



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in  
Patologia Osteoncologica  
XXVII ciclo anno 2012

**ATEROSCLEROSI E OSTEOPOROSI  
INDOTTA DA INIBITORI  
DELL'AROMATASI IN DONNE CON  
STORIA DI TUMORE MAMMARIO:  
studio clinico sperimentale**

**Chiara Spoto**

Coordinatore:  
***Prof Giuseppe Tonini***

Tutore:  
***Dott. Francesco Pantano***

29 Luglio 2016

1

*Chiara Spoto*

## Sommario

<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>4</b>
<b>1. CARCINOMA MAMMARIO E TERAPIA ORMONALE ADIUVANTE.....</b>	<b>4</b>
1.1 EPIDEMIOLOGIA DEL TUMORE MAMMARIO.....	4
1.2 EZIOLOGIA E PATOGENESI DEL TUMORE MAMMARIO.....	4
1.3 CLASSIFICAZIONE DEL TUMORE MAMMARIO.....	7
1.3.1 Classificazione molecolare.....	7
1.3.2 Classificazione clinica in stadi .....	9
1.4 TRATTAMENTO DEL CARCINOMA MAMMARIO INFILTRANTE OPERABILE.....	12
1.4.1 Trattamenti loco regionali.....	12
1.4.2 Trattamenti medici in adiuvante.....	14
1.4.2.1 Ormonoterapia adiuvante.....	16
1.4.3 Gli Inibitori dell'aromatasi.....	19
<b>2. OSTEOPOROSI E INIBITORI DELL'AROMATASI.....</b>	<b>23</b>
2.1 METABOLISMO OSSEO.....	23
2.2 OSTEOPOROSI.....	26
2.3 BONE HEALTH NEL PAZIENTE IN TERAPIA ONCOLOGICA SISTEMICA PER IL CARCINOMA MAMMARIO.....	29
<b>3. EVENTI AVVERSI CARDIOVASCOLARI E INIBITORI DELL'AROMATASI.....</b>	<b>35</b>
<b>4. OSTEOPOROSI, CALCIFICAZIONE AORTICA ED ATROSCLEROSI: RAZIONALE DELLO STUDIO.....</b>	<b>38</b>

<b>OBIETTIVI DELLO STUDIO.....</b>	<b>42</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>42</b>
Popolazione e disegno dello studio.....	42
Mineralometria Ossea Computerizzata.....	45
Tomografia Computerizzata.....	47
Analisi statistica.....	48
<b>RISULTATI.....</b>	<b>49</b>
<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>64</b>
<b>PROSPETTIVE FUTURE.....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>68</b>

## **1. CARCINOMA MAMMARIO E TERAPIA ORMONALE ADIUVANTE**

### **INTRODUZIONE**

#### **1.1 EPIDEMIOLOGIA DEL TUMORE MAMMARIO**

Il carcinoma della mammella è la più comune neoplasia maligna non cutanea nelle donne. Una donna che vive sino a 90 anni ha una possibilità su otto di sviluppare un carcinoma della mammella.

In Italia, il tasso di incidenza standardizzato di tumore della mammella nelle donne è 114/100.000/anno e il tasso di mortalità standardizzato è 24/100.000/anno. Non considerando i carcinomi cutanei, il carcinoma mammario è la neoplasia più diagnosticata nelle donne<sup>1</sup>.

Il carcinoma mammario rappresenta la prima causa di morte per tumore nelle donne, rappresentando il 28% delle cause di morte oncologica prima dei 50 anni, il 21% tra i 50 e i 69 anni e il 14% dopo i 70 anni. Dalla fine degli anni Ottanta si osserva una moderata, ma continua tendenza alla diminuzione della mortalità per carcinoma mammario (-1,6%/anno), attribuibile all'efficacia dello screening, almeno in alcune fasce d'età (ed ai progressi terapeutici, in particolar modo alle terapie multimodali)<sup>2</sup>.

#### **1.2 EZIOLOGIA E PATOGENESI DEL TUMORE MAMMARIO**

I maggiori fattori di rischio per lo sviluppo del carcinoma della mammella sono ormonali e genetici. I carcinomi della mammella possono, perciò, essere suddivisi in casi sporadici, probabilmente correlati all'esposizione ormonale, e casi ereditari, associati con mutazioni della linea germinale. La nostra attenzione si focalizzerà essenzialmente sui carcinomi sporadici. Tali forme riconoscono infatti come fattori di rischio: l'esposizione ormonale, la gravidanza, l'allattamento, l'anamnesi riproduttiva, età del menarca e della menopausa e l'uso di estrogeni esogeni. La

maggior parte di queste neoplasie si sviluppa nelle donne dopo la menopausa ed è ER (Estrogen Receptor) -positiva.

L'esposizione ormonale stimola lo sviluppo della mammella durante la pubertà, nei cicli mestruali e in gravidanza poiché le fisiologiche cellule mammarie esprimono recettori per gli estrogeni (ER). L'esposizione stimola cicli di proliferazione che espongono le cellule a possibili danni del DNA. Quando sono presenti cellule precancerose o maligne, gli ormoni possono stimolare la crescita, così come la crescita delle normali cellule epiteliali e stromali che possono partecipare allo sviluppo tumorale. Gli estrogeni possono avere un ruolo più diretto nella carcinogenesi. I metaboliti degli estrogeni possono causare mutazioni o generare radicali liberi dannosi per il DNA nelle cellule e nei modelli animali<sup>3</sup>.

E' stato anche proposto che le varianti nei geni coinvolti nella sintesi e nel metabolismo degli estrogeni potrebbero contribuire ad un maggior rischio di carcinoma della mammella. Come avviene per la resistenza al Tamoxifene in donne con alterazione del citocromo P450<sup>4</sup>.

Il diverso aspetto istologico dei carcinomi e delle lesioni che precorrono il tumore rappresenta la manifestazione estrinseca delle modificazioni genetiche ed epigenetiche che portano alla carcinogenesi. Un modello di tumorigenesi ipotizza che una cellula normale debba acquisire alcune nuove proprietà per diventare maligna<sup>5</sup>. Ognuna di queste può essere acquisita mediante un cambiamento in uno dei molti geni che regolano le attività cellulari.

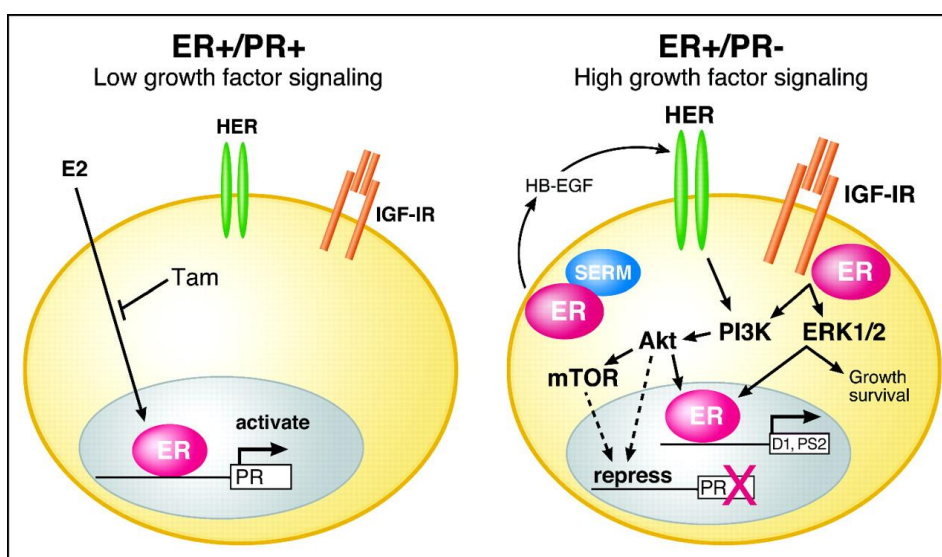


Figura 1: Cellula tumorale con sovra espressione di ER/PR

Le popolazioni cellulari che ospitano alcune, ma non tutte, le modificazioni genetiche ed epigenetiche richieste per la carcinogenesi danno luogo a lesioni della mammella morfologicamente riconoscibili associate ad un aumento del rischio di progressione tumorale (Figura 1). Le prime alterazioni sono modificazioni proliferative che possono derivare dalla perdita di segnali d'inibizione della crescita, inteso come aumento aberrante dei segnali di crescita o come una diminuzione dell'apoptosi. Per esempio, la maggior parte delle lesioni (quali l'iperplasia duttale e lobulare atipica) mostra un'abnorme espressione di recettori ormonali e un'anomala regolazione della proliferazione<sup>6</sup>.

La LOH (Loss Of Heterozygosity - perdita dell'eterozigosi) è individuata raramente nelle iperplasie senza atipie, ma diventa più frequente nelle forme atipiche ed è quasi sempre associata a carcinoma in situ. Una profonda instabilità del DNA sotto forma di aneuploidia, che si manifesta morfologicamente come ingrandimento, irregolarità e ipercromasia nucleare, si osserva solo in alcuni carcinomi di alto grado e in alcuni carcinomi invasivi. A un certo punto della progressione tumorale il clone maligno viene immortalizzato e acquisisce la capacità di indurre “ neo-angiogenesi”.

L' “ipotesi delle cellule staminali neoplastiche” suggerisce che le modificazioni maligne avvengano in una popolazione di cellule staminali con proprietà uniche che le distinguono dalle cellule più differenziate<sup>7</sup>. Sebbene le cellule tumorali contengano progenie di cellule non staminali, solo le staminali maligne contribuirebbero alla progressione e crescita tumorale.

Il tipo di cellule che più probabilmente è all'origine della maggior parte dei carcinomi della mammella è la cellula luminale che esprime ER, poiché la maggioranza delle neoplasie è ER- positiva e le precancerosi, quali le iperplasie atipiche, sono molto simili a questo tipo di cellule. Viceversa i tumori ER-negativi possono o derivare da una cellula mioepiteliale ER-negativa (ciò spiegherebbe perché molte proteine mioepiteliali siano molto più espresse nei tumori “ tripli negativi o basalioidi”), o un'alternativa potrebbe essere un precursore ER-positivo che perde l'espressione di ER.

L'ultima fase della carcinogenesi, la transizione tra carcinoma in situ e carcinoma invasivo, resta, purtroppo, poco conosciuta. E' importante ricordare che la struttura e la funzione della mammella normale dipendono da interazioni complesse tra le cellule staminali, le cellule mioepiteliali e le cellule stromali. Le stesse funzioni che permettono la normale formazione di nuove diramazioni duttali e lobulari nel corso della pubertà e gravidanza (perdita della membrana basale, aumento della proliferazione, perdita dell' inibizione della crescita, angiogenesi, invasione stromale), possono essere ricapitolate durante la tumorigenesi<sup>8</sup>. Il rimodellamento del seno, che comprende reazioni infiammatorie simili alla rimarginazione delle ferite, può spiegare l'attuale aumento di carcinomi durante e dopo la gravidanza.

### **1.3 CLASSIFICAZIONE DEL TUMORE MAMMARIO**

#### **1.3.1 Classificazione molecolare**

Il carcinoma della mammella è una malattia eterogenea e pazienti con tumori apparentemente simili per caratteristiche clinico-patologiche possono presentare un decorso clinico diverso. In seguito ad indagini di biologia molecolare sono stati individuati quattro sottotipi di carcinomi invasivi<sup>9</sup>.

- “luminali A”: neoplasie con espressione dei recettori ormonali, a prognosi favorevole;
- “luminali B”: neoplasie che, pur possedendo l'espressione dei recettori ormonali, hanno un rischio di recidiva elevato, a causa dell'elevato indice proliferativo correlato ad alta espressione dei geni di proliferazione;
- “HER2”: presenza di espressione di HER2;
- “basal like”: neoplasie caratterizzate dall'assenza di espressione dei recettori ormonali e di HER2 e da una aumentata espressione delle citocheratine (mioepiteliali) basali (CK5/6 e CK 17).

All'interno di questi sottotipi esiste un'elevata eterogeneità. Alla luce delle nuove conoscenze patologiche e molecolari vi è una definizione di ulteriori sottotipi di carcinoma mammario. La creazione di linee cellulari derivanti di ciascun sottotipo

ha poi permesso di mostrare una diversa sensibilità agli agenti chemioterapici e alle terapie target.

Nella pratica clinica, la valutazione immunohistochimica dello stato dei recettori ormonali, del Ki67 e di HER2, permette di identificare i 4 sottogruppi fenotipici di carcinoma mammario che presentano una “relativa” corrispondenza con le 4 derivate dai profili di espressione genica<sup>10</sup>.

I gruppi immunofenotipici di rilevanza clinica e con implicazioni terapeutiche importanti, anche a livello di terapia adiuvante, sono:

1. –“luminal A-like”: recettori ormonali positivi, HER2 negativo e bassa attività proliferativa (di cui fanno parte frequentemente alcuni istotipi speciali quali carcinoma tubulare, carcinoma lobulare tipo classico);
2. –“luminal B-like/ HER2 negative”: recettori ormonali positivi, HER2 negativo ed alta attività proliferativa;
3. –“luminal B-like /HER2 positive”: recettori ormonali positivi, HER2 sovraespresso (score 3+ delle reazioni di immunohistochimica) o amplificato, qualsiasi valore di attività proliferativa;
4. –“HER2 positive” (non luminali): HER2 sovraespresso (score 3+ delle reazioni di immunohistochimica) o amplificato (FISH o altre metodiche) ed entrambi i recettori ormonali negativi;
5. –“triple negative”: assenza di espressione dei recettori ormonali e negatività di HER2. La corrispondenza tra il fenotipo “triplo negativo” individuato su base immunohistochimica e il sottogruppo intrinseco “basal like” individuato su base genica, esiste solo nell’80% circa dei casi, a dimostrazione ulteriore dell’estrema eterogeneità presente all’interno di questi sottogruppi. All’interno del sottogruppo “triplo negativo” sono compresi alcuni istotipi speciali come il midollare tipico e l’adenoido-cistico, a basso rischio di ripresa. Analisi retrospettive hanno associato i quattro sottotipi a differenze in sopravvivenza libera da malattia, sedi di ripresa di malattia e sopravvivenza globale.



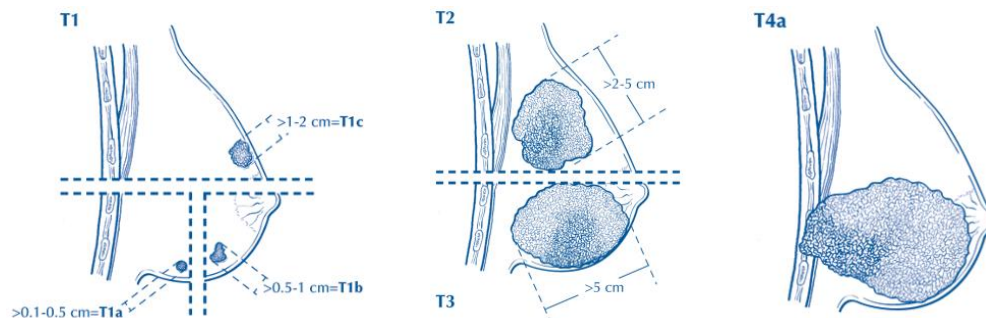
### 1.3.2 Classificazione in stadi clinici

Per comprendere l'algoritmo terapeutico del carcinoma mammario è necessario anzitutto effettuare una classificazione in stadi clinici del tumore.

L'estensione della malattia è descritta con criteri classificativi tradizionali e il sistema TNM è il più frequentemente adottato. Dal gennaio 2010 è in uso il sistema di classificazione TNM rivisto dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC-settima edizione) (Tabelle 1-3: stadiazione clinica prechirurgica)<sup>11</sup>.

**Tabella 1. Classificazione clinica secondo T (estensione)**

TX	Primary tumor cannot be assessed.
T0	No evidence of primary tumor.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
Tis (DCIS)	DCIS.
Tis (LCIS)	LCIS.
Tis (Paget)	Paget disease of the nipple NOT associated with invasive carcinoma and/or carcinoma <i>in situ</i> (DCIS and/or LCIS) in the underlying breast parenchyma. Carcinomas in the breast parenchyma associated with Paget disease are categorized based on the size and characteristics of the parenchymal disease, although the presence of Paget disease should still be noted.
T1	Tumor $\leq 20$ mm in greatest dimension.
T1mi	Tumor $\leq 1$ mm in greatest dimension.
T1a	Tumor $> 1$ mm but $\leq 5$ mm in greatest dimension.
T1b	Tumor $> 5$ mm but $\leq 10$ mm in greatest dimension.
T1c	Tumor $> 10$ mm but $\leq 20$ mm in greatest dimension.
T2	Tumor $> 20$ mm but $\leq 50$ mm in greatest dimension.
T3	Tumor $> 50$ mm in greatest dimension.
T4	Tumor of any size with direct extension to the chest wall and/or to the skin (ulceration or skin nodules).c
T4a	Extension to the chest wall, not including only pectoralis muscle adherence/invasion.
T4b	Ulceration and/or ipsilateral satellite nodules and/or edema (including peau d'orange) of the skin, which do not meet the criteria for inflammatory carcinoma.
T4c	Both T4a and T4b.
T4d	Inflammatory carcinoma.



**Tabella 2. Classificazione clinica secondo N (estensione linfonodale)**

<i>Clinical</i>	
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed (e.g., previously removed).
N0	No regional lymph node metastases.
N1	Metastases to movable ipsilateral level I, II axillary lymph node(s).
N2	Metastases in ipsilateral level I, II axillary lymph nodes that are clinically fixed or matted.
	OR Metastases in clinically detected ipsilateral internal mammary nodes in the <i>absence</i> of clinically evident axillary lymph node metastases.
N2a	Metastases in ipsilateral level I, II axillary lymph nodes fixed to one another (matted) or to other structures.
N2b	Metastases only in clinically detected ipsilateral internal mammary nodes and in the <i>absence</i> of clinically evident level I, II axillary lymph node metastases.
N3	Metastases in ipsilateral infraclavicular (level III axillary) lymph node(s) with or without level I, II axillary lymph node involvement.
	OR
	Metastases in clinically detected ipsilateral internal mammary lymph node(s) with clinically evident level I, II axillary lymph node metastases.
	OR
	Metastases in ipsilateral supraclavicular lymph node(s) with or without axillary or internal mammary lymph node involvement.
N3a	Metastases in ipsilateral infraclavicular lymph node(s).
N3b	Metastases in ipsilateral internal mammary lymph node(s) and axillary lymph node(s).
N3c	Metastases in ipsilateral supraclavicular lymph node(s).

**Tabella 3. Classificazione secondo M (metastasi a distanza)**

M0	No clinical or radiographic evidence of distant metastases.
cM0(+)	No clinical or radiographic evidence of distant metastases, but deposits of molecularly or microscopically detected tumor cells in circulating blood, bone marrow, or other nonregional nodal tissue that are $\leq 0.2$ mm in a patient without symptoms or signs of metastases.
M1	Distant detectable metastases as determined by classic clinical and radiographic means and/or histologically proven $>0.2$ mm.

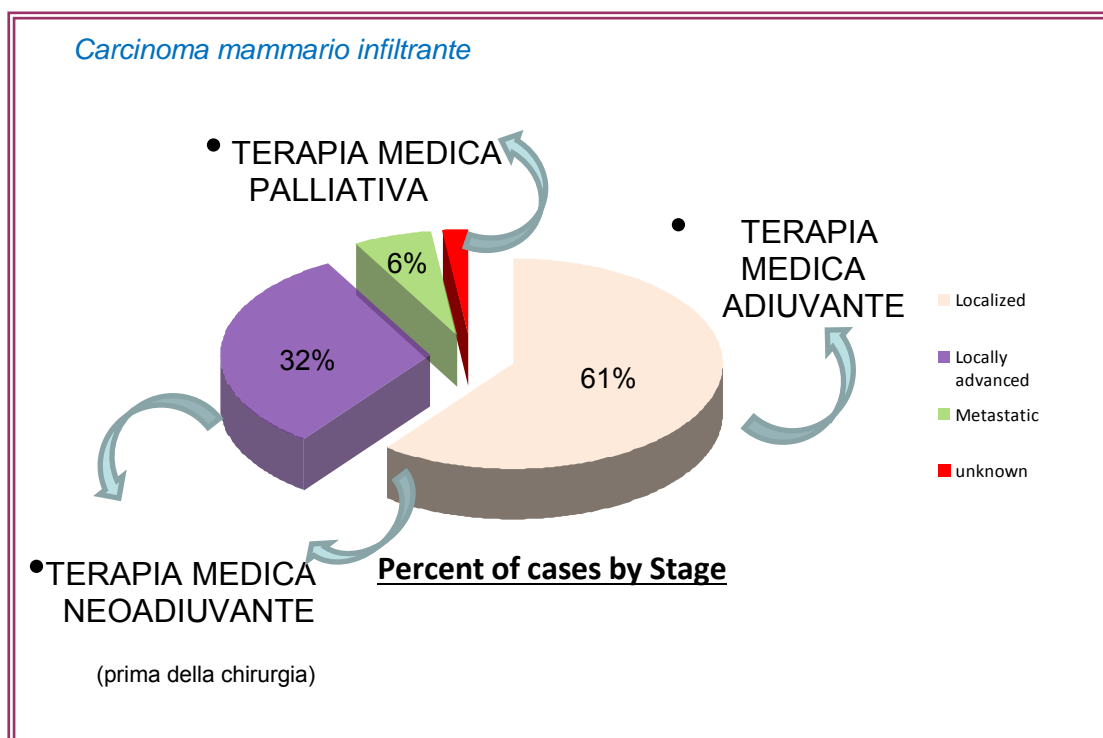
In base a questa classificazione il carcinoma mammario è suddivisibile in diversi stadi (tabella 4):

Classificazione in stadi del carcinoma mammario –AJCC 2009			
Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio IA	T1	N0	M0
Stadio IB	T0-T1	<b>N1mi</b>	M0
Stadio IIA	T0-T1	N1	M0
	T2	N0	
Stadio II B	T2	N1	M0
	T3	N0	

Stadio IIIA	T3 T1-T3	N1 N2	M0
Stadio IIIB	T4	N0-N2	M0
Stadio IIIC	anyT	N3	M0
Stadio IV	anyT	Any M	M1

**Tabella 4. Classificazione in stadi del carcinoma mammario –AJCC 2009**

In base alla stadiazione clinica della malattia si parlerà di “MALATTIA OPERABILE” (stadio I, II, IIIA), “MALATTIA LOCALMENTE AVANZATA (IIIA, IIIB, IIIC e carcinoma infiammatorio), E “MALATTIA METASTATICA”(stadio IV) . Nei suddetti macrogruppi di malattia le armi terapeutiche disponibili (chirurgia, radioterapia e terapia medica) si integrano tra loro in modo differente. Nella immagine che segue viene esposta ad esempio, con riferimenti alle percentuali di stadiazione di malattia alla diagnosi, la modalità di inserimento della terapia medica nei tre diversi panorami terapeutici:



**Figura 2: ruolo della terapia medica nella malattia operabile, localmente avanzata o metastatica.**

In questa sede tratteremo solo del carcinoma mammario operabile soffermandoci soprattutto sulla terapia medica post chirurgica (ADIUVANTE) con particolare attenzione a quella ormonale.

## **1.4 TRATTAMENTO DEL CARCINOMA MAMMARIO INFILTRANTE OPERABILE**

### **1.4.1 Trattamenti locoregionali**

I trattamenti locoregionali nella malattia definita “operabile” consistono nella chirurgia e radioterapia. L’algoritmo terapeutico classico prevede la chirurgia radicale sul primitivo e quindi eventuali trattamenti “adiuvanti”. In alcune condizioni però, così come nella malattia “localmente avanzata”, la terapia medica può precedere la chirurgia.

Indipendentemente da quando inserita nell’algoritmo terapeutico, la chirurgia mammaria radicale si avvale di due principali tecniche, mastectomia e chirurgia conservativa (miglior risultato estetico, sempre seguita da radioterapia adiuvante) e la chirurgia sul cavo ascellare può talvolta prescindere dalla dissezione ascellare grazie all’introduzione della tecnica della dissezione selettiva del linfonodo sentinella (LS). Studi randomizzati hanno dimostrato che non esistono differenze in termini di sopravvivenza tra la mastectomia con dissezione ascellare e la chirurgia conservativa (quadrantectomia) seguita da radioterapia adiuvante<sup>12</sup>. La scelta del tipo di intervento a livello mammario (chirurgia radicale vs conservativa) dipende dalle dimensioni del tumore, dalla localizzazione, dal rapporto tumore/dimensioni della mammella, dalle caratteristiche mammografiche, dalla preferenza della paziente e dalla presenza o meno di controindicazioni alla RT (radioterapia).

La dissezione selettiva del linfonodo sentinella (LS) è da considerare uno standard terapeutico per le pazienti con carcinoma mammario stadio clinico I-II e linfonodi clinicamente negativi o con linfonodi clinicamente sospetti ma con successivo agoaspirato negativo.

La dissezione ascellare con asportazione di almeno 10 linfonodi per la valutazione patologica accurata dell'ascella<sup>13</sup> è indicata:

- in presenza di linfonodi ascellari clinicamente sospetti per metastasi;
- in presenza di linfonodo sentinella positivo con macrometastasi all'esame istologico;
- nel caso di mancato reperimento del linfonodo sentinella;
- nei tumori T4 e nel carcinoma infiammatorio.

Alla luce dei risultati dello studio multicentrico di fase III (IBCSG 23- 01) in cui 934 pazienti con diagnosi di carcinoma mammario  $\leq$  cT2 e cN0 e con micrometastasi in uno o più linfonodi sentinella sono state randomizzate a ricevere una dissezione ascellare verso nessuna dissezione ascellare, in presenza di micro metastasi nel linfonodo sentinella la successiva dissezione ascellare potrebbe essere omessa. (Ad un follow mediano di 5 anni la sopravvivenza libera da malattia era 87,7% (95% CI 84,4—91,2) nel gruppo non sottoposto a dissezione ascellare e 84,4% (80,7—88,1) nel gruppo trattato con dissezione ascellare)<sup>14</sup>.

La RT dopo chirurgia conservativa riduce il rischio di ogni ricaduta (locoregionale o a distanza) di malattia a 10 anni dal 35% al 19,3% ( $p < 0,00001$ ), con un rischio proporzionale di ricaduta ridotto di circa il 50% ed una riduzione in termini assoluti pari al 15,7%. Inoltre la RT è associata ad una riduzione assoluta di mortalità a 15 anni per carcinoma mammario del 3,8% ( $p = 0,00005$ ) e per ogni causa del 3% ( $p = 0,03$ ). Il trattamento radioterapico deve comprendere tutta la mammella residua.

Sebbene il tipo di frazionamento "standard" sia quello di 50 Gy in 25 frazioni/ 5 volte alla settimana, uno studio canadese ha dimostrato che, per pazienti selezionate, uno schema ipofrazionato (42,5 Gy/16 frazioni/22 giorni) può essere un'accettabile alternativa sia in termini di controllo locale di malattia sia in termini di risultati cosmetici. L'aggiunta di un supplemento di dose (boost di 10-16 Gy) sul letto tumorale riduce il rischio di ricaduta locale (HR= 0,59;  $p < 0,0001$ ) senza generalmente aggiungere tossicità al trattamento, e con un modesto impatto sul risultato estetico<sup>15</sup>. Dopo mastectomia, la radioterapia della parete toracica è indicata per tumori primitivi  $> 5$  cm ( $pT \geq 3$ ), per i tumori che infiltrano la cute e/o il muscolo pettorale e/o la parete toracica, e nel caso di interessamento metastatico di 4 o più linfonodi ascellari.

Dopo mastectomia, l'irradiazione dei linfonodi regionali (regioni sopra-sottoclaveare  $\pm$  catena mammaria interna) indicata nelle pazienti con tumori pT3-T4 (indipendentemente dallo stato linfonodale) e nei pT1-2 con 4 o più linfonodi ascellari positivi. Tuttavia si sta estendendo l'indicazione anche alle pazienti con tumori pT1-2 con 1-3 linfonodi ascellari positivi soprattutto in caso di parametri biologici sfavorevoli.

In caso di margini di resezione positivi è ragionevole prendere in considerazione la re-escissione chirurgica o la mastectomia soprattutto quando l'interessamento del margine non è soltanto focale. Se non è possibile eseguire il re-intervento (comunque raccomandato), è pratica corrente la somministrazione di un supplemento di dose di radioterapia sul letto tumorale (15-20 Gy), pur in mancanza di studi che ne supportino l'indicazione<sup>16</sup>.

#### **1.4.2 Trattamenti medici in adiuvante**

Il trattamento sistemico adiuvante deve essere preso in considerazione dopo il trattamento chirurgico in considerazione della significativa riduzione del rischio di recidiva e di morte ottenuta con la polichemioterapia, con la terapia endocrina e con la terapia biologica (trastuzumab) in tale setting<sup>17</sup>.

La decisione di quale o quali terapie utilizzare nella singola paziente richiede una attenta valutazione di:

- fattori prognostici, che definiscono l'entità del rischio di ripresa;
- fattori predittivi di risposta ai trattamenti (ER, indice proliferativo, HER2) ;
- benefici attesi dal trattamento in termini di percentuale di beneficio assoluto ed effetti collaterali attesi;
- comorbidità della paziente;
- preferenza della paziente.

Mentre per la definizione del rischio ci si basa sui fattori prognostici che non devono essere analizzati singolarmente ma collegati tra di loro, per la scelta del trattamento a tutt'oggi sono solo due i fattori predittivi universalmente accettati: lo stato dei recettori ormonali e quello di HER-2.

Per definire con maggiore precisione la prognosi e selezionare il miglior trattamento per la singola paziente si stanno studiando profili genici con un numero più limitato di geni ed alcuni di questi test, valutati prevalentemente in studi retrospettivi, sono già in uso in alcuni Paesi. Sono oggi disponibili in commercio vari test di analisi dei profili genici come Prosigna, Mammaprint, Oncotype DX e Breast cancer Index. Tutti e quattro questi richiedono tessuto paraffinato, mentre il Mammaprint può essere eseguito anche su tessuto fresco congelato. I primi due (Prosigna e Mammaprint) sono stati approvati in USA dall'FDA<sup>18</sup>.

Tutte queste “firme”, tuttavia, necessitano ancora di essere validate su base prospettica.

Pur non essendo ancora possibile utilizzare i profili genici nella pratica clinica italiana, la semplice valutazione con l'immunoistochimica dei recettori per gli estrogeni e per il progesterone, dello stato di HER-2 e del Ki67 sembra essere in grado di consentire una classificazione corrispondente a quella dei profili genici, a fronte di una maggiore maneggevolezza nella pratica clinica.

In tal modo, sulla base dell'immunoistochimica, possono essere identificati i seguenti sottogruppi di carcinoma mammario, nei quali sono differenti le indicazioni terapeutiche sistemiche adiuvanti (vedi figura 3):

Intrinsic subtype	Clinicopathologic surrogate definition	Tipo di terapia
Luminal A	'Luminal A-like' ER-positive HER2-negative Ki67 low* PgR high** low-risk molecular signature (if available)	La terapia endocrina rappresenta l'intervento più utilizzato; è spesso usata anche da sola
Luminal B	'Luminal B-like (HER2-negative)' ER-positive HER2-negative and either Ki67 high or PgR low high-risk molecular signature (if available)	Terapia endocrina per tutte le pazienti, chemioterapia per la maggior parte
	'Luminal B-like (HER2-positive)' ER-positive HER2-positive any Ki67 any PgR	Chemioterapia+ anti-HER2+terapia endocrina
HER2 overexpression	'HER2-positive (non-luminal)' HER2-positive ER and PgR absent	Chemioterapia + anti-HER2
'Basal-like'	'Triple-negative (ductal)' ER and PgR absent HER2-negative	Chemioterapia

Figura 3: 2015 St Gallen Consensus Conference → TRATTAMENTI SISTEMICI RACCOMANDATI

Tale classificazione indirizza inoltre la successiva decisione terapeutica in termini di tipologia (es: nei "Luminal" propenderò ad esempio per un'ormonoterapia, negli HER2 positivi aggiungerò un trastuzumab adiuvante) o grado di necessità in base al rischio stimato di recidiva (nei Luminal B, tumori con più alto indice di proliferazione, assocerò più facilmente una chemioterapia alla ormonoterapia adiuvante, etc etc). (vedi figura 3)

#### 1.4.2.1 Ormonoterapia adiuvante

L'ormonoterapia è indicata per le pazienti con tumori ormonoresponsivi, intendendo per questi la presenza di dimostrata ER-positività ( $\geq 1\%$ ) oppure PgR-positività ( $\geq 1\%$ ) immunoistochimica; non vi è alcuna indicazione nei tumori con recettori ormonali negativi (ER e PgR negativo:  $< 1\%$ ).

I meccanismi di azione fondamentali dell'ormonoterapia sono sostanzialmente tre:



1. impedire alla cellula tumorale di essere influenzata dagli ormoni prodotti dall'organismo attraverso la somministrazione di un antiestrogeno (Tamoxifen);

2. inibire la produzione di estrogeni, bloccando l'azione di un enzima, aromatasi, che trasforma gli androgeni in estrogeni (inibitori dell'aromatasi);

Anastrozolo (Arimidex®), letrozolo (Femara®) ed exemestane (Aromasin®).

3. inibire la produzione degli estrogeni prodotti dalle ovaie utilizzando gli analoghi dell'LHRH (ablazione ovarica).

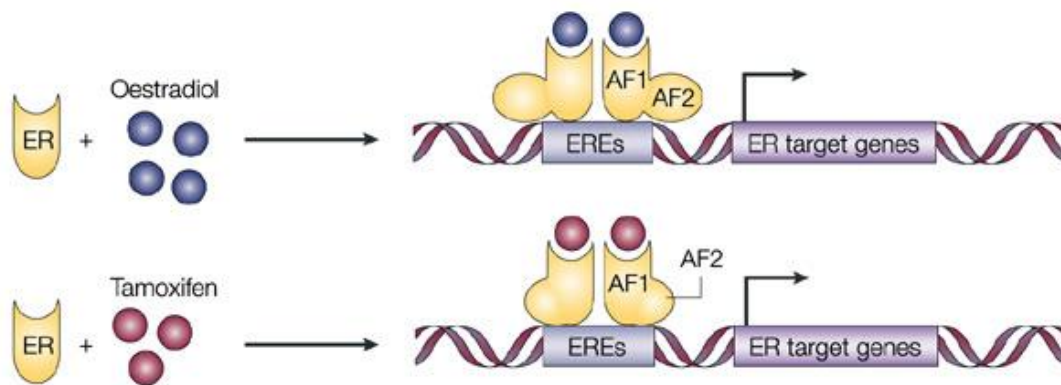
(triptorelina embonato(Decapeptyl®), goserelin (Zoladex®), leucoporelina acetato (Enantone®))

La scelta del trattamento è determinata principalmente dallo stato menopausale della paziente.

Nei diversi studi di ormonoterapia adiuvante nel carcinoma mammario sono state utilizzate varie definizioni di menopausa. Lo stato di menopausa dovrebbe essere definito da uno dei seguenti criteri:

- Annessiectomia bilaterale;
- Età > 60 anni;
- Età < 60 anni e amenorrea da almeno 12 mesi in assenza di chemioterapia, tamoxifene, toremifene e valori di FSH e estradiolo nei range di menopausa;
- In caso di assunzione di tamoxifene o toremifene e età < 60 anni, amenorrea da almeno 12 mesi, e valori di FSH e estradiolo nei range di menopausa;
- Non è possibile stabilire lo stato menopausale delle pazienti in trattamento con LHRHa.

Nelle pazienti in premenopausa o perimenopausa con diagnosi di carcinoma mammario infiltrante operato ER-positivo e/o PgR positivo indipendentemente dalle altre caratteristiche della neoplasia, Tamoxifene per 5 anni dovrebbe essere considerato in prima intenzione.



**Figura 4: azione del Tamoxifene sulla cellula tumorale**

Nelle donne con tumori con recettori per gli estrogeni positivi, il tamoxifene riduce significativamente il rischio annuale di recidive del 39% e di morte per tumore della mammella del 31%, rispetto a controllo, indipendentemente dall'utilizzo della chemioterapia, dall'età, dallo stato menopausale, dallo stato linfonodale e dallo stato del recettore per il progesterone. Ad un follow-up di 15 anni, tamoxifene per 5 anni determina una riduzione assoluta del rischio di recidive e di morte dell' 11,8% e del 9,2% rispettivamente (Figura 4). La dose consigliata è di 20 mg/os/ al giorno, e la durata standard del trattamento è di 5 anni.

Nelle pazienti con diagnosi di carcinoma mammario infiltrante operato ER-positivo e/o PgR positivo ancora in premenopausa o perimenopausa dopo 5 anni di terapia ormonale adiuvante con Tamoxifene, potrebbe essere considerata la prosecuzione di Tamoxifene per ulteriori 5 anni<sup>19</sup>.

Nonostante l'aggiunta dell'LHRH analogo al tamoxifene sembra avere un beneficio marginale in termini di recidiva e di morte, l'utilizzo di tale combinazione evita l'aumento dei livelli di estradiolo plasmatico che si verifica con il solo tamoxifene riducendo le tossicità che ne possono derivare come cisti ovariche o metrorragie.

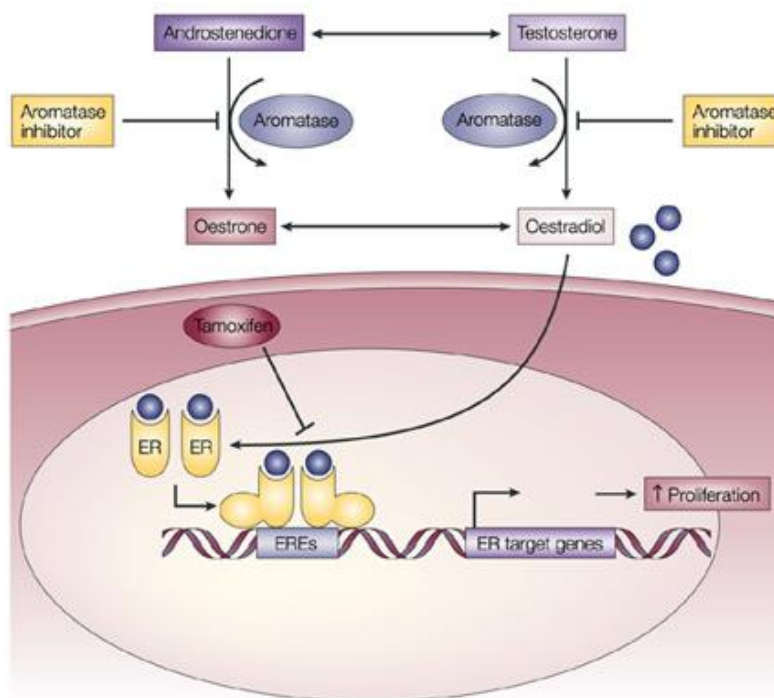
Il ruolo dell'LHRHa in premenopausa è stato valutato recentemente nell'ambito dello studio SOFT che ha incluso 3066 donne con carcinoma mammario operato con recettori ormonali positivi randomizzate a ricevere 5 anni di tamoxifene (n=1018), o soppressione ovarica in aggiunta a tamoxifene (n=1015) o exemestane (n= 1014)<sup>20</sup>. L'analisi primaria dello studio ha confrontato il trattamento con solo tamoxifene rispetto alla combinazione di tamoxifene più soppressione ovarica. Ad un follow

mediano di 5.6 anni l'aggiunta della soppressione ovarica si è tradotta in un piccolo ma non significativo vantaggio in disease free survival (86,6% vs 84,7%; HR = ,83; 95% CI, 0,66-1,04; P=,10). Nella coorte di pazienti che avevano ricevuto chemioterapia, l'aggiunta della soppressione ovarica ha ridotto il rischio di recidiva del 22% (HR=,78; 95% CI, 0,49-0,87). Nella coorte di paziente che non avevano ricevuto chemioterapia, la DFS a 5 anni era del 95.8% con il solo tamoxifene rispetto al 95,1% con la combinazione di tamoxifene e soppressione ovarica (HR= 0,95; 95% CI, 0,54-1,69) .

Sulla base di tali risultati le nuove raccomandazioni cliniche dell'AIOM sottolineano come, nelle donne in premenopausa con carcinoma mammario operato, recettori ormonali positivi, non sottoposte a chemioterapia adiuvante, può essere non considerata l'aggiunta dell'LHRH analogo al tamoxifene, aggiunta invece fortemente raccomandata nelle pazienti sottoposte a chemioterapia adiuvante.

### **1.4.3 Gli Inibitori dell'Aromatasi**

Gli inibitori dell'aromatasi (AI, Aromatasi inhibitors) sono storicamente il trattamento ormonale adiuvante di prima scelta nelle donne in postmenopausa con carcinoma mammario ormonoresponsivo.



**Figura 5: meccanismo d'azione degli inibitori dell'aromatasi**

Tali farmaci agiscono inibendo l'enzima aromatasi (Figura 5) che normalmente è responsabile della produzione di estrogeni a partire dal testosterone. Tale inibizione impedisce il legame tra le cellule tumorali esprimenti il recettore per gli estrogeni, bloccando così il meccanismo a valle. È noto infatti che il legame tra il recettore tumorale e gli estrogeni endogeni induce un'alterazione conformazionale del recettore che può formare un dimero con un altro recettore estrogenico. Questo dimero, assieme ad altri fattori di trascrizione, migra sulla sequenza enhancer del DNA preposta alla replicazione e moltiplicazione cellulare e di fatto la attiva con conseguente aumento del volume tumorale. Gli AI inibiscono quindi questo processo e impediscono l'ulteriore crescita tumorale.

La modalità di trattamento prevede in postmenopusa la monoterapia per 5 anni (strategia up-front) oppure la sequenza per 3-2 anni dopo tamoxifene somministrato per 2-3 anni (strategia switch).

Dati provenienti da una meta-analisi di studi di ormonoterapia adiuvante con AI verso tamoxifene da solo verso switch dopo 2 o 3 anni di Tamoxifene indicano tassi di recidiva più bassi a favore dei regimi contenenti AI senza un chiaro impatto sulla

sopravvivenza globale. Ad oggi non è possibile definire quale sia la strategia ottimale tra utilizzo degli AI upfront oppure sequenza con tamoxifene per 2-3 anni seguito da AI per 3-2 anni.

Nelle pazienti ad alto rischio di ripresa di malattia, esistono evidenze provenienti da analisi retrospettive di studi randomizzati di riduzione del rischio di recidiva a favore della strategia upfront verso la strategia switch.

Nelle pazienti che hanno completato 5 anni di terapia con tamoxifene, l'utilizzo degli AI per altri 5 anni, per un totale di 10 anni di terapia endocrina, può essere preso in considerazione nelle pazienti in premenopausa all'inizio della terapia con tamoxifene che, nel corso del trattamento con tamoxifene, passano allo stato postmenopausale. E' necessaria una valutazione completa dello stato menopausale con dosaggi ripetuti di FSH, LH, estradiolo e progesterone per accertarsi nel modo più accurato possibile dello stato di postmenopausa.

Nelle pazienti in premenopausa la sola somministrazione di AI non è infatti in grado di sopprimere adeguatamente la sintesi ovarica di estrogeni e può associarsi allo sviluppo di patologia ovarica benigna. Quando quindi si opta per un inibitore dell'aromatasi in premenopausa, un LHRH-analogo deve essere sempre somministrato per tutta la durata di somministrazione dell'inibitore dell'aromatasi.

La combinazione LHRHa + AI in premenopaus è stata valutata rispetto a LHRHa + tamoxifene in due studi randomizzati di fase III, denominati rispettivamente SOFT e TEXT. E' stata pubblicata l'analisi congiunta di tali studi randomizzati di fase III<sup>21</sup>, al fine di favorire una più precoce maturazione dei risultati. Tale analisi ha incluso 4690 pazienti. I trial TEXT e SOFT prevedevano l'assegnazione ad uno dei seguenti trattamenti: 1. Tamoxifen con soppressione della funzione ovarica (T+OFS), 2. Exemestane con soppressione della funzione ovarica (E+OFS), 3. Tamoxifen in monoterapia (soltanto lo studio SOFT aveva questo braccio, non incluso nell'analisi combinata). La soppressione della funzione ovarica è stata ottenuta mediante l'impiego di uno dei seguenti approcci: LHRH analogo (triptorelina), ooforectomia, irradiazione delle ovaie.

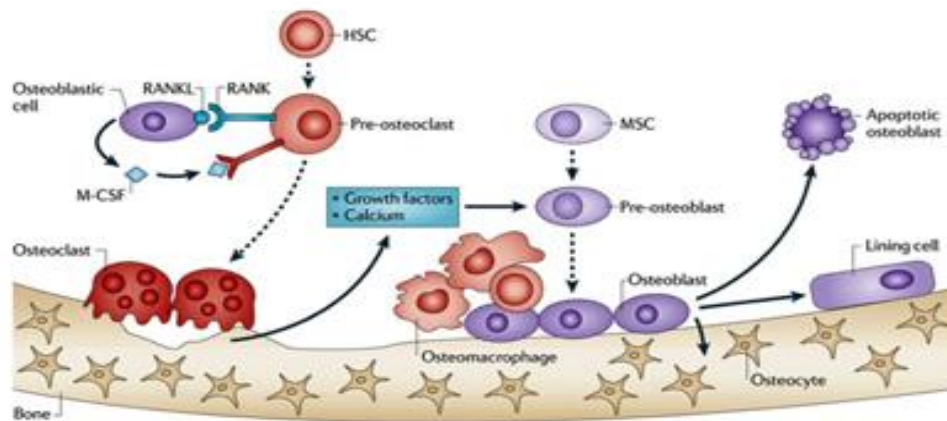
Ad un follow up mediano di 68 mesi le donne che hanno ricevuto E+OFS hanno ottenuto un significativo vantaggio in DFS (HR=0,72; 95% IC 0,60-0,85;  $p<0,001$ ) rispetto alle donne trattate con T+OFS. In particolare, la DFS a 5 anni è stata pari a 91,1% vs 87,3% (E+OFS vs T+OFS). Inoltre, nelle pazienti che hanno ricevuto E+OFS sono state osservate una riduzione del rischio di recidiva mammaria (HR=0,66, 95% IC 0,55-0,80;  $p<0,001$ ) e una riduzione del rischio di recidiva a distanza (HR=0,78, 95% IC 0,62- 0,97;  $p=0,02$ ). Nessuna differenza significativa è emersa in overall survival (HR=1,14, 95% IC 0,86-1,51) fra i due trattamenti (OS a 5 anni in E+OFS vs T+OFS: 95,9% vs. 96,9%).

Sulla scorta di tali risultati, le nuove raccomandazioni cliniche dell'AIOM concludono che, nelle donne in premenopausa con carcinoma mammario operato, recettori ormonali positivi, può essere considerato il trattamento con LHRHa + inibitore dell'aromatasi.

Gli effetti collaterali degli AI sono soprattutto a carico del sistema osteoscheletrico con artro-mialgie, osteoporosi e rischio di fratture. La comparsa di artralgie è stata riportata come la causa più frequente di sospensione del trattamento. Nei capitoli che seguono verranno approfonditi gli effetti degli IA sull'osso e sul rischio tromboembolico.

## 2. OSTEOPOROSI E INIBITORI DELL'AROMATASI

### 2.1 METABOLISMO OSSEO



**Figura 6: I componenti del microambiente osseo**

Il sistema scheletrico è un sistema vitale durante tutta la nostra esistenza. Esso ha un ruolo essenziale nell'omeostasi minerale, ospita gli elementi ematopoietici, fornisce sostegno meccanico ai movimenti, protegge gli organi interni e determina le dimensioni e la forma del corpo. Come noto, le ossa sono in gran parte costituite da matrice organica, osteoide, e da idrossiapatite calcica minerale che fornisce all'osso resistenza e durezza. Nonostante la struttura dura come la roccia, l'osso è però un tessuto dinamico, soggetto a continui processi di riassorbimento, rinnovamento e rimodellamento. Tali cambiamenti sono eseguiti da differenti tipi di cellule ossee, a loro volta regolate da una serie di fattori di trascrizione e fattori di crescita<sup>22</sup>.

La frazione organica della matrice ossea è composta da matrice extracellulare (sostanza amorfa e fibre collagene tipo I) e da cellule proprie del tessuto osseo. Nello specifico:

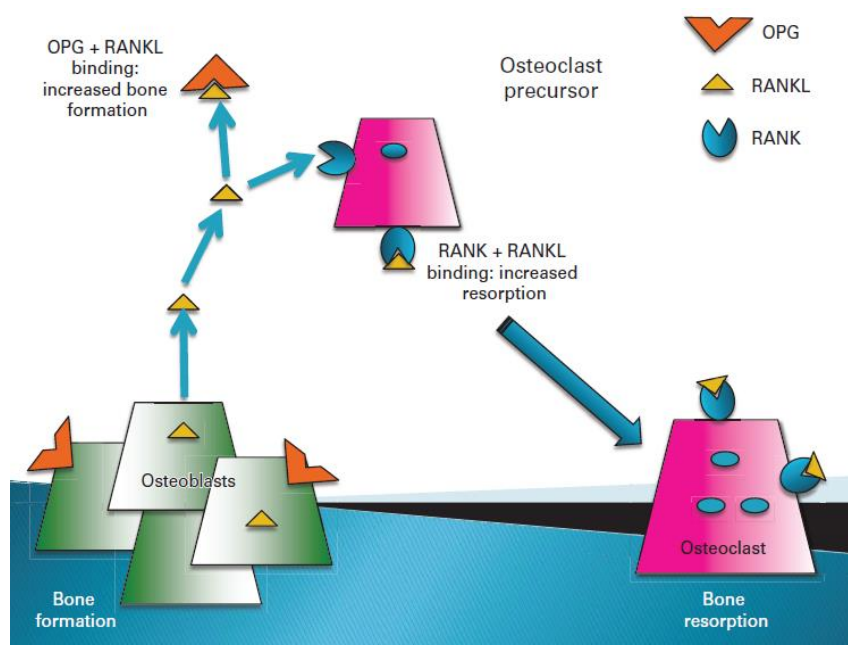
- Le cellule osteoprogenitrici: sono cellule staminali mesenchimali pluripotenti, localizzate in prossimità di tutte le superfici ossee. Quando adeguatamente stimolate da fattori di crescita, producono una progenie cellulare che si differenzia in osteoblasti, un processo regolato dalla rete di fattori di trascrizione RUNX2/CBFA1 e dalla via di segnalazione di wnt/ $\beta$ catenina<sup>23</sup>.

- Gli osteoblasti e le cellule di rivestimento: sono localizzate sulla superficie dell'osso. Tali cellule sintetizzano, trasportano e metabolizzano le varie proteine della matrice e avviano il processo della mineralizzazione. Gli osteoblasti hanno recettori per diversi ormoni regolatori (ormone paratiroideo, vitamina D, leptina ed estrogeni), citochine fattori di crescita e proteine della matrice extracellulare e, a loro volta esprimono vari fattori che regolano la differenziazione e attivazione degli osteoclasti.
- Gli osteociti: sono osteoblasti circondati da matrice di rivestimento. Essi comunicano tra loro e con le cellule sulla superficie ossea mediante una rete di processi citoplasmatici che attraversano i canali della matrice, detti canalicoli. Gli osteociti contribuiscono a controllare i livelli di calcio e fosfato nel microambiente, nonché a percepire forze meccaniche e a trasferirle in attività biologiche, processo definito mecano-distruzione<sup>24</sup>.
- Gli osteoclasti: sono le cellule responsabili del riassorbimento osseo. Derivano dalle stesse cellule ematopoietiche progenitrici che danno origine anche a monociti e macrofagi. Le citochine e i fattori di crescita che regolano la maturazione e differenziazione degli osteoclasti nell'uomo comprendono il fattore stimolante la crescita di colonie macrofagiche (M-CSF) l'interleucina-1 (IL1) e il fattore di necrosi tumorale (TNF). Gli osteoclasti multinucleati maturi (che contengono da 6 a 12 nuclei) si formano dalla fusione di precursori mononucleati circolanti e hanno una durata di vita limitata (circa due settimane). Si legano alla superficie ossea mediante le integrine, dove formano una lacuna di assorbimento sottostante, uno spazio extracellulare chiuso analogo ad un lisosoma secondario. La membrana cellulare sovrastante la lacuna di riassorbimento presenta numerosi ripiegamenti, bordo increspato, che ne aumentano la superficie, mentre la superficie della cellula aderisce strettamente all'osso evitando la perdita di dei prodotti di digestione. L'osteoclasta rimuove il minerale generando un ambiente acido mediante un sistema a pompa protonica e digerisce la componente organica rilasciando proteasi. Tali cellule e fattori prodotti interagiscono localmente per regolare l'omeostasi ossea (Figura 7).



Il principale meccanismo tramite cui interagiscono tra loro i componenti del microambiente osseo (al fine di mantenere l'omeostasi) è il sistema di segnalazione RANK/RANKL/OPG<sup>25</sup>:

1. Il recettore RANK transmembrana (recettore che attiva NF- $\kappa$ B) presente sui precursori degli osteoclasti;
2. Il ligando per RANK (RANKL), presente su osteoblasti e cellule stromali del midollo;
3. Osteoprotegerina (OPG), un recettore "decoy", falso recettore, prodotto da osteoblasti e altri tipi cellulari, in grado di legare il RANKL e pertanto compromettere la sua interazione con RANK.



**Figura 7. meccanismo d'azione di RANK/RANKL/OPG**

Quando è stimolato da RANKL, la segnalazione di RANK attiva i fattori di trascrizione NF- $\kappa$ B, essenziale per la generazