizione di matrice che si rileva nelle metastasi osteodensanti caratteristiche dell'adenocarcinoma prostatico. La patogenesi di tali lesioni è ancora poco chiara; verosimilmente sono coinvolti fattori secreti dalla neoplasia in grado di determinare iperattivazione osteoblastica. Sono stati chiamati in causa numerosi fattori di crescita, tra cui TGF β e FGF, la cui iperespressione nelle cellule tumorali prostatiche è stata ampiamente dimostrata, e la proteasi uPA che, con meccanismo proteolitico, sarebbe capace di attivare una serie di mediatori ad effetto anabolico e di degradare il PTHrP (10).

Nicchia metastatica, DTCs/CTCs e nicchia pre-metastatica

Nell'ambito dello studio dei fenomeni che portano una neoplasia solida alla metastatizzazione, sempre più importanza ha acquisito il concetto di "nicchia": con questo termine si intende uno specifico microambiente tissutale – determinato dall'interazione di caratteristiche primitive dell'ospite con altre secondariamente acquisite – che favorisce il *seeding* di cellule neoplastiche, ne influenza l'attività metabolica, la tendenza alla divisione cellulare e la sensibilità a trattamenti chemioterapici (25).

Il midollo osseo rappresenta la principale nicchia metastatica: le cellule neoplastiche infatti competono con le cellule staminali ematopoietiche midollari a livello della nicchia midollare, interagendo in maniera stretta con cellule endoteliali e di derivazione midollare nella costituzione della nicchia stessa (26).

Il ruolo fisiopatologico, diagnostico, prognostico e predittivo di queste micrometastasi midollari, o cellule tumorali disseminate (disseminated tumor cells, DTCs), è oggi tra i più rilevanti argomenti di ricerca traslazionale; in particolar modo sembra promettente l'analisi comparata di DTCs e di cellule tumorali circolanti (circulating tumor cells, CTCs) nel prelievo di sangue periferico (27).

Ulteriore conferma di quanto l'ambiente del midollo osseo sia fondamentale nel processo di metastatizzazione è data dall'ipotesi della "nicchia pre-metastatica": cellule progenitrici ematopoietiche (HPCs) di derivazione midollare, verosimilmente in risposta a fattori solubili chemiotattici prodotti dal tumore primitivo o dalle DTCs, si mobilizzano dal midollo osseo per ricreare una nicchia con caratteristiche simili a quelle midollari in uno specifico organo periferico, che sarà target della successiva localizzazione neoplastica da parte di cellule tumorali metastatiche (MTCs) prima e di cellule progenitrici endoteliali (EPCs) poi (5) (28).

Si ripropone in termini biologici complessi l'ipotesi del "seed and soil", in cui il "soil" non dipende però meramente da caratteristiche anatomiche/fisiologiche dell'ospite (p.e. fenestrazione capillare, velocità di flusso sanguigno), ma dalla risposta dell'organismo ad elementi di novità (p.e. citochine, fattori chemiotattici, ormoni) introdotti dalla stessa neoplasia (29) **[Figura 3]**.

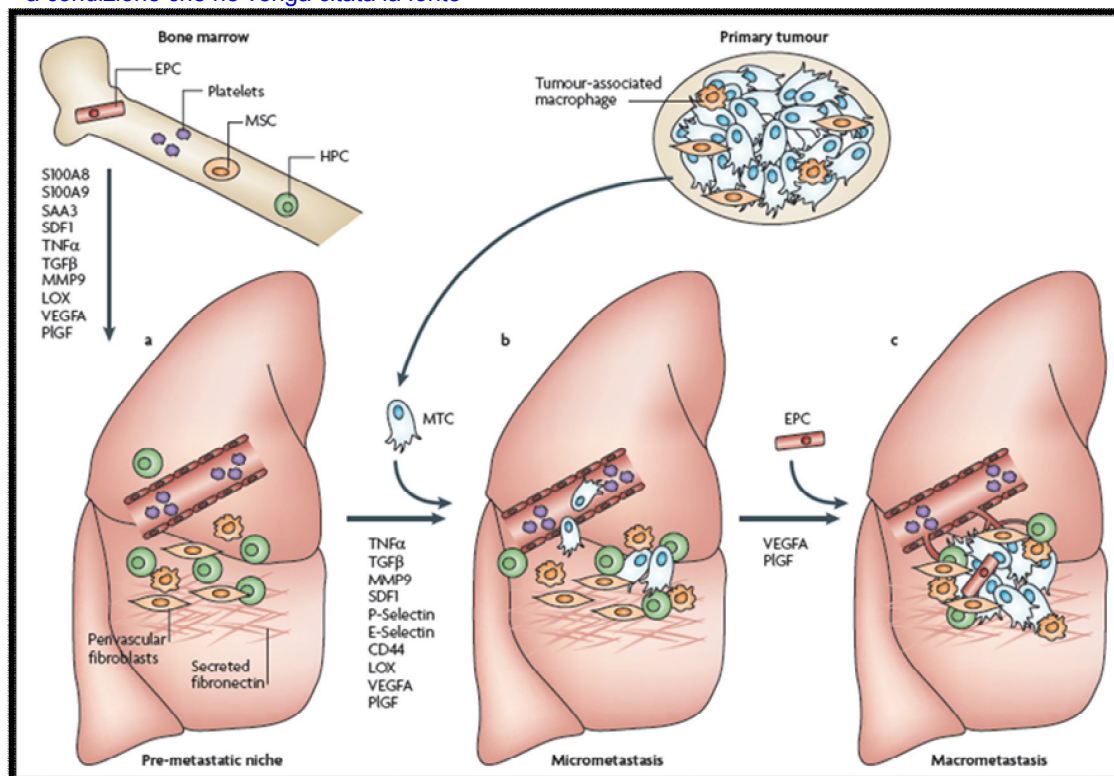


Figura 3: Modello di evoluzione della nicchia metastatica (29).

Diagnosi

Le metastasi ossee vengono diagnosticate in corso di esami eseguiti per altri motivi oppure durante la stadiazione o il follow up del tumore primitivo.

Radiografia tradizionale (RX)

Individua solo lesioni ossee grossolane (deve esserci una perdita di massa ossea almeno del 40%) ma consente già di classificare le metastasi ossee in osteolitiche e osteoaddensanti. Le metastasi ossee **osteolitiche** sono le più frequenti (80% del totale) ed hanno una prognosi peggiore, appaiono come aree focali più radiotrasparenti rispetto all'osso circostante. Quelle **osteoaddensanti**, invece, sono più rare e associate a prognosi meno severa; sono dovute essenzialmente a neoplasia prostatica sebbene anche il tumore della mammella, pur essendo più spesso associato a secondarismi osteolitici, possa causarle; si visualizzano come focolai di aumentata opacità rispetto al tessuto adiacente.

Scintigrafia

È il test più sensibile per la diagnosi di lesioni ossee: per la positività scintigrafica è sufficiente una variazione della densità ossea del 5-10%. Si basa sulla somministrazione di MDP (Metilen-Di-Fosfonato) marcato con radiotecnecio: tale sostanza, essendo calcio-mimetica, viene captata in tutte le aree di aumentato metabolismo osseo. È un'indagine funzionale, pertanto è molto sensibile, ma al tempo stesso estremamente aspecifica perché anche focolai infettivo-infiammatori (artrite, osteomielite, Paget, fratture) possono determinare iperfissazione del tracciante.

F-18-PET

È un'esame introdotto di recente nello studio delle metastasi ossee, utilizza come radiotracciante fluoro-desossi-glucosio marcato con Fluoro 18 ed ha mostrato notevole accuratezza nella rilevazione di metastasi ossee anche di piccole dimensioni.

Tomografia computerizzata (TC)

Più accurata rispetto alla radiografia tradizionale, in quanto permette di definire in modo più preciso il tipo di metastasi: litica, addensante o mista. Ha comunque un impatto limitato nello studio delle metastasi ossee, sia perché è meno sensibile rispetto alla scintigrafia ed alla risonanza magnetica, sia perché non consente uno studio dello scheletro in toto.

Risonanza magnetica (RM)

Esame molto utile per l'elevata sensibilità e per la possibilità di valutare dettagliatamente le lesioni della colonna in termini di estensione e di rapporti con le strutture adiacenti (midollo spinale e radici dei nervose).

Biopsia ossea

Esame dirimente in caso di mancato riscontro del tumore primitivo o di metastasi ossee "tardive", scoperte cioè a più di dieci anni di distanza dalla diagnosi del tumore primitivo.

Marcatori

I marcatori biochimici sono meno sensibili e meno specifici delle indagini radiologiche, ma sono comunque degli indicatori del turnover osseo. L'isoforma ossea della fosfatasi alcalina (BAP) e il

telo peptide N-terminale del collagene di tipo I dosato nelle urine (u-NTX) sono i più importanti marcatori dell'attività rispettivamente osteoblastica ed osteoclastica.

Quadro clinico

Il 25% dei pazienti affetti da metastasi ossee è completamente asintomatico. Nel restante 75% le localizzazioni ossee causano:

- **dolore:** presente in oltre il 50% dei casi, è un dolore persistente, profondo, localizzato, che peggiora durante le ore notturne. Può essere determinato da più componenti: ossea, neuropatica e/o viscerale. Ha conseguenze importanti sulla vita del paziente perché ne compromette produttività e stato psichico (30).
- manifestazioni cliniche legate ad una serie di complicanze note come *eventi scheletrici correlati (SRE)*
 1. frattura patologica: può avvenire senza alcun trauma o per piccole sollecitazioni meccaniche, causa dolore di grado severo e prolungata immobilità e comporta una serie di sequele fra cui l'invalidità progressiva e, più raramente, tumefazioni e disturbi neurologici. Il femore e l'omero sono frequenti sedi di fratture perché più esposti a carico e sollecitazioni meccaniche. Le lesioni osteolitiche e quelle che interessano più dei due terzi del diametro dell'osso predispongono quest'ultimo a maggior rischio di frattura (31).
 2. compressione midollare: la compressione del midollo spinale o della cauda equina è un'emergenza medica, che richiede un'immediata diagnosi e trattamento. È dovuta alla pressione meccanica esercitata dalla metastasi, che, in base all'ubicazione, si definisce epidurale o intradurale. Il midollo più colpito è quello dorsale, seguito dal lombare e dal cervicale. I tumori che sviluppano compressioni midollari sono, in ordine decrescente di frequenza, quelli della mammella, del polmone, della prostata e del rene. Nelle metastasi epidurali il dolore posteriore (back pain) è il sintomo comune di esordio. Di solito, successivamente al dolore compaiono i segni tipici della mielopatia, quali deficit sensitivi (parestesia), disturbi motori (dall'astenia alla paraplegia/tetraplegia) e alterazioni del sistema nervoso autonomo (ritenzione urinaria, stipsi, impotenza). La prognosi dei pazienti con compressione midollare è generalmente infausta. Sono stati individuati alcuni possibili fattori prognostici: precocità della diagnosi e del successivo approccio terapeutico multidisciplinare alla sindrome complessiva; esordio della stessa in rapporto alla diagnosi del tumore

primitivo; condizione motoria prima e dopo il trattamento; coinvolgimento di un'unica vertebra anziché di più metameri (32).

3. ipercalcemia: è la più comune emergenza metabolica associata a tumore. S'instaura per la produzione da parte delle cellule tumorali del PTHrP, che è in grado di attivare i recettori per il PTH sia a livello osseo sia a livello renale. Le neoplasie più frequentemente correlate a ipercalcemia sono il carcinoma del polmone, della mammella, il mieloma, le neoplasie del distretto cervico-facciale, del rene e della prostata (33). La gravità del quadro clinico è legata più alla velocità di aumento del calcio ionizzato che al grado di elevazione, alle condizioni generali del paziente, e alle malattie intercorrenti. In base alla sintomatologia possiamo distinguere diversi stadi di ipercalcemia: *lieve*: nausea, perdita di peso, stipsi ed alterazione dello stato mentale; *moderata*: insufficienza renale e deposizione di calcio in vari organi e tessuti; *severa*: emergenza medica che richiede un trattamento aggressivo immediato (nausea, vomito profuso, disidratazione, insufficienza renale, obnubilamento del sensorio e perdita di coscienza); *molto severa con imminente pericolo di vita* (s'instaura a livelli ematici di calcio >14,8 mg/dL): coma ed arresto cardiaco.
4. soppressione midollare: pancitopenia, in genere più marcata per le piastrine e per i globuli rossi che per i leucociti, dovuta a invasione neoplastica del midollo osseo.

Secondo le più recenti linee guida internazionali sono compresi tra gli SRE anche le misure interventistiche che possono essere adottate per il trattamento o la prevenzione delle complicanze delle metastasi ossee:

5. radioterapia su un segmento osseo: rappresenta un'arma terapeutica fondamentale per il trattamento sintomatico del dolore e la prevenzione e la terapia sia delle fratture patologiche sia delle sindromi da compressione midollare.
6. chirurgia ortopedica: per evitare un crollo vertebrale o dare struttura all'osso danneggiato dalla metastasi vengono impiantati chirurgicamente aste metalliche, piastre, viti, fili metallici, chiodi o perni.

La frequenza degli eventi scheletrici dipende dalla natura osteolitica od osteoaddensante delle lesioni ossee, dalla loro sede e numero, dalla gestione e dal trattamento delle complicanze stesse (3) (34).

Gli eventi scheletrici e il dolore hanno dimostrato in diversi studi di peggiorare in maniera significativa la qualità di vita del paziente, riducendone l'autonomia funzionale e peggiorando lo stato psico-emozionale dello stesso. Inoltre sono ormai chiare le evidenze cliniche di una correlazione diretta tra eventi scheletrici ed incremento della mortalità nel tumore della mammella, della prostata, del polmone e nel mieloma multiplo. Infine la gestione del paziente con metastasi ossee e delle sue complicanze rappresenta un problema centrale anche da un punto di vista della spesa sanitaria (35).

Prognosi

Strettamente dipendente da: tipo di tumore primitivo [Tabella 1], numero e sede delle metastasi ossee, presenza di metastasi extrascheletriche e condizioni generali del paziente.

<i>TUMORE PRIMITIVO</i>	<i>SOPRAVVIVENZA MEDIANA</i>
<i>Polmone</i>	<i>3 mesi</i>
<i>Mammella</i>	<i>24 mesi</i>
<i>Prostata</i>	<i>40 mesi</i>

Tabella 1: Sopravvivenza mediana di pazienti con malattia metastatica ossea in base al tumore primitivo (34).

Terapia

Attualmente gli *ammino-bifosfonati* rappresentano la principale e più diffusa arma terapeutica nel trattamento delle metastasi ossee: inibiscono la formazione, l'aggregazione e la dissoluzione dei cristalli di calcio fosfato; hanno inoltre un'elevata affinità per la matrice mineralizzata e sono in grado di inibire l'erosione ossea da parte degli osteoclasti. È quest'ultimo effetto biologico a costituire il razionale dell'impiego di tali composti nelle condizioni cliniche caratterizzate dall'aumento dei processi di riassorbimento osseo, come il morbo di Paget, l'ipercalcemia maligna, le metastasi osteolitiche, il mieloma multiplo, la perdita ossea indotta da corticosteroidi, l'iperparatiroidismo primitivo e secondario e l'osteoporosi ad alto turn-over (36) (37).

Gli ammino-bifosfonati si sono rivelati efficaci nel ridurre l'incidenza di SREs in corso di malattia metastatica in un'ampia tipologia di tumori solidi e non (38) (39), tali farmaci hanno dimostrato anche un significativo effetto nel ridurre il dolore da metastasi ossea (40).

Recentemente il *denosumab*, un anticorpo monoclonale contro RANKL, si è rivelato superiore in termini di efficacia rispetto agli amino-bifosfonati (41) nel trattamento delle metastasi ossee da

tumore della mammella (42), della prostata ormono-resistente (43), e in neoplasie solide avanzate (esclusi tumori di mammella e prostata) o mieloma multiplo (44).

Inoltre, la specifica modalità di somministrazione del denosumab (sottocute, ogni 4 settimane) e la non necessità di un monitoraggio della funzione renale rendono il farmaco generalmente molto ben tollerato dai pazienti.

Tutte le altre misure di norma adottate nel trattamento del paziente con metastasi ossee vanno considerate “sintomatiche” e includono analgesici e oppiacei per il controllo del dolore, radioterapia, interventi ortopedici più o meno invasivi (dall'utilizzo di busti e protesi alla chirurgia).

Gli amino-bifosfonati

Introduzione

I bifosfonati (BPs) sono farmaci costituiti da due gruppi fosfato uniti ad un atomo di carbonio a sua volta legato a due catene laterali designate come R¹ ed R² (45) [Figura 4].

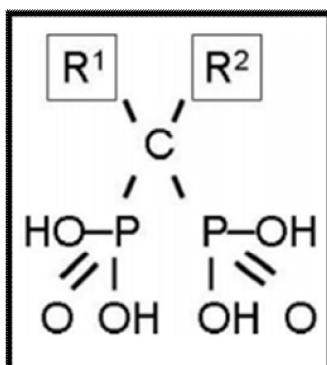


Figura 4: Struttura chimica dei bifosfonati

La struttura P-C-P conferisce a questi farmaci una elevata avidità per i cristalli di idrossiapatite di cui è costituito l'osso, in particolare nei siti in cui c'è attivo rimodellamento osseo.

Gli amino-bifosfonati (NBPs) sono una sottocategoria di bifosfonati distinti dai non-amino-BPs per struttura chimica, meccanismo d'azione ed efficacia clinica: chimicamente, gli NBPs sono caratterizzati dalla presenza, in una delle due catene laterali, di un atomo di azoto; per quanto riguarda il meccanismo d'azione cellulare, i non-amino-BPs determinano l'apoptosi osteoclastica tramite metabolizzazione in composti non funzionali che competono con l'adenosin trifosfato (ATP) nel metabolismo energetico cellulare (46), mentre la principale azione degli NBPs è l'inibizione a livello osteoclastico dell'enzima farnesil-pirofosfato sintetasi (FPPS) (47); clinicamente gli NBPs si caratterizzano per una per una maggiore efficacia terapeutica anti-riassorbimento osseo rispetto ai non-amino-BPs.

Gli NBPs più utilizzati in clinica sono, in termini decrescenti di affinità ossea, lo *zoledronato* (ZOL), l'*alendronato* (ALE) e l'*ibandronato* (IBA).

Meccanismo d'azione

Gli NBPs sono potenti inibitori della FPPS: da questa inibizione enzimatica ne consegue una importante riduzione nella sintesi sia dei residui lipidi farnesilici che geranylgeranilici e pertanto della isoprenilazione post-traduzionale delle proteine (48). Le principali proteine farnesilate il cui ruolo cellulare è da tempo noto sono le GTPasi H-, K- e N-Ras, tra le proteine geranylgeranilate ricordiamo RhoA, RhoC, Rac1, Rab ed R-Ras (49).

A livello dell'osteoclasta immaturo gli NBPs determinano l'inibizione della maturazione in osteoclasta maturo, in quest'ultimo invece la conseguenza dell'inibizione dell'isoprenilazione è l'apoptosi, da cui deriva una significativa riduzione dell'attività osteolitica fisiologica e/o patologica (50) (51).

Recenti evidenze confermano come gli NBPs siano in grado di esercitare la loro azione anche a livello di cellule tumorali umane, dove l'inibizione della FPPS porta allo spegnimento di altri importanti pathway di trasduzione del segnale che regolano le capacità proliferative, di invasione e l'attività pro-angiogenetica delle cellule tumorali stesse (52) (53).

Infatti, l'aggiunta di residui lipidi alle piccole proteine che legano il GTP è essenziale per la loro localizzazione sul versante interno della membrana plasmatica e per la loro conseguente attivazione a seguito di segnali esterni (54).

Altri target indiretti degli NBPs non sono ancora noti, ma noti sono gli effetti della loro inibizione, che verranno ora trattati *in extenso* (55).

Effetti antiproliferativi: apoptosi ed interruzione del ciclo cellulare

Data l'importanza delle proteine Ras nella regolazione del ciclo cellulare di diverse cellule tumorali in vitro ed in vivo, la maggior parte degli studi finalizzati alla dimostrazione degli effetti antiproliferativi diretti degli NBPs ha preso in considerazione le proteine Ras. Sono stati finora descritti due meccanismi di inibizione della crescita tumorale indotta da NBP: apoptosi e perturbazione del ciclo cellulare.

Apoptosi

Recentemente è dimostrato in vitro che gli NBPs inducono apoptosi ed inibizione della crescita di cellule tumorali epidermoidi umane tramite depressione dei segnali di diversi pathway di sopravvivenza.

Sembra che gli NBPs inducano il rilascio del citocromo C, che a sua volta attiva le caspasi, attraverso la modulazione di Bcl-2, importante proteina regolatoria antiapoptotica (53).

Dato importante è che l'effetto antiproliferativo dello ZOL sembra essere indipendente da mutazioni di p53, evento frequente in caso di cellule tumorali (56).

Una prima importante dimostrazione che l'apoptosi indotta da NBPs possa essere dipendente dall'inibizione della geranilgeranilazione di Ras è stata fornita per la prima volta da Senaratne e colleghi (53) e confermata da altri gruppi (57). L'apoptosi era completamente antagonizzata dall'aggiunta di un inibitore pan-caspasi o dal geranil-geranolo, che riattiva il processo di geranilgeranilazione.

D'altra parte, altri dati puntano su un effetto antiproliferativo da parte degli NBPs Ras-indipendente: questo effetto si esplicherebbero tramite l'attivazione di caspasi (tra cui Mst1, *mammalian sterile 20-like kinase 1*) associate ad apoptosi (58) ed altri substrati non noti, e sarebbe indipendente dal blocco della geranilgeranilazione (59).

Perturbazione del ciclo cellulare

Un altro modo per indurre inibizione della crescita cellulare è la perturbazione del ciclo cellulare. A tal proposito, evidenze sono state raccolte sia su cheratinociti normali (60), che su linee cellulari di tumore della prostata trattate con ZOL e che già 2 giorni dopo l'inizio del trattamento presentavano un accumulo di cellule in fase G1 (61).

Questi rilievi non fanno altro che confermare la possibile presenza di nuovi target per gli NBPs responsabili dell'effetto complessivo di inibizione della crescita cellulare.

Effetti anti-invasivi

I meccanismi che determinano l'effetto anti-invasivo degli NBs, soprattutto del più potente ZOL, non sono ancora del tutto chiariti: secondo alcuni autori questi effetti sono dovuti all'inibizione di metalloproteasi (p.e. MMP7) (62) e si associano anche a riduzione del fattore di crescita endoteliale

vascolare (VEGF) e del fattore stimolante le colonie granulocitiche e monocitiche (GM-CSF); altri sostengono che l'effetto anti-invasivo a concentrazioni farmacologicamente attive in linee cellulari di tumore della mammella derivi invece dalla riduzione indotta dell'espressione cellulare indotta dallo ZOL del recettore dell'attivatore del plasminogeno tipo urokinasi (uPAR) (63), ligando della vitronectina, comune costituente proteica del microambiente osseo (64), che si tradurrebbe biologicamente in una riduzione della capacità di adesione all'osso da parte delle cellule tumorali.

Diversi studi in vitro eseguiti tramite ripristino selettivo di geranilgeranilazione e farnesilazione dopo inibizione con ZOL sembrano confermare l'ipotesi che l'effetto anti-invasivo dello ZOL dipenda in massima parte dal blocco della geranilgeranilazione, in particolare dall'inibizione del segnale di RhoA (65) (66).

Denoyelle e colleghi hanno inoltre riportato che ZOL inibisce anche l'effetto chemiotattico indotto dalla chemochina SDF-1 su una linea di cellule tumorali della mammella (67), ulteriormente confermando il ruolo anti-invasivo già noto.

Effetti anti-angiogenetici

Studi sia in vitro con cellule endoteliali di vena ombelicale umana (HUVECs) che in vivo con modelli murini hanno dimostrato che gli NBPs (soprattutto ZOL ed IBA) hanno effetti anti-angiogenetici (68) (69) (70).

Gli effetti inibitori degli NBPs sull'adesione e migrazione delle cellule endoteliali sembra in parte legato alla modulazione delle integrine (p.e. $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$) (71), in parte dalla sensibilizzazione delle cellule all'apoptosi indotta dal TNF (72) ed in parte dalla diminuzione dei livelli sierici di fattori pro-angiogenetici in pazienti affetti da neoplasia solida (73) (74).

Effetti immunomodulatori: attivazione dei linfociti T γ/δ

I linfociti T γ/δ sono cellule del sistema immunitario che riconoscono antigeni non proteici in maniera MHC-indipendente (75). Questa particolare categoria di linfociti ha una spiccata azione antitumorale, oltre che contro gli agenti infettivi, soprattutto virali (76).

Recenti evidenze hanno dimostrato che una particolare sottopopolazione, i linfociti T $\gamma\delta 2$, si espandono ex vivo dopo stimolazione con fosfoantigeni, compresi quelli derivanti dal pathway degli isoprenoidi (77).

Gli NBPs, tramite l'inibizione del pathway del mevalonato, causano un accumulo nelle cellule bersaglio di questi fosfoantigeni (78).

Conseguenza di questo accumulo, è la stimolazione dell'immunogenicità delle cellule tumorali in cui gli NBPs agiscono, che risultano essere pertanto target più facile per i linfociti T V γ 9V δ 2. Diversi studi clinici stanno investigando lo ZOL come agente immunoterapico in combinazione con altri farmaci immunoterapici (p.e. IL-2) in pazienti affetti da neoplasie metastatiche per cui non esistono linee terapeutiche standard (79) (80) (81) (82).

Efficacia clinica

Le complicanze scheletriche da metastasi ossee rimangono un importante problema di salute in pazienti affetti da neoplasie in stadio avanzato. I BPs conferiscono benefici significativi in pazienti con metastasi ossee riducendo sia le complicanze scheletriche che il dolore.

I benefici clinici della terapia con BPs sono stati valutati in numerosi trial disegnati per l'analisi delle complicanze scheletriche. La maggior parte di questi trial ha utilizzato principalmente l'end-point composito costituito dagli SREs. Tra i diversi end-point la *Food and Drug Administration* ha suggerito che il tempo al primo SRE è l'end-point da preferire (83), sebbene in tal modo possano perdersi informazioni clinicamente rilevanti.

Tumore della mammella

In pazienti con metastasi ossee da tumore della mammella avanzato, diversi BPs – tra cui PAM, IBA e ZOL – hanno dimostrato benefici clinici significativi rispetto al placebo (84) (85). In questo setting, 4 mg in infusioni di 15 minuti ogni 4 settimane di ZOL si è dimostrato essere significativamente più efficace di PAM (86), pertanto ZOL è stato a lungo lo standard in pazienti con tumore della mammella e metastasi ossee.

Tumore della prostata ed altre neoplasie

In pazienti con tumore della prostata, del polmone ed altri tumori solidi, la situazione è abbastanza differente, in quanto in queste neoplasie soltanto ZOL ha dimostrato benefici clinici significativi.

Un primo trial multicentrico randomizzato con controllo placebo ha dimostrato che ZOL (4 mg in infusioni di 15 minuti ogni 3 settimane) riduce in maniera statisticamente significati l'incidenza

di SREs e si associa a sostenuta palliazione del dolore osseo in pazienti con metastasi ossee da tumore della prostata ormono-resistente (87).

L'efficacia di ZOL in presenza di metastasi ossee da altre neoplasie è confermata inoltre soprattutto in caso di tumori del polmone non a piccole cellule (NSCLC) (88) e di carcinoma renale (89).

Da questi dati ne consegue che, a prescindere dal tipo di neoplasia, ZOL è sempre stato associato ad una riduzione significativa in SREs sia rispetto a placebo che rispetto a PAM ed altri BPs; inoltre, il profilo globale di sicurezza di ZOL è comparabile con quello degli altri BPs (90).

Eventi avversi ed osteonecrosi della mandibola

BPs somministrati oralmente possono irritare la mucosa esofagea e dovrebbero essere evitati in pazienti che non possono mantenere la postura eretta, che hanno sintomi attivi del sistema gastrointestinale superiore, o che hanno ritardato svuotamento esofageo (p.e. acalasia o stenosi).

Fino ad un terzo dei pazienti che ricevono infusioni endovena o dosi orali mensili di NBPs presentano reazioni di fase acuta (febbre, mialgia, linfopenia, astenia) (91) (92), ma queste solo raramente si ripresentano con somministrazioni ripetute.

L'ipocalcemia è un possibile evento avverso, ma di solito è lieve e non clinicamente riconosciuta, più frequente in caso di somministrazione endovena rapida; rara, ma descritta, è l'irite, associata anch'essa maggiormente con gli NBPs somministrati per via endovena rapidamente (93).

Data la via d'escrezione renale, particolare attenzione dovrebbe essere posta in soggetti con ridotta clearance della creatinina che devono assumere BPs. L'uso di BPs non è raccomandato per pazienti la cui clearance sia inferiore a 30-35 ml/min (94).

Complicanza potenzialmente più grave è rappresentata dall'osteonecrosi della mandibola (ONJ). Il primo report che segnalava una ONJ da BPs risale al 2003 (95). A questo iniziale report ne sono seguiti altri e l'argomento è stato oggetto di analisi estesa da parte di una task force della *American Society for Bone and Mineral Research* (96). Il clamore suscitato in un primo momento ha portato alla sospensione dei trattamenti con BPs, nonostante l'alto rischio di fratture ed il basso rischio di ONJ.

L'ONJ si definisce come presenza di osso esposto necrotico nella regione maxillofaciale che non guarisce dopo 6-8 settimane in pazienti senza storia di irraggiamento craniofaciale (96). All'obiettività, l'ONJ appare come un'area esposta di osso bianco-giallastro. Possibili segni sono dolore, edema, parestesie, ulcerazioni dei tessuti molli (97).

L'ONJ in pazienti che fanno terapia con BPs segue spesso procedure odontoiatriche, ed una adeguata profilassi primaria ha ridotto significativamente l'incidenza di questa grave complicanza.

I possibili meccanismi coinvolti nell'ONJ da bifosfonati potrebbero essere la soppressione del turnover osseo (con deficit di rimozione del tessuto necrotico da parte degli osteoclasti), sbilancio tra osteoblasti ed osteoclasti con conseguente osteopetrosi, inibizione della funzione dei linfociti T, inibizione dell'angiogenesi ed altri ancora.

Fattori predittivi di risposta: i marker di riassorbimento osseo

Coleman e colleghi (98) hanno studiato la correlazione tra metabolismo osseo ed outcome clinico durante la terapia con BPs. Analizzando quantitativamente l'N-telopeptide urinario (u-Ntx) di 1824 pazienti trattati con BPs, hanno dimostrato che i livelli di u-Ntx correlano con il rischio di complicanze scheletriche e progressione di malattia e, inoltre, che alti livelli di u-Ntx sono associati ad un aumento di rischio di morte di 4-6 volte.

Il marker di riassorbimento osseo u-Ntx può pertanto essere utile per fornire corrette informazioni prognostiche in pazienti con metastasi ossee che effettuano terapia con BPs, e potrebbe essere utile per selezionare pazienti che beneficeranno maggiormente della terapia con BPs.

Risultati simili sono stati ottenuti anche con altri più recenti marker di riassorbimento osseo, per esempio il PINP (propeptide del procollagene del collagene di tipo I) ed il ICTP (telopeptide C terminale del collagene di tipo I) (99).

TGF-beta

La superfamiglia dei TGF-beta comprende un grande numero di ligandi collegati strutturalmente che giocano un ruolo chiave nella progressione del ciclo cellulare. Un TGF-beta inizia la trasmissione del segnale (signaling) legandosi a recettori serina/treonina chinasi di tipo I e di tipo II presenti sulla superficie cellulare. In seguito a tale binding, c'è un avvicinamento dei recettori che permette al recettore di tipo II di fosforilare il dominio intracellulare del recettore di tipo I, che poi propaga il segnale attraverso la fosforilazione delle proteine Smad intracellulari. Si forma, quindi, un complesso di proteine Smad che viene traslocato nel nucleo dove va a regolare la trascrizione dei geni target dei TGF-beta. Poiché la superfamiglia dei TGF-beta interviene nella crescita e proliferazione cellulare, molti dei suoi membri sono over-espressi, o il loro normale meccanismo è mal regolato, nei casi di crescita anomale di cellule quali i tumori.

La superfamiglia dei TGF-beta (fattori di crescita trasformanti-beta)

Il TGF-beta originariamente scoperto come mitogeno, fu successivamente identificato come il prototipo di una vasta e diversificata superfamiglia di molecole segnale. La superfamiglia dei fattori di crescita trasformanti-beta (Transforming Growth Factors-beta, TGF-beta) comprende un grande numero di proteine collegate strutturalmente che giocano un ruolo importante in diversi processi cellulari, quali la progressione del ciclo cellulare, la differenziazione cellulare, la funzione riproduttiva, lo sviluppo, la motilità, l'adesione, la crescita neuronale, la morfogenesi dell'osso, la cicatrizzazione delle ferite. (100-104) Questo ruolo è molto diversificato a seconda dei tessuti in cui vengono secreti e delle quantità in cui sono espressi; in alcuni casi possono anche agire da potenti inibitori della crescita come è stato osservato in una varietà di cellule epiteliali, endoteliali e linfoidi. (105-112)

Un TGF-beta inizia la trasmissione del segnale (signaling) legandosi a recettori serina/treonina chinasi di tipo I e di tipo II presenti sulla superficie cellulare. In seguito a tale binding, c'è un avvicinamento dei recettori che permette al recettore di tipo II di fosforilare il dominio intracellulare del recettore di tipo I, che poi propaga il segnale attraverso la fosforilazione delle proteine Smad intracellulari. Si forma, quindi, un complesso di proteine Smad che viene traslocato nel nucleo dove regola la trascrizione dei geni target dei TGF-beta. **[Figura 5]**.

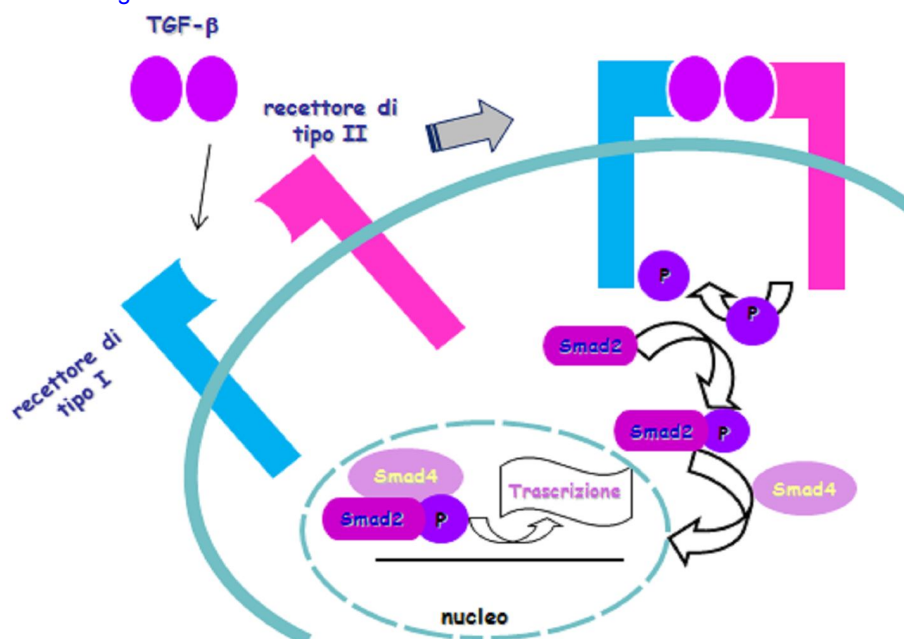


Figura 5: Pathway di trasduzione del segnale dei TGF-beta

Poiché il signaling dei TGF-beta è coinvolto nella crescita cellulare, la disfunzione di questo percorso contribuisce nella tumorigenesi. Mutazioni nei recettori della famiglia dei TGF-beta nelle proteine Smad sono state osservate in alcuni tumori. Il recettore di tipo II dei TGF-beta, ad esempio, è inattivo a causa di mutazioni in molti tumori gastrointestinali umani (113) e la Smad4 è inattiva in quasi la metà di tutti i carcinoma pancreatici. (114)

La famiglia dei TGF-beta può essere filogeneticamente divisa nei mammiferi in tre principali gruppi (115,116):

- TGF-beta
- Activina/Inibina/Nodal
- BMP (proteina morfogenica dell'osso)/GDF(fattore di crescita e differenziazione)/MIS (ormone antimulleriano).

I membri della superfamiglia dei TGF-beta si formano a partire da precursori secreti da cellule specifiche, in seguito alla loro maturazione proteolitica. I precursori contengono un peptide segnale aminotermine, un pro-dominio ed un dominio maturo carbossiterminale, che costituisce il fattore di crescita attivo. La forma monomerică di questi fattori di crescita contiene 110-140 amminoacidi ed è caratterizzata da sei cisteine conservate. Quasi tutti i membri della superfamiglia dei TGF-beta hanno un settimo residuo di cisteina conservato, che è richiesto per formare le strutture

dimeriche (~25kDa) covalentemente legate che interagiscono con i domini extracellulari dei loro rispettivi recettori.

Nel 1992, la struttura cristallina di TGF- β 2 rivelò un esclusivo fold proteico 117,118

[Figura 6]:

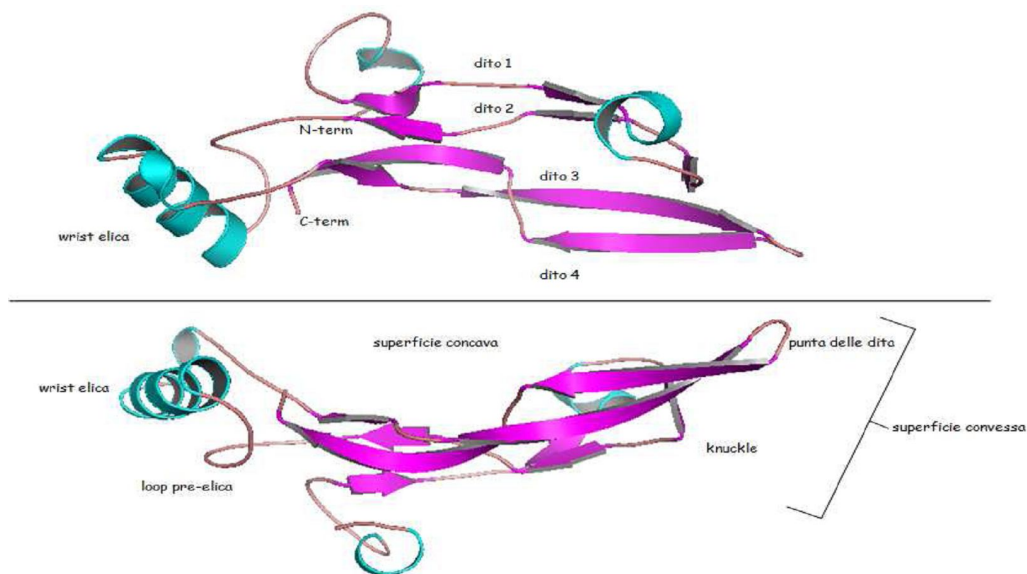


Figura 6: Fold dei TGF-beta 20 (pdbcode:1tfg).

Un tipico monomero dei TGF- β 20 consiste di un nodo di cisteina con due coppie di beta-strand antiparalleli e un alfa-elica (polso). I beta-strand formano una superficie concava e convessa per l'interazione con i recettori.

Il monomero ha una forma sottile, allungata e ricurva che contiene un motivo strutturalmente conservato conosciuto come nodo di cisteina. Il nodo è costituito da un anello di otto residui amminoacidici, contenente due legami disolfuro intra-catena, con un terzo ponte disolfuro che passa attraverso l'anello. Oltre al nodo di cisteina il monomero è caratterizzato da due beta-sheet antiparalleli e una alfa-elica anfipatica (H3) con il suo asse perpendicolare agli sheet [Figura 7].

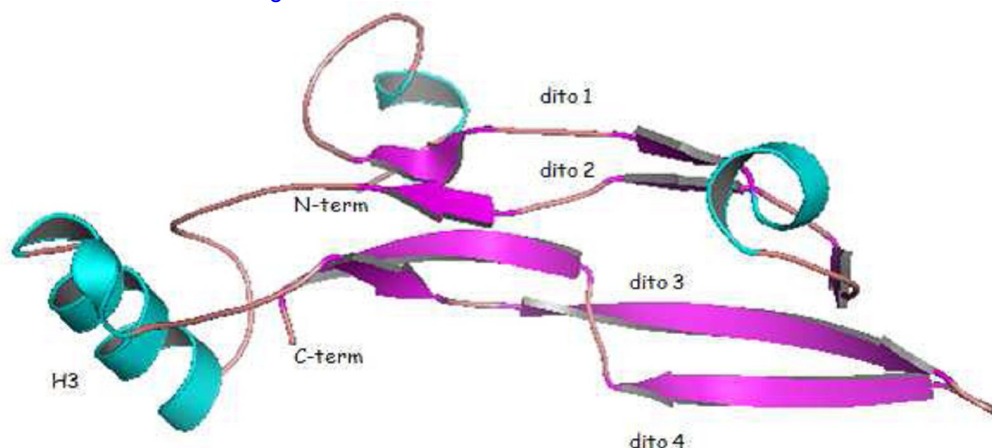


Figura 7: Rappresentazione con ribbon del monomero di TGF-beta 220 (1992; pdbcode:1tfg).

I beta-sheet, formati dal dito1-dito2 e dal dito3-dito4, sono colorati in rosa. L'alfa-elica (H3) è colorato in celeste.

Il fold dei TGF-beta [Figura 6] ricorda una mano aperta, con i alfa-strand che fungono da dita, il nodo di cisteine da palmo, l'elica (H3) da polso e l'estremità amminotermine da pollice. C'è una rete estesa di legami idrogeno tra gli strand di ciascun dito, i due beta-sheet invece sono tra loro troppo lontani per formare interazioni non-covalenti. Essi sono invece legati attraverso i ponti disolfuro del nodo di cisteina e sono stabilizzati da contatti di van der Waals e interazioni idrofobiche. Uno sguardo più attento alle sequenze amminoacidiche delle strutture conosciute dei TGF-s rivela l'assenza di un core idrofobico convenzionale nel monomero isolato. Sul monomero si identificano due regioni caratteristiche che sono coinvolte nel binding con i rispettivi recettori: il 'wrist epitope' che lega il recettore di tipo I e il 'knucle epitope' che lega il recettore di tipo II [Figura 7].119,120

Nella [Figura 8] sono illustrate le strutture dimeriche di tre proteine appartenenti alla sottofamiglia dei TGF-beta: l'Attivina, BMP7 e TGF-beta3.2

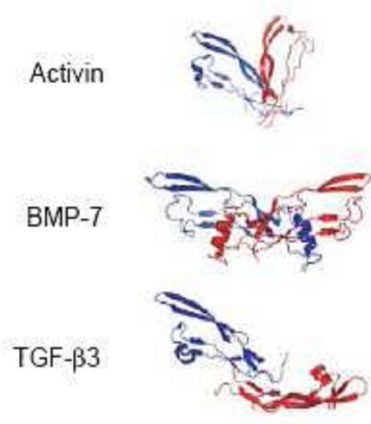


Figura 8: Confronto dei dimeri dell'Attivina (pdbcode:1nyu), BMP7 (pdbcode:1lxi), e TGF-beta (pdbcode:1ktz).

I monomeri sono colorati rossi e blu. Il monomero dell'Attivina A (Fig.8) ha il fold canonico dei TGF-beta esclusa la regione dell' elica (H3), con piccole variazioni nei loop tra i alfa-strand che formano le dita.

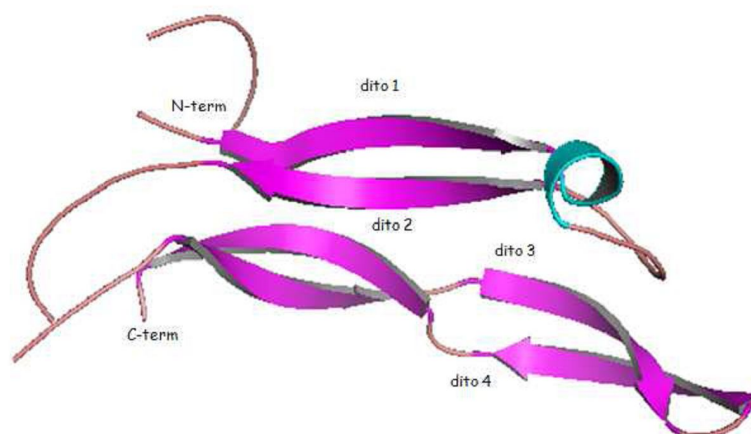


Figura 9: Rappresentazione con ribbon del monomero dell'Attivina A33 (pdbcode:1nyu).

I beta-sheet, formati dal dito1-dito2 e dal dito3-dito4, sono colorati in rosa.

L'Attivina ha una conformazione aperta e estesa ed e moderatamente ruotata rispetto all'orientazione canonica dei TGF-beta; all'interfaccia del dimero conserva elementi canonici di struttura secondaria, come una parte dell' alfa-elica (H3) (Fig.9).

I recettori dei TGF-beta.

I fattori della famiglia dei TGF-beta sono espressi in pattern tessuto-specifici e possono funzionare in maniera:

- endocrina, in cui il fattore di crescita influenza una cellula differente in fenotipo dalla sua cellula d'origine e localizzata in un luogo anatomicamente lontano;
- paracrina, in cui il fattore di crescita influenza una cellula adiacente o vicina ma differente come fenotipo dalla sua cellula d'origine;
- autocrina, in cui il fattore di crescita influenza la sua cellula d'origine o altre cellule identiche a quella nel fenotipo. La specificità recettoriale, la distribuzione nei tessuti, e i livelli di espressione possono tutti interessare le risultanti risposte cellulari. I TGF-beta trasmettono il segnale legandosi a recettori di membrana serina-treonina chinasi, chiamati recettori di tipo I e II.

I recettori di tipo I e tipo II sono glicoproteine di circa 55 e 70 kDa, rispettivamente, che interagiscono dopo il legame al ligando. Entrambi i tipi di recettori serina/treonina chinasi consistono di circa 500 amminoacidi, organizzati sequenzialmente in un dominio extracellulare N-terminale con cui lega il ligando, una regione transmembranica e un dominio intracellulare C-terminale serina/treonina chinasi (Fig.1.12).¹¹⁵ Nel dominio extracellulare di entrambi i recettori è presente una regione di nove amminoacidi (CCX4-5CN), ricca di cisteine (box di cisteine). I recettori di tipo I differiscono dai recettori di tipo II nella sequenza del dominio chinasi, nella presenza di una piccola serie di residui tandem Ser/Gly e altri amminoacidi conservati immediatamente prima del dominio chinasi (Type I box), e un pattern caratteristico di sette residui di cisteina extracellulari che precedono il box di cisteine (CXCX3-5C4-25C4-5C13-16GCX7-19CX11-13).

I recettori di tipo I e tipo II differiscono nell'affinità e specificità, e possono essere

espressi differenzialmente per permettere la regolazione della cascata di segnali

intracellulari. Un TGF-beta inizia quindi la trasmissione del segnale legandosi a recettori serina/treonina chinasi di tipo I e di tipo II presenti sulla superficie cellulare. In seguito a tale binding, c'è un avvicinamento dei recettori che permette al recettore di tipo II di fosforilare il dominio intracellulare del recettore di tipo I. Si forma un olo-complesso ternario tra il ligando TGF-beta e i recettori di tipo I e di tipo II.^{121,122}

L'accesso dei ligandi al recettore è regolato da molte famiglie di proteine globalmente conosciute come ligandi trappola (Fig.10).

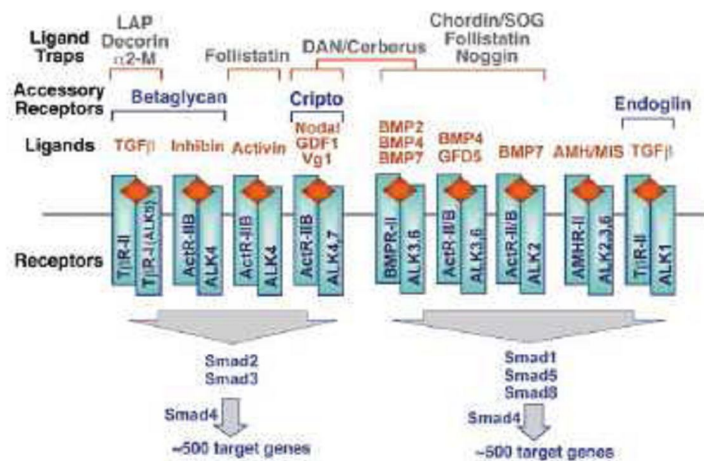


Figura 10

Fig.10: Una descrizione schematica della relazione tra i ligandi dei TGF-beta, i ligandi trappola, recettori accessori, e i recettori di tipo I e di tipo II. Gli R-Smad 1,2,3,5, ed 8 sono raggruppati in base alla loro specificità di segnale.

Meccanismo di attivazione dei recettori dei TGF-beta

Il legame del fattore dimerico ai domini extracellulari di entrambi i tipi di recettori induce il loro avvicinamento e una conformazione vantaggiosa per i domini chinasi intracellulari dei recettori, facilitando la fosforilazione e la seguente attivazione del recettore di tipo I (Fig.11).

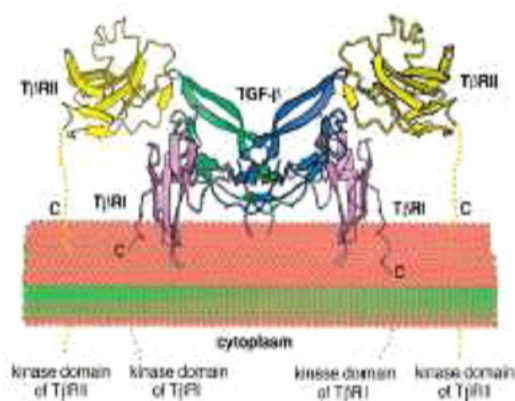


Figura 11: Modello strutturale di un complesso recettoriale completo dei TGF

Fig.11 Modello strutturale di un complesso recettoriale completo dei TGF- β , visto lungo la membrana cellulare. Le estremità C-terminali dei recettori sono rappresentate da linee tratteggiate che entrano nella membrana

Le Smad sono una famiglia di molecole che rappresentano il bersaglio immediatamente a valle del recettore di tipo I, e che regolano la segnalazione dei TGF- β . Nelle cellule di mammifero sono state finora identificate otto molecole Smad,⁷³ costituite da tre classi funzionali: le Smad recettore-regolante (R-Smad), le Smad Co-mediatori (Co-Smad), e le inibitori Smad (ISmad).

Il termine Smad deriva dall'unione dei nomi dei geni correlati (Mad, gene mother against decapentaplegic, ed il gene Sma), identificati rispettivamente in *Drosophila* ed in *Caenorhabditis elegans*.^{123,124}

Il recettore di tipo I attivato trasmette il segnale tramite le R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5 e 8). Le Smad 1, 5 ed 8 sembrano regolare la segnalazione delle BMP.^{68,73} Le Smad 2 e 3 regolano la segnalazione dei TGF- β e dell'Attivina.^{68,76} Il recettore di tipo I interagisce direttamente con le Smad e le fosforila nella sequenza di consenso conservata SXS.⁶⁸ Le R-Smad sono presentate al recettore di tipo I attraverso le proteine scaffold come SARA (ancora SMAD per l'attivazione del recettore), che facilitano il loro riconoscimento e la fosforilazione.¹²⁵ Una volta che le R-Smad sono fosforilate, si dissociano da SARA e interagiscono con Smad 4 (Co-Smad), determinando la traslocazione del complesso nel nucleo, dove interagiscono con altri regolatori trascrizionali per reprimere o attivare l'espressione dei geni (Fig.12).

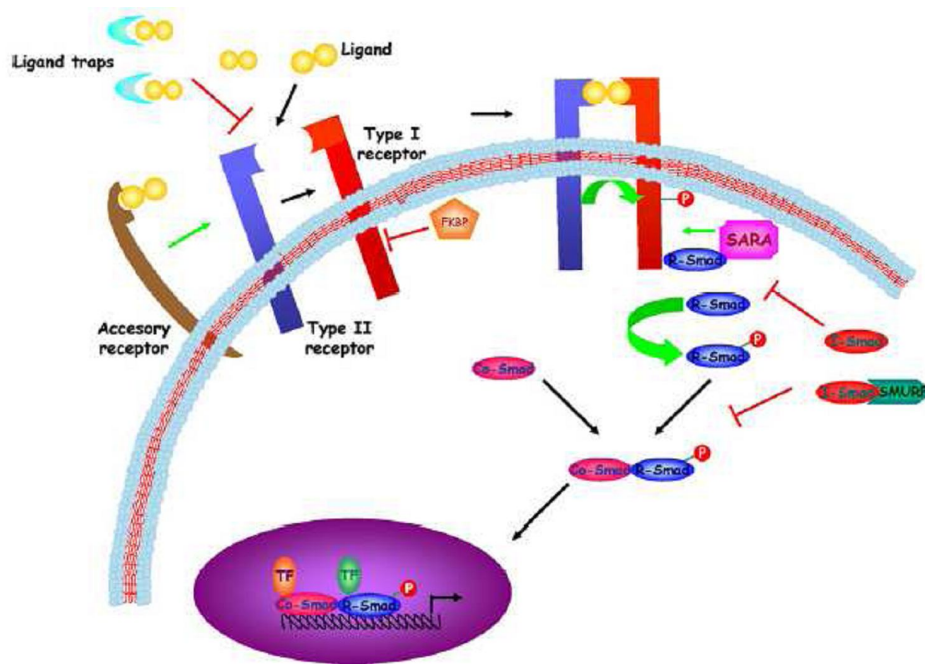


Figura 12: Signaling della superfamiglia TGF- β 78

Fig.12: Signaling della superfamiglia TGF- β 78

1.4 Regolazione dell'attivazione dei recettori dei TGF- β

Gli step principali dell'attivazione del recettore sono fortemente regolati. L'accesso dei ligandi TGF- β ai loro recettori è controllato da due classi di molecole con funzioni opposte (Fig.1.14). Una classe comprende un gruppo di proteine solubili che agiscono come trappole che legano il ligando, sequestrandolo e bloccando il suo accesso ai recettori di membrana. Esse includono le pro regioni dei precursori dei TGF- β , la follistatina, che lega le Attivine e le BMP; e tre distinte famiglie di proteine - Noggin, Chordin/SOG, e DAN/Cerberus 121 L'altra classe di molecole che controlla l'accesso dei ligandi ai recettori include le proteine ancorate alla membrana che agiscono come recettori accessori, o corecettori, promuovendo il legame del ligando ai recettori. Il recettore di tipo III dei TGF- β (un proteoglicano ancorato alla membrana) interviene nel mediare il binding dei TGF- β al recettore di tipo II.¹²³ I betaglicani, invece, legano l'inibina e facilitano il suo accesso ai recettori dell'Attivina, anticipando il binding dell'Attivina e bloccando la sua attività biologica.⁸⁸ Studi genetici e biochimici suggeriscono che una proteina, relazionata ai betaglicani, l'endogлина facilita il binding dei membri della famiglia dei TGF- β al recettore di tipo I (ALK1) nelle cellule endoteliali, e questo ruolo è critico per l'omeostasi vascolare.^{102,125}

La proteina BAMBI (BMP and Activin receptor membrane bound inhibitor, conosciuta anche come Nma), rappresenta un tipo molto differente di regolatore negativo dell'attivazione del recettore.⁹⁰ BAMBI ha le caratteristiche strutturali di un recettore di richiamo (decoy), con un dominio extracellulare e una piccola regione citoplasmatica con sequenza simile ai recettori di tipo I. BAMBI compete con il recettore di tipo I per l'incorporazione nei complessi recettoriali indotti dal ligando, inibendo l'attivazione del recettore.¹²⁵

Endoglin e activina

L' endoglin è una glicoproteina transmembrana di 180 Kd espressa sulle cellule endoteliali e sulle cellule ematopoietiche incluso i macrofagi, in quantità minore sulle cellule eritroidi, sui precursori delle cellule B e sulle cellule stromali del midollo emolinfopoietico.

Non sembra essere espressa invece, sulla superficie cellulare dei progenitori delle cellule ematopoietiche, incluso le unità formanti colonie (CFU) di granulociti/ eritrociti/ monociti/ megacariociti (GEMM), CFU-granulociti/monociti /GM), e burst formante unità eritrocitarie (BFU-E). Tanto meno la esprimono i linfociti T e B maturi ed i monociti non attivati (se attivati esprimono l'endoglin). E' oggi riconosciuta la sua espressione durante la gravidanza in alcune strutture della placenta, a partire dal sinciziotrofoblasto, nel corso dello sviluppo cardiaco e, in maniera transitoria, durante la formazione delle valvole e la settazione del cuore.(124)L'endoglin è riconosciuta oggi come marker delle cellule endoteliali, si parla infatti di CD-105.

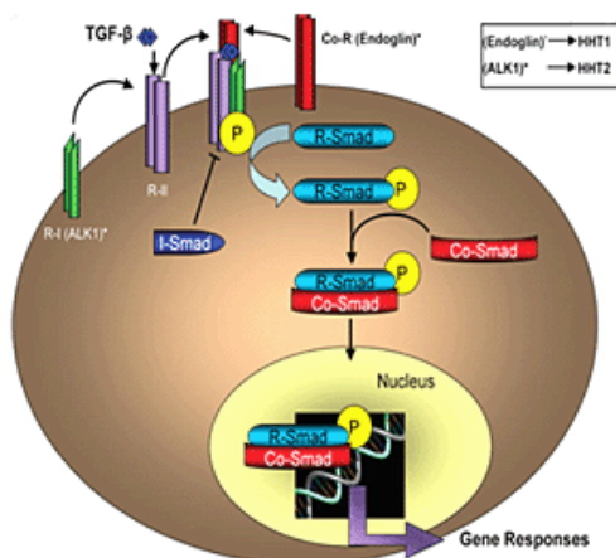


Figura 13

L'activina o Alk-1, detta anche receptor-like kinase 1 o TSR1, è anch'essa una proteina transmembrana facente parte del complesso recettoriale del TGF-b. E' una serin-treonin-kinasi e raggiunge alti livelli di espressione sulle cellule endoteliali, nel polmone e nella placenta. La sua espressione a livello polmonare aumenta notevolmente nel periodo postnatale, probabilmente per intensa vasculogenesi.³⁴ L'Alk-1 è osservabile anche sulla superficie cellulare di macrofagi e cellule

stromali di ratto. Tale distribuzione riflette quella dell' endogлина. Sempre nei modelli murini l'Alk-1 è stata evidenziata (9-12) giorni dopo il concepimento sulle superficie delle cellule di intestino e stomaco. Le mutazioni a carico del gene si riflettono fenotipicamente sulla porzione transmembrana, extracellulare o enzimatica della proteina. L'attivina ha una vasta gamma di attività biologiche, tra cui l'induzione mesodermica, la differenziazione delle cellule neurali, rimodellamento osseo, emopoiesi e ruoli nella fisiologia riproduttiva. Isoforme Activin e altri membri della superfamiglia del TGF-beta esercitano i loro effetti biologici legandosi ai complessi eteromerici di tipo I e tipo II del recettore serina-treonina chinasi, che sono entrambi essenziali per la trasduzione del segnale.(125)

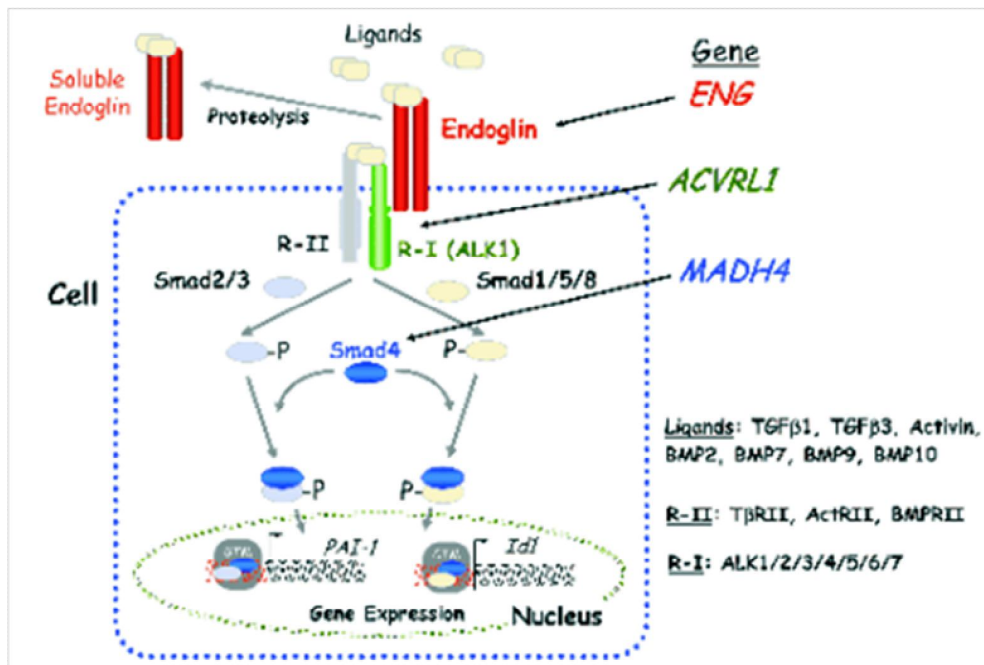


Figura 14

Endogлина ed Activina A sono componenti del complesso recettoriale del Trasforming Growth Factor-beta (TGF-β).

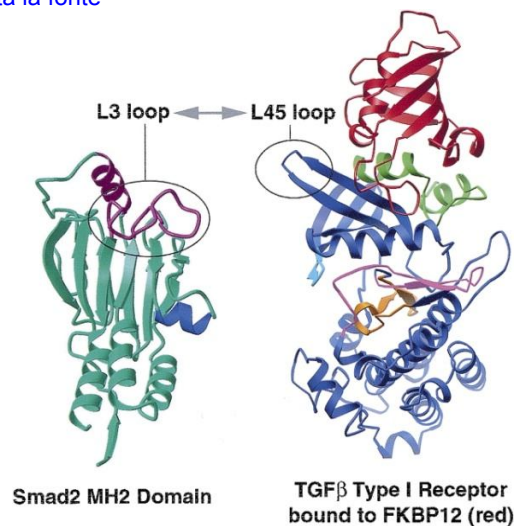


Figura 15: TGF-β: struttura

Mutazioni a carico dei geni per il recettore dell'endoglin e dell'attivina A (eng ed ALK-1) causano una displasia vascolare conosciuta come Telangiectasia Emorragica Ereditaria (HHT). L'esito di tali mutazioni è una angiogenesi imperfetta con formazione di vasi abnormi, telangiectasie e conseguenti alterazioni delle funzioni vascolari che risultano in una importante fragilità vascolare.

L'endoglin è una glicoproteina up-regolata nell'endotelio di tessuti neovascolarizzati come ad esempio quelli di diversi tumori. (139) Alti livelli sierici di endoglin sono stati osservati in pazienti con tumori solidi e neoplasie ematologiche. E' un indicatore di prognosi infausta in pazienti con neoplasie solide quali NSCLC, cancro della cervice e carcinoma della mammella. 140 Inoltre i livelli di endoglin dosati nel siero di pazienti con carcinoma prostatico, correlano con gli stadi del tumore. 141 L'endoglin è stata indicata quale unico marker di proliferazione endoteliale in vitro ed in vivo, ma l'esatto ruolo giocato nella trasmissione del segnale nelle cellule endoteliali è molto complesso ed rimane ancora da chiarire. Sicuramente la sua presenza nelle cellule endoteliali dei tumori ha un valore prognostico e suggerisce un suo impiego quale possibile target terapeutico. (142)

L'Activina A è anch'essa una proteina ancillare del sistema recettoriale del TGF-β e come altri membri di tale famiglia è implicata nel controllo di molti aspetti della crescita e della differenziazione cellulare. La trasmissione del segnale attivina A dipendente è associata alla inibizione della crescita delle cellule nelle ghiandole mammarie così come lo sviluppo ghiandolare stesso. (143,144) Di contro l'attivina A è espressa in tutti gli stadi del tumore della mammella ed è ridotta negli stadi più avanzati del cancro. Il recettore dell'attivina A e le molecole segnale ad essa

associate sono state osservate nelle linee cellulari del cancro della mammella e la perdita di riduzione del segnale attivina dipendente, in particolare la localizzazione nucleare o la fosforilazione di Smad2 e Smad3, sembra comportare una maggiore aggressività del cancro.^{145,146} L'Activin A è coinvolta inoltre nel rimodellamento osseo come promoter dell'osteoclastogenesi. Tuttavia i dati circa il ruolo giocato dall'attivina A nella differenziazione degli osteoblasti rimane a tutt'oggi molto controverso. I livelli di attivina A nel plasma di pazienti affetti da MM con più di una lesione osteolitica risultano molto bassi di quelli di pazienti affetti da MM con nessuna o soltanto una lesione osteolitica. (^{147,148}) Recenti studi che utilizzano metodiche di indagine genetica e farmacologica hanno dimostrato come il segnale attivina A dipendente possa essere anche coinvolto nella angiogenesi tumorale, identificando il recettore ALK-1 quale target per l'inibizione della angiogenesi tumorale. (¹⁴⁹)

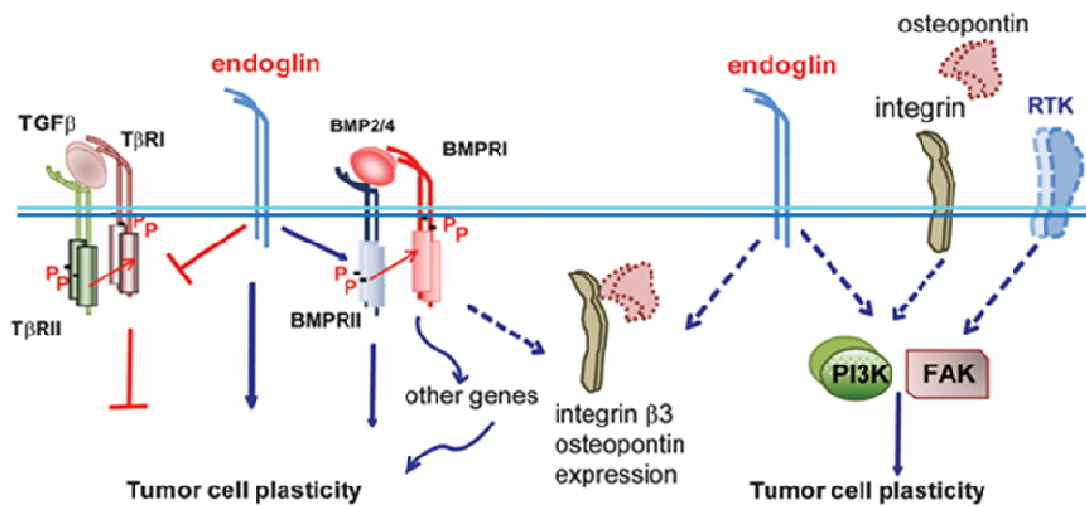


Figura 16: ruolo dell'endoglina nella tumor cell plasticity del sarcome di ewing e del melanoma.

Endoglina ed Activina: nuovi marker.

Background

L'osso rappresenta la terza sede più comune di metastasi, preceduto solo da polmone e fegato. L'incidenza delle metastasi ossee secondarie a tumori solidi è in costante aumento in quanto il malato oncologico, grazie a terapie più efficaci, vive più a lungo. Il 25% dei pazienti rimane asintomatico, nel restante 75% le localizzazioni ossee sono responsabili di una serie di complicanze definite eventi scheletrici correlati (SRE), quali la frattura ossea, la radioterapia su segmento osseo, la chirurgia ortopedica, la compressione midollare, l'ipercalcemia. Il dolore è il sintomo più frequente. Tutti questi eventi riducono la qualità di vita dei pazienti, rendendo necessarie terapie efficaci che riducano e ritardino queste complicanze scheletriche. In aggiunta ai trattamenti tradizionali (terapie antineoplastiche, radioterapia e chirurgia ortopedica), negli ultimi anni, vengono utilizzati i bifosfonati (BF) quale opzione terapeutica efficace nella prevenzione delle complicanze scheletriche associate a metastasi ossee e conseguentemente nel controllo del dolore. (126)

I BF sono in grado di inibire il riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti ed è questo effetto biologico a costituire il rationale dell'impiego di tali composti nelle condizioni cliniche caratterizzate da processi di riassorbimento osseo quali il morbo di Paget, l'ipercalcemia maligna, le metastasi ossee, il mieloma, l'iperparatiroidismo primario e secondario e l'osteoporosi ad alto turnover. In passato si riteneva che l'effetto inibente il riassorbimento osseo fosse correlato esclusivamente alle loro proprietà chimico-fisiche. Oggi si ritiene che l'effetto chimico-fisico non giochi alcun ruolo nella loro attività di blocco dell'attività osteoclastica di riassorbimento osseo. I meccanismi di azione dei BF rimangono ancora non completamente chiariti anche se, sin dai primi studi, è apparso evidente che il principale bersaglio cellulare di questi composti sia rappresentato dall'osteoclasto. (127) I BF determinano sugli osteoclasti alterazioni morfologiche e funzionali espresse dalla perdita dell'orletto a spazzola e dai vacuoli citoplasmatici tipici della fase attiva di riassorbimento osseo, 128 dalla riduzione della produzione di acido lattico, dall'accumulo protonico, dalla sintesi di enzimi lisosomiali e di prostaglandine, di pirofosfati e della fosfatasi acida, fondamentali per l'attività fagocitaria dell'osteoclasta. Recentemente vi sono un numero sempre maggiore di dati a favore dell'ipotesi che in realtà sia l'osteoblasto la reale cellula bersaglio dei BF, tramite questa infatti questi composti esplicherebbero il loro effetto sugli osteoclasti. I BF influenzano il metabolismo osteoblastico e questo effetto risulta essere farmaco-dipendente.

Impediscono la proliferazione degli osteoblasti (129), riducono la secrezione osteoblastica di alcuni fattori solubili come l'IL-6 intervenendo sia sull'osteoclastogenesi che sull'attività osteoclastica. (130) Alcuni BF stimolano la proliferazione di cellule progenitrici osteoblastiche di derivazione midollare, (131) ed inibiscono l'apoptosi di osteociti ed osteoblasti. (132) Nonostante la chiara evidenza in vitro degli effetti che i BF esercitano sulla cellula osteoblastica, la loro azione in vivo rimane ancora incerta. Non è ancora chiaro infatti quale dei due meccanismi, diretto sugli osteoclasti o indiretto sugli osteoblasti sia presente in vivo o se, qualora entrambi fossero presenti, quale sia il prevalente. Studi più recenti sembrano aver chiarito invece quale sia il meccanismo d'azione molecolare dei BF. Esistono due distinti meccanismi d'azione livello cellulare dipendenti dalle loro caratteristiche chimiche: gli amino-BF intervengono nella via del mevalonato inibendola con conseguente inibizione della prenilazione proteica, alterazione delle modifiche post-traduzionali e quindi attivazione dell'apoptosi dell'osteoclasta; (133,134) i non amino-BF vengono incorporati come nucleotidi di adenina, analoghi tossici dell'ATP, con conseguente inibizione della sintesi proteica e di altre reazioni ATP-dipendenti e quindi rapida lisi e necrosi cellulare (135).

Da qualche anno l'effetto dei BF sull'*angiogenesi* è oggetto di numerosi studi. I BF esercitano spiccate attività anti-angiogenetiche in vivo ed in vitro i cui meccanismi non risultano ancora del tutto chiariti e che implicano l'inibizione diretta dell'attività proliferativa delle cellule endoteliali, l'inibizione di fattori di crescita endoteliali (EGF) e delle metalloproteasi (MMP-2 e MMP-14) che stimolano la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali. (136) L'attività anti-angiogenetica caratteristica dei BF sembra essere strettamente correlata ad una attività di tipo anti-tumorale che si esplica attraverso la modulazione dell'apoptosi cellulare e dell'espressione di alcune molecole di adesione. (137,138)

Endoglin ed Activina A sono componenti del complesso recettoriale del Trasforming Growth Factor-beta (TGF- β). Mutazioni a carico dei geni per il recettore dell'endoglin e dell'activina A (eng ed ALK-1) causano una displasia vascolare conosciuta come Telangiectasia Emorragica Ereditaria (HHT). L'esito di tali mutazioni è una angiogenesi imperfetta con formazione di vasi abnormi, telangiectasie e conseguenti alterazioni delle funzioni vascolari che risultano in una importante fragilità vascolare.

L'endoglin è una glicoproteina up-regolata nell'endotelio di tessuti neovascolarizzati come ad esempio quelli di diversi tumori. (139) Alti livelli sierici di endoglin sono stati osservati in pazienti con tumori solidi e neoplasie ematologiche. E' un indicatore di prognosi infausta in pazienti con neoplasie solide quali NSCLC, cancro della cervice e carcinoma della mammella.

(140) Inoltre i livelli di endoglina dosati nel siero di pazienti con carcinoma prostatico, correlano con gli stadi del tumore. 141 L'endoglina è stata indicata quale unico marker di proliferazione endoteliale in vitro ed in vivo, ma l'esatto ruolo giocato nella trasmissione del segnale nelle cellule endoteliali è molto complesso ed rimane ancora da chiarire. Sicuramente la sua presenza nelle cellule endoteliali dei tumori ha un valore prognostico e suggerisce un suo impiego quale possibile target terapeutico. (142)

L'Activina A è anch'essa una proteina ancillare del sistema recettoriale del TGF- β e come altri membri di tale famiglia è implicata nel controllo di molti aspetti della crescita e della differenziazione cellulare. La trasmissione del segnale attivina A dipendente è associata alla inibizione della crescita delle cellule nelle ghiandole mammarie così come lo sviluppo ghiandolare stesso. (143,144) Di contro l'activina A è espressa in tutti gli stadi del tumore della mammella ed è ridotta negli stadi più avanzati del cancro. Il recettore dell'activina A e le molecole segnale ad essa associate sono state osservate nelle linee cellulari del cancro della mammella e la perdita di riduzione del segnale attivina dipendente, in particolare la localizzazione nucleare o la fosforilazione di Smad2 e Smad3, sembra comportare una maggiore aggressività del cancro.(145,146) L'Activina A è coinvolta inoltre nel rimodellamento osseo come promoter dell'osteoclastogenesi. Tuttavia il ruolo giocato dall'activina A nella differenziazione degli osteoblasti rimane a tutt'oggi molto controverso. I livelli di activina A nel plasma di pazienti affetti da MM con più di una lesione osteolitica risultano molto più bassi di quelli di pazienti affetti da MM con nessuna o soltanto una lesione osteolitica. (147,148) Recenti studi che utilizzano metodiche di indagine genetica e farmacologica hanno dimostrato come il segnale attivina A dipendente possa essere anche coinvolto nella angiogenesi tumorale, identificando il recettore ALK-1 quale target per l'inibizione della angiogenesi tumorale. (149)

Scopo del lavoro

Vi è massima evidenza che gli amino-BF siano efficaci nel ridurre la morbilità scheletrica in corso di malattia metastatica ossea, pertanto questi farmaci vengono correntemente utilizzati per il trattamento delle metastasi ossee scheletriche. Con l'incremento dell'utilizzo di tali farmaci si rendono sempre più necessari parametri per la valutazione di risposta individuale alla terapia. Evidenze sempre maggiori mostrano come la valutazione dei bone markers può essere considerata un end-point di efficacia del trattamento delle metastasi ossee. Infatti poiché il livello di turnover osseo condiziona l'evoluzione clinica delle metastasi ossee, i marcatori di riassorbimento e di neoformazione così come anche i marcatori di neoangiogenesi ossea, possono essere utilizzati come

parametri correlati alla prognosi scheletrica e alla sopravvivenza dei pazienti con metastasi ossee e come parametri surrogati del trattamento con BF delle metastasi ossee. La ricerca di nuovi marker biologici che possano stimare il rischio di SRE e valutare la risposta dell'osso alla terapia con BF costituisce una delle priorità della ricerca sulla terapia delle metastasi ossee. Lo studio di activina A ed endogлина potrebbe essere volto a stabilire se molecole coinvolte in meccanismi quali la neoangiogenesi tumorale, nel riassorbimento osseo e nella migrazione cellulare possano essere utilizzate quali marker di controllo di risposta alla terapia con amino-BF nei pazienti con metastasi ossee e di stima di progressione della malattia. Gli outcome individuati al fine di valutare le due molecole, endogлина ed activina, quali marker biologici di risposta alla terapia con i bifosfonati sono i seguenti: tempo di sopravvivenza dalla somministrazione dei bifosfonati, SRE e numero di eventi ossei.

Materiali e Metodi

Pazienti

Tra il Marzo 2007 ed il Novembre 2008, sono stati reclutati per lo studio 10 pazienti affetti da metastasi ossee neo-diagnosticate afferenti al centro di Oncologia Medica del policlinico universitario Campus Bio-Medico.

I criteri di inclusione sono i seguenti:

- età \geq 18 anni
- evidenza clinico/radiologica ed istopatologica di neoplasia maligna
- evidenza radiologica e/o istopatologica di almeno una metastasi ossea recentemente diagnosticata

Di seguito i criteri di esclusione:

- storia di ipersensibilità o allergia ad uno dei farmaci in schedula o ad uno dei suoi eccipienti
- patologia odontoiatrica attiva non trattabile
- presenza di ipocalcemia o di disturbi del metabolismo minerale (p.e. iperparatiroidismo) non adeguatamente trattati
- clearance della creatinina $<$ 35 mL/min

La scheda prevedeva somministrazione di:

- 4 mg di acido zoledronico, salvo correzione per i valori di clearance della creatinina in caso di riduzione del GFR, diluito in 100 ml di soluzione salina in infusione endovenosa in 15 minuti ogni 3/4 settimane

Le concentrazioni di activina ed endoglinina sono state dosate sul siero dei pazienti prima della somministrazione dello zometa ed a 28giorni, 2, 3, 6, 9 e 12 mesi.

Metodi ed apparecchiature

I livelli sierici/plasmatici di endoglinina e di activina A verranno dosati con metodo Elisa: Human Endoglin Qkit e Human DuoSet Activin A (R & D System, Minneapolis, MN) saranno impiegati a tale scopo. In breve, piastre da 96 pozzetti verranno rivestite con anticorpi di cattura e incubate over-night. Previa bloccaggio con FBS 25% in PBS, saranno aggiunti 100uL di campione per l'incubazione per 2 ore a temperatura ambiente. Verranno quindi aggiunti gli anticorpi di rilevazione (100uL/well) con successiva incubazione a temperatura ambiente per 2 ore. Previa incubazione successiva con cromogeno per 20 minuti, la reazione verrà bloccata con acido solforico 1,5M. La piastra verrà letta a 450nm. Il range di normalità indicato dalla ditta per l'endoglinina risulta compreso tra 2,99-7,14ng/mL, mentre il range per l'activina risulta compreso tra 115-665 pg/mL.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software MedCalc 11.6.1.0 package (Med-Calc Software, Mariakerke, Belgium). I dati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di $p \leq 0,05$.

La distribuzione normale dei dati è stata saggiata con il test di Kolmogorov–Smirnov, mentre le correlazioni tra le variabili sono state studiate utilizzando il coefficiente **di correlazione per ranghi di Spearman** (rho).

Il confronto fra i valori basali di activina ed endoglinina e quelli a 28 giorni, 2, 3, 6, 9 e 12mesi è stato effettuato utilizzando il t-test e il test di Wilcoxon.

Risultati

I dosaggi dell'endoglina per tutti i pazienti nei diversi tempi di valutazione risultano compresi tra 3,11 e 5,90 ng/mL, rimanendo perfettamente nel range di normalità.

Endoglina (v.n.: 2,99-7,14ng/mL)							
<i>pazienti</i>	0	28gg	2mesi	3mesi	6mesi	9mesi	12mesi
PS	4,82	3,22	3,48	3,49			4,50
DCL	5,54	5,18	4,76	4,47		3,70	4,13
CMR	4,52	4,49	4,47		3,85		4,40
PT	3,63	3,60	3,23		3,17	4,03	3,58
MG		3,11	3,34	4,28	4,46	4,64	4,30
MS	4,77	4,36	5,18	5,32	4,71	4,64	5,05
DA	4,97	4,93	4,33	3,49	3,79	3,45	4,34
GE			4,86	4,99	3,52	4,97	3,95
CC	4,55	4,61	3,81	3,94	4,46		5,25
CA	3,96	3,35	3,69	3,80			5,19
TF	4,21	4,34	4,42	4,67	3,89	4,48	4,06
GD	4,23	4,40	5,90	4,57	4,18	3,49	2,96
TR	3,79	3,82	3,70	3,96	4,92		4,39

Non vi è correlazione alcuna tra i valori dell'endoglina nei diversi tempi e tra i diversi tempi e gli out come individuati.

I dosaggi dell'activina per tutti i pazienti nei diversi tempi di valutazione risultano compresi tra 294,48 e 1176,70 pg/mL, con valori che non sempre si mantengono entro range di normalità.

I dati, pur essendo in numero esiguo, risultano rispettare una distribuzione normale.

Activina (v.n.: 115-665 pg/mL)							
<i>pazienti</i>	0	28gg	2mesi	3mesi	6mesi	9mesi	12mesi
PS	618,92	669,44	1059,70	647,09			829,83
DCL	484,58	723,83	327,90	466,74		646,51	522,10
CMR	493,07	383,76	294,48		477,32		1176,70
PT	385,76	370,49	464,42		403,13	516,52	652,67
MG		570,75	685,11	559,77	569,61	560,19	536,05
MS	537,58	534,76	482,74	473,03	444,35	550,24	700,89
DA	428,68	423,44	433,84	347,07	454,78	572,91	640,45

GE			437,60	455,69	405,02	352,18	334,84
CC	468,61	467,64	382,04	399,33	310,42		335,34
CA	772,53	527,30	550,97	505,97			730,76
TF	721,77	724,00	484,58	490,04	416,37	448,08	401,23
GD	868,40	942,09	721,83	621,37	627,50	499,50	405,08
TR	391,92	312,56	316,97	314,18	324,56		444,88

Applicando il T-test ai valori dell'activina raggruppati per i diversi tempi, otteniamo i seguenti risultati:

- a) Non vi è differenza significativa tra i valori di activina basale (tempo 0) ed i valori dell'activina a 28 giorni ($p=0,8203$)
- b) Non vi è differenza significativa tra i valori di activina basale ed i valori di activina a due mesi ($p=0.3298$)
- c) Vi è differenza significativa tra i valori di activina basale e tra i valori di activina a tre mesi ($p=0.0124$)
- d) Vi è differenza significativa tra i valori di activina basale ed i valori di activina 6 mesi ($p=0.0448$)
- e) Non vi è differenza significativa tra i valori di activina basale ed i valori di activina a 9 mesi ($p=0.7479$)

Rappresentando graficamente i dati mediante box and whiskers plot otteniamo la seguente distribuzione (fig. 17):

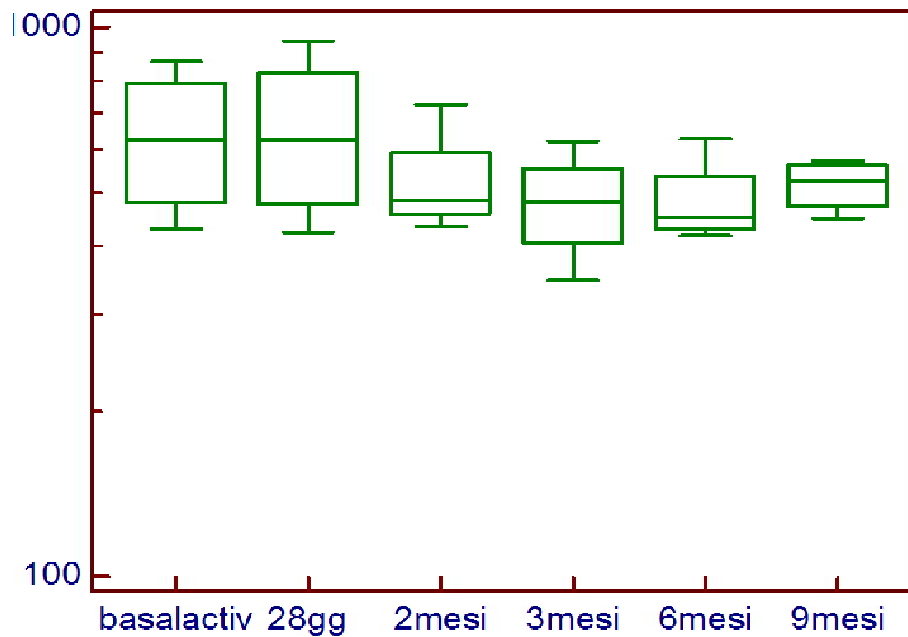


Figura 17

Dalla visualizzazione del grafico (fig. 18) si nota che gli stessi dati possano essere raggruppati secondo il seguente schema: valori di attivina basale ed a 28 giorni (macrogruppo g) e valori di attivina a 2, 3, 6 e 9 mesi (macrogruppo h).

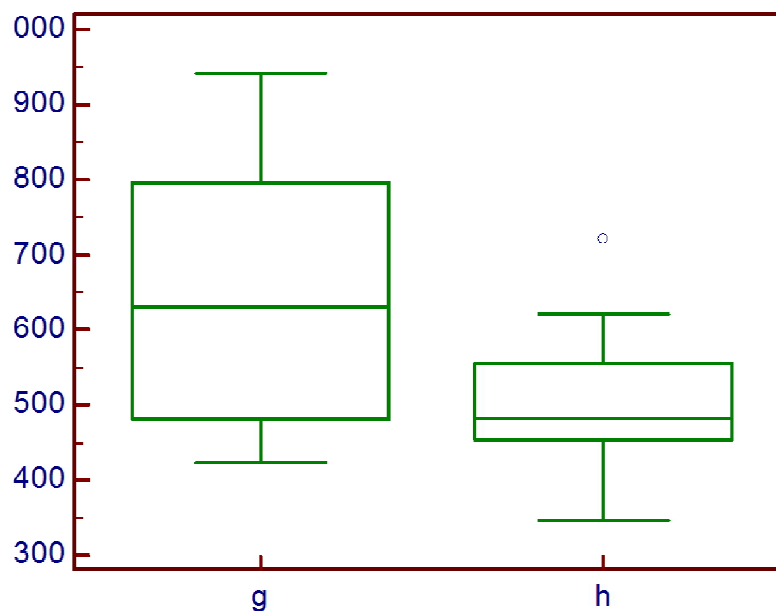


Figura 18

Paragonando i dati dei due macrogruppi g ed h con il test di Wilcoxon ($P = 0,0156$), si ottiene una differenza significativa tra i valori di attivina dei due gruppi.

Comparando inoltre i due gruppi g ed h così ottenuti per paragoni multipli e soffermandosi sui punti in cui si hanno le massime differenze si ottiene la seguente curva di distribuzione dei valori (fig. 19):

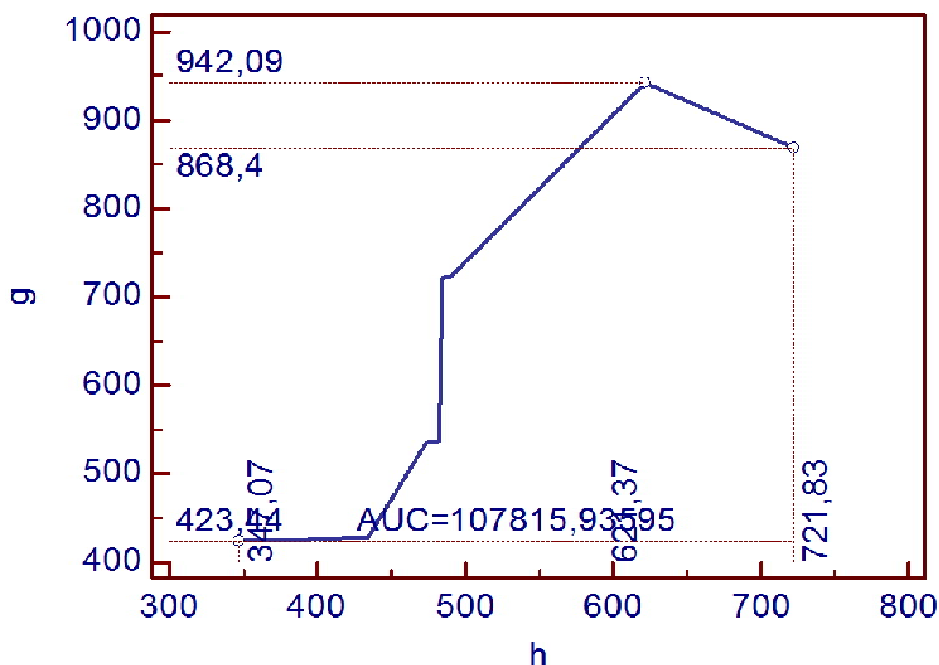


Figura 19

Il risultato suggerisce che la variazione della concentrazione dell'activina si inserisce sul dato iniziale: è la variazione sul dato iniziale che conta e non il valore assoluto.

I dati possono essere inoltre raggruppati in tre macrogruppi: gruppo i, per valori di activina ottenuti al tempo 0 e 28 giorni; gruppo l, per valori di activina ottenuti al tempo 2 e 3 mesi e gruppo m, per valori di activina ottenuti ai tempi 6 e 9 mesi (fig. 20).

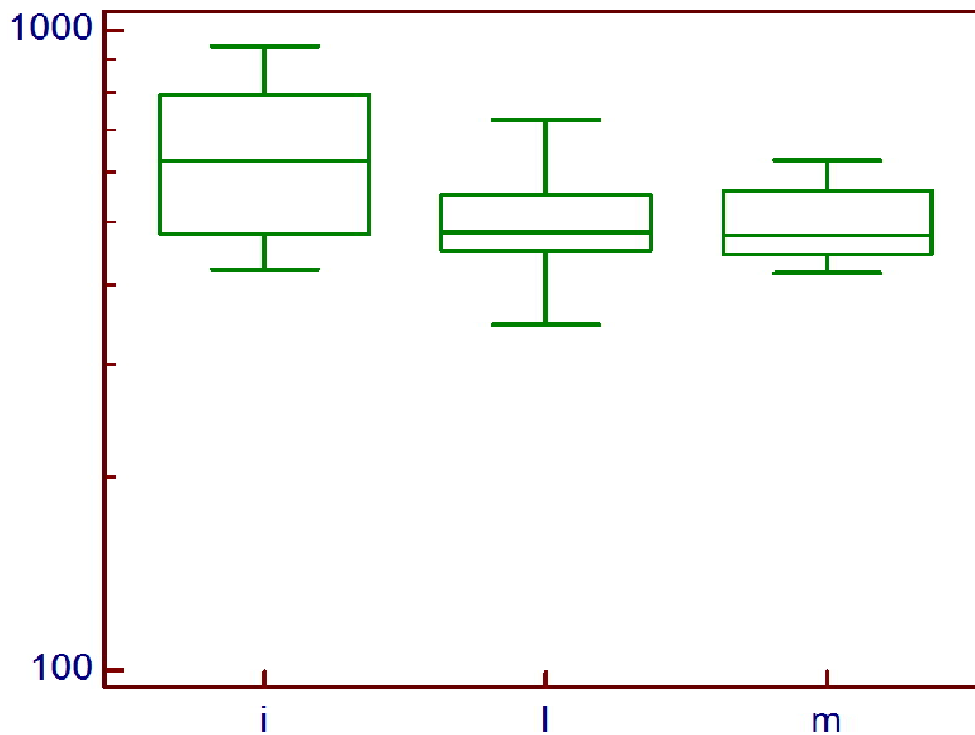


Figura 20

Dal grafico e relative statistiche si evince che la differenza fra il primo gruppo e gli altri due gruppi è evidente, gli altri due gruppi (l ed m) invece conservano gli stessi parametri.

Non risulta in essere correlazione tra i valori di activina nei diversi tempi e gli outcome individuati (siti ossei, SRE e tempo di sopravvivenza dalla somministrazione dello zometa) a causa dello scattering dei dati di outcome.

Discussione e Conclusioni

Partendo dalla considerazione che i dati in nostro possesso risultano esigui, possiamo affermare che l'endoglina, pur essendo una molecola coinvolta in meccanismi quali la neoangiogenesi tumorale, il riassorbimento osseo e la migrazione cellulare, non può essere utilizzata quale marker di controllo di risposta alla terapia con amino-BF nei pazienti con metastasi ossee o di stima di progressione della malattia o dei tempi di sopravvivenza dopo somministrazione di zometa.

L'activina, pur essendo coinvolta nella stessa cascata di attivazione del segnale TGF-beta dipendente, risulta interessante marker di studio della risposta alla terapia con i bifosfonati. L'activina è una proteina ancillare del complesso recettoriale del TGF-beta e, come tale, risulta implicata nel controllo di molti aspetti della crescita e della differenziazione cellulare. Studi eseguiti su pazienti con tumore della mammella evidenziano come la sua riduzione sia evidente negli stadi più avanzati del tumore e che una perdita di funzione dell'activina sia associata ad una maggiore aggressività del cancro. È una molecola coinvolta nell'osteoclastogenesi ed il segnale activina-dipendente gioca un ruolo cruciale anche nell'angiogenesi tumorale, indicando Alk-1 quale possibile recettore target dell'angiogenesi tumorale. Le nostre osservazioni indicano che i valori di activina basali e quelli a 28 giorni, dopo primo ciclo di somministrazione di zometa, non hanno alcuna differenza significativa, mentre si riscontrano differenze significative tra il valore basale di activina e quello riscontrato a 2, 3 e 6 mesi. Un valore di activina iniziale alto si conferma alto anche nei successivi tempi post-somministrazione di zometa. Quindi è importante poter dosare il valore della concentrazione basale di activina non per l'utilità del dato in sé, ma per la comparazione con i dati dei dosaggi nei tempi successivi. Questa prima valutazione ha indicato come l'azione eventuale dello zometa cominci a manifestarsi sull'activina dopo almeno un mese con un allungamento fin'anche ai due mesi. Inoltre poiché si possono raggruppare i dati in tre gruppi e la differenza fra il primo gruppo e gli altri due gruppi è evidente mentre la differenza tra gli altri due gruppi non lo è, potremmo avanzare l'ipotesi che l'effetto dello zometa sull'activina abbia un plateau che viene raggiunto tra il terzo mese e mantenuto fino al nono mese. Possiamo suggerire un utilizzo del dosaggio dell'activina per la valutazione della risposta allo zometa, proponendo la sua utilità nei primi 6-9 mesi, avendo cura di ottenere un primo dosaggio entro il primo mese, che va considerato dosaggio basale; il controllo andrebbe suggerito ogni due mesi dal terzo mese in poi valutando il raggiungimento del plateau. Questo studio si è rivelato per ora solo esplorativo. Esso può indicare che il dosaggio dell'activina plasmatica può essere utile per monitorare l'attività dello

Tesi di dottorato in Patologia Osteoncologica, di Elisabetta Ferraro,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 16/01/2012.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte

zometa e che sia utile anche estendere i tempi oltre i nove mesi. L'esiguità dei dati non ha permesso di rilevare correlazioni tra dosaggio di activina e gli outcomes indagati. Il prosieguo del lavoro potrà dire se una effettiva correlazione può esservi ed in quali termini.

Bibliografia

1. Tubiana-Hulin, M. Incidence, prevalence and distribution of bone metastases. *Bone*. 12 Suppl 1 1991, p. S9-10.
2. Galasko, C. The anatomy and pathways of skeletal metastases. *Bone metastases*. Boston : Weiss, L. Gilbert, A., 1981, p. 49-63.
3. Coleman, RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res*. 2006, 12(20 Pt 2), p. 6243s-6249s.
4. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989 , 8(2), p. 98-101.
5. Kaplan, RN et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005, 438(7069), p. 820-7.
6. Pantel, K et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet*. 1996 , 347(9002), p. 649-53.
7. Liotta, LA. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001, 411(6835), p. 375-9.
8. Zetter, BR. The cellular basis of site-specific tumor metastasis. *N Engl J Med*. 1990, 322(9), p. 605-12.
9. Liotta, LA. Cancer invasion and metastases. *JAMA*. 1990, 263(8), p. 1123-6.
10. Mundy, GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2(8), p. 584-93.
11. Guise, TA et al. Cancer and bone. *Endocr Rev*. 1998, 19(1), p. 18-54.
12. Dodds, PR. The role of vertebral veins in the dissemination of prostatic carcinoma. *J Urol*. 1981, 126(6), p. 753-5.
13. Bok, RA. Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2(12), p. 918-26.
14. van der Pluijm, G et al. Interference with the microenvironmental support impairs the de novo formation of bone metastases in vivo. *Cancer Res*. 2005, 65(17), p. 7682-90.
15. Schneider, A et al. Bone turnover mediates preferential localization of prostate cancer in the skeleton. *Endocrinology*. 2005 , 146(4), p. 1727-36.
16. Guise, TA et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res*. 2006, 12(20 Pt 2), p. 6213s-6216s.
17. Yin, JJ. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest*. 1999 , 103(2), p. 197-206.
18. Guise, TA et al. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest*. 1996, 98(7), p. 1544-9.
19. Jones, DH et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. 2006 , 440(7084), p. 692-6.
20. Bhatia, P et al. Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB is inversely correlated with metastatic phenotype in breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005, 11(1), p. 162-5.
21. Mori, K et al. DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NFkappaB: new insights in the prostate cancer bone metastasis process. *Bone*. 2007, 40(4), p. 981-90.

22. Armstrong, AP et al. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate*. 2008, 68(1), p. 92-104.
23. Pearce, RN et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(20), p. 11581-6.
24. Ando, K et al. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. *Curr Drug Discov Technol*. 2008, 5(3), p. 263-8.
25. Carlini, MJ et al. Cross-talk between Tumor Cells and the Microenvironment at the Metastatic Niche. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011, [Epub ahead of print].
26. Schuettpelz, LG et al. Niche competition and cancer metastasis to bone. *J Clin Invest*. 2011, 121(4), p. 1253-5.
27. Alix-Panabières, C et al. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res*. 2008, 14(16), p. 5013-21.
28. Psaila, B et al. Priming the 'soil' for breast cancer metastasis: the pre-metastatic niche. *Breast Dis*. 2006, 26, p. 65-74.
29. —. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009 , 9(4), p. 285-93.
30. Mercadante, S. Malignant bone pain: pathophysiology and treatment. *Pain*. 1997, 69(1-2), p. 1-18.
31. Morony, S et al. The inhibition of RANKL causes greater suppression of bone resorption and hypercalcemia compared with bisphosphonates in two models of humoral hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology*. 2005, 146(8), p. 3235-43.
32. Nieder, C et al. Pathologic fracture and metastatic spinal cord compression in patients with prostate cancer and bone metastases. *BMC Urol*. 2010, 10, p. 23.
33. Pelosof, LC et al. Paraneoplastic syndromes: an approach to diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2010, 85(9), p. 838-54.
34. Coleman, RE. Skeletal complications of malignancy. *Cancer*. 1997, 80(8 Suppl), p. 1588-94.
35. Weinfurt, KP et al. The significance of skeletal-related events for the health-related quality of life of patients with metastatic prostate cancer. *Ann Oncol*. 2005, 16(4), p. 579-84.
36. Fleisch, HA et al. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest*. 1970, 1(1), p. 12-8.
37. Corrado, A et al. The bisphosphonates: chemical characteristics, skeletal biological effects and extra-skeletal effects. *Reumatismo*. 2005, 57(3), p. 142-53.
38. Pavlakis, N et al. Bisphosphonates for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005, (3), p. CD003474.
39. Saad, F et al. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2002, 94(19), p. 1458-68.
40. Jagdev, SP. Comparison of the effects of intravenous pamidronate and oral clodronate on symptoms and bone resorption in patients with metastatic bone disease. *Ann Oncol*. 2001, 12(10), p. 1433-8.
41. Saylor, PJ. Targeted therapies: Denosumab-a new option for solid tumors metastatic to bone. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011, 8(6), p. 322-4.
42. Stopeck, AT et al. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of

- bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol*. 2010, 28(35), p. 5132-9.
43. Fizazi, K et al. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet*. 2011, 377(9768), p. 813-22.
44. Henry, DH et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2011, 29(9), p. 1125-32.
45. Watts, NB et al. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010, 95(4), p. 1555-65.
46. Rogers, MJ et al. Bisphosphonates are incorporated into adenine nucleotides by human aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996, 224(3), p. 863-9.
47. Luckman, SP et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res*. 1998, 13(4), p. 581-9.
48. Russell, RG et al. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*. 2008, 19(6), p. 733-59.
49. Reid, TS et al. Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity. *J Mol Biol*. 2004, 343(2), p. 417-33.
50. Hughes, DE et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res*. 1995, 10(10), p. 1478-87.
51. Mundy, GR et al. Preclinical studies with zoledronic acid and other bisphosphonates: impact on the bone microenvironment. *Semin Oncol*. 2001, 28(2 Suppl 6), p. 35-44.
52. Tassone, P et al. Growth inhibition and synergistic induction of apoptosis by zoledronate and dexamethasone in human myeloma cell lines. *Leukemia*. 2000, 14(5), p. 841-4.
53. Senaratne, SG et al. The bisphosphonate zoledronic acid impairs Ras membrane localisation and induces cytochrome c release in breast cancer cells. *Br J Cancer*. 2002, 86(9), p. 1479-86.
54. Corbeel, L et al. Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. *Eur J Pediatr*. 2008, 167(7), p. 723-9.
55. Caraglia, M et al. Emerging anti-cancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates. *Endocr Relat Cancer*. 2006, 13(1), p. 7-26.
56. Kuroda, J et al. p53-independent anti-tumor effects of the nitrogen-containing bisphosphonate zoledronic acid. *Cancer Sci*. 2004, 95(2), p. 186-92.
57. Coxon, JP et al. Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU Int*. 2004, 94(1), p. 164-70.
58. Nogawa, M et al. Zoledronic acid mediates Ras-independent growth inhibition of prostate cancer cells. *Oncol Res*. 2005, 15(1), p. 1-9.
59. Reszka, AA et al. Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase. *J Biol Chem*. 1999, 274(49), p. 34967-73.

60. Nitrogen-bisphosphonates block development of myeloma bone disease: retinoblastoma phosphorylation and cell evidence for decreased osteolysis, tumor growth by inhibiting the cholesterol burden and angiogenesis, and increased biosynthetic pathway in a keratinocyte model survival. *J Bone Miner Res.* 2003, 18(3), p. 482-92.
61. Corey, E et al. Zoledronic acid exhibits 70. Fournier, P et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res.* 2002, 62(22), p. 6538-44.
62. Montague, R et al. Differential inhibition of 71. Bonjean, K et al. Zoledronate modulates endothelial cell surface receptors involved in invasion and proliferation by bisphosphonates: anti-metastatic potential of angiogenesis. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 2001, 42, p. 106.
63. Boissier, S et al. Bisphosphonates inhibit 72. Bezzi, M et al. Zoledronate sensitizes endothelial cells to tumor necrosis factor-induced programmed cell death: evidence for the suppression of sustained activation of breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res.* 2000, 60(11), p. 2949-54.
64. Cooper, CR et al. The role of alpha(v)beta(3) 73. Santini, D et al. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2002, 8(5), p. 1080-4.
65. Lerner, EC et al. Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *J Biol Chem.* 1995, 270(45), p. 26802-6.
66. Boquet, P. Bacterial toxins inhibiting or 74. —. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003, 9(8), p. 2893-7.
67. Denoyelle, C et al. New insights into the 75. Morita, CT et al. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *Br J Cancer.* 2003, 88(10), p. 1631-40.
68. Wood, J. Novel antiangiogenic effects of the 76. Tanaka, Y. Human gamma delta T cells and tumor immunotherapy. *J Clin Exp Hematop.* 2006, 46(1), p. 11-23.
69. Croucher, PI et al. Zoledronic acid treatment 77. Tanaka, Y et al. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature.* 1995, 375(6527), p. 155-8.
- of 5T2MM-bearing mice inhibits the

78. Gober, HJ. Human T cell receptor gamma delta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med.* 2003, 197(2), p. 163-8.
79. Dieli, F et al. Targeting human {gamma}delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2007, 67(15), p. 7450-7.
80. Meraviglia, S et al. In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol.* 2010, 161(2), p. 290-7.
81. Lang, JM et al. Pilot trial of interleukin-2 and zoledronic acid to augment $\gamma\delta$ T cells as treatment for patients with refractory renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2011, [Epub ahead of print].
82. Sakamoto, M et al. Adoptive immunotherapy for advanced non-small cell lung cancer using zoledronate-expanded $\gamma\delta$ T cells: a phase I clinical study. *J Immunother.* 2011, 34(2), p. 202-11.
83. Williams, G et al. Assessing tumor-related signs and symptoms to support cancer drug approval. *J Biopharm Stat.* 2004, 14(1), p. 5-21.
84. Kohno, N et al. Zoledronic acid significantly reduces skeletal complications compared with placebo in Japanese women with bone metastases from breast cancer: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol.* 2005, 23(15), p. 3314-21.
85. Theriault, RL et al. Pamidronate reduces skeletal morbidity in women with advanced breast cancer and lytic bone lesions: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol.* 1999, 17(3), p. 846-54.
86. Rosen, LS et al. Zoledronic acid is superior to pamidronate for the treatment of bone metastases in breast carcinoma patients with at least one osteolytic lesion. *Cancer.* 2004, 100(1), p. 36-43.
87. Saad, F et al. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004, 96(11), p. 879-82.
88. Rosen, LS et al. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, Phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer.* 2004, 100(12), p. 2613-21.
89. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in patients with bone metastases from renal cell carcinoma. Lipton, A et al. Davos, Switzerland : s.n., 2004. Seventh Workshop on Bisphosphonates — From the Laboratory to the Patient.
90. Survival-adjusted cumulative event analysis of skeletal-related events in patients with cancer metastatic to bone in trials of zoledronic acid. Major, PP et al. Davos, Switzerland : s.n., 2004. Seventh Workshop on Bisphosphonates — From the Laboratory to the Patient.
91. Adami, S et al. The acute-phase response after bisphosphonate administration. *Calcif Tissue Int.* 1987, 41(6), p. 326-31.
92. Zojer, N et al. Comparative tolerability of drug therapies for hypercalcaemia of malignancy. *Drug Saf.* 1999, 21(5), p. 389-406.
93. Maalouf, NM et al. Bisphosphonate-induced hypocalcemia: report of 3 cases and review of literature. *Endocr Pract.* 2006, 12(1), p. 48-53.
94. Miller, PD et al. Safety and efficacy of risedronate in patients with age-related reduced renal function as estimated by the Cockcroft and Gault method: a pooled

- analysis of nine clinical trials. *J Bone Miner Res.* 2005, 20(12), p. 2105-15.
95. Marx, RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003, 61(9), p. 1115-7.
96. Khosla, S et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2007, 22(10), p. 1479-91.
97. Migliorati, CA et al. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates in cancer: a narrative review. *Nat Rev Endocrinol.* 2011, 7(1), p. 34-42.
98. Coleman, RE et al. Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid. *J Clin Oncol.* 2005, Vol. 23(22), p. 4925-35.
99. Jung, K et al. Bone turnover markers as predictors of mortality risk in prostate cancer patients with bone metastases following treatment with zoledronic acid. *Eur Urol.* 2011, 59(4), p. 604-12.
100. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8(2):133-146.
101. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996;10(13):1580-1594.
102. Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 2000;14(6):627-644.
103. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 2002;296(5573):1646-1647.
104. Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 2002;23(6):787-823.
105. Roberts AB, Flanders KC, Heine UI, Jakowlew S, Kondaiah P, Kim SJ, Sporn MB. Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1990;327(1239):145-154.
106. Roberts AB, Kim SJ, Sporn MB. Is there a common pathway mediating growth inhibition by TGF-beta and the retinoblastoma gene product? *Cancer Cells* 1991;3(1):19-21.
107. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* 1992;41(3):557-559.
108. Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. Regulation of epithelial proliferation by TGF-beta. *Ciba Found Symp* 1991;157:66-74; discussion 75-80.
109. Sovak MA, Arsura M, Zanieski G, Kavanagh KT, Sonenshein GE. The inhibitory effects of transforming growth factor beta1 on breast cancer cell proliferation are mediated through regulation of aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression. *Cell Growth Differ* 1999;10(8):537-544.
110. Villanueva A, Garcia C, Paules AB, Vicente M, Megias M, Reyes G, de Villalonga P, Agell N, Lluís F, Bachs O, Capella G. Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 1998;17(15):1969-1978.
111. Engel ME, Datta PK, Moses HL. Signal transduction by transforming growth factor-beta: a cooperative paradigm with extensive negative regulation. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:111-122.

112. Howell GM, Sun L, Ziober BL, Wu SP, Brattain MG. The role of growth regulatory aberrations in progression of human colon carcinoma. *Cancer Metastasis Rev* 1993;12(3-4):275-286.
113. Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 1999;18(20):3098-3103.
114. Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 2002;71(5):731-740.
115. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113(6):685-700.
116. de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(1):1-11.
117. Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* 1992;257(5068):369-373.
118. Schlunegger MP, Grutter MG. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta 2. *Nature* 1992;358(6385):430-434.
119. Knaus P, Sebald W. Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGFbeta superfamily. *Biol Chem* 2001;382(8):1189-1195.
120. Lin SJ, Lerch TF, Cook RW, Jardetzky TS, Woodruff TK. The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction* 2006;132(2):179-190.
121. Wells RG, Gilboa L, Sun Y, Liu X, Henis YI, Lodish HF. Transforming growth factor-beta induces formation of a dithiothreitol-resistant type I/Type II receptor complex in live cells. *J Biol Chem* 1999;274(9):5716-5722.
122. Gilboa L, Nohe A, Geissendorfer T, Sebald W, Henis YI, Knaus P. Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell* 2000;11(3):1023-1035.
123. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-791.
124. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390(6659):465-471.
125. Marchuk DA. Genetic abnormalities in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Curr Opin Hematol* 1998;5(5):332-338.
126. D. Santini, A. Berruti, F. Bertoldo, V. Denaro, T. Ibrahim, C. Ripamonti, L. Trodella. *Linee guida AIOM* 2008
127. A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A, Suda T. *Bone*. 1995 Aug;17(2):137-44.
128. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. Flanagan AM, Chambers TJ. *Calcif Tissue Int*. 1991 Dec;49(6):407-15.
129. Diphosphonates inhibit human osteoblast secretion and proliferation. Khokher MA, Dandona P. *Metabolism*. 1989 Feb;38(2):184-7

130. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ. *J Clin Invest.* 1993 May;91(5):2004-11.
131. Structurally different bisphosphonates exert opposing effects on alkaline phosphatase and mineralization in marrow osteoprogenitors. Klein BY, Ben-Bassat H, Breuer E, Solomon V, Golomb G. *J Cell Biochem.* 1998 Feb 1;68(2):186-94.
132. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. *Clin Invest.* 1999 Nov;104(10):1363-74.
133. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Mönkkönen J, Auriola S, Chilton KM, Russell RG. *Bone.* 1999 May;24(5 Suppl):73S-79S.
134. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Mönkkönen J, Auriola S, Chilton KM, Russell RG. *Bone.* 1999 May;24(5 Suppl):73S-79S.
135. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. Zhang FL, Casey PJ. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:241-69.
136. A novel non-containing-nitrogen bisphosphonate inhibits both in vitro and in vivo angiogenesis. Hamma-Kourbali Y, Di Benedetto M, Ledoux D, Oudar O, Leroux Y, Lecouvey M, Kraemer M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 24;310(3):816-23.
137. Mechanisms of bisphosphonate effects on osteoclasts, tumor cell growth, and metastasis. Green JR, Clézardin P. *Am J Clin Oncol.* 2002 Dec;25(6 Suppl 1):S3-9.
138. Inhibition of matrix metalloproteinase-14 in osteosarcoma cells by clodronate. Heikkilä P, Teronen O, Hirn MY, Sorsa T, Tervahartiala T, Salo T, Konttinen YT, Halttunen T, Moilanen M, Hanemaaijer R, Laitinen M. *J Surg Res.* 2003 May 1;111(1):45-52.
139. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. Bernabeu C, Conley BA, Vary CP. *J Cell Biochem.* 2007 Dec 15;102(6):1375-88.
140. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. *Oncogene.* 2003 Sep 29;22(42):6557-63.
141. Endoglin (CD105) as a urinary and serum marker of prostate cancer. Fujita K, Ewing CM, Chan DY, Mangold LA, Partin AW, Isaacs WB, Pavlovich CP. *Int J Cancer.* 2009 Feb 1;124(3):664-9.
142. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, Ellis LM. *Clin Cancer Res.* 2008 Apr 1;14(7):1931-7.
143. Inhibitory effects of activin on the growth and morphogenesis of primary and transformed mammary epithelial cells. Liu QY, Niranjana B, Gomes P, Gomm JJ, Davies D, Coombes RC, Buluwela L. *Cancer Res.* 1996 Mar 1;56(5):1155-63.
144. Activins as regulators of branching morphogenesis. Ball EM, Risbridger GP. *Dev Biol.* 2001 Oct 1;238(1):1-12.
145. Down-regulation of activin, activin receptors, and Smads in high-grade breast cancer. Jeruss JS, Sturgis CD, Rademaker AW, Woodruff TK. *Cancer Res.* 2003 Jul 1;63(13):3783-90.
146. Activin A mediates growth inhibition and cell cycle arrest through Smads in human breast cancer cells. Burdette JE, Jeruss JS,

Kurley SJ, Lee EJ, Woodruff TK. *Cancer Res.* 2005 Sep 1;65(17):7968-75.

147. The activin A-follistatin system: potent regulator of human extracellular matrix mineralization. Eijken M, Swagemakers S, Koedam M, Steenbergen C, Derkx P, Uitterlinden AG, van der Spek PJ, Visser JA, de Jong FH, Pols HA, van Leeuwen JP. *FASEB J.* 2007 Sep;21(11):2949-60. Epub 2007 Apr 20.
148. Activin A promotes multiple myeloma-induced osteolysis and is a promising target for myeloma bone disease. Vallet S, Mukherjee S, Vaghela N, Hideshima T, Fulciniti M, Pozzi S, Santo L, Cirstea D, Patel K, Sohani AR, Guimaraes A, Xie W, Chauhan D, Schoonmaker JA, Attar E, Churchill M, Weller E, Munshi N, Seehra JS, Weissleder R, Anderson KC, Scadden DT, Raje N. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 16;107(11):5124-9. Epub 2010 Mar 1.
149. Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis. Cunha SI, Pardali E, Thorikay M, Anderberg C, Hawinkels L, Goumans MJ, Seehra J, Heldin CH, ten Dijke P, Pietras K. *J Exp Med.* 2010 Jan 18;207(1):85-100. Epub 2010 Jan 11.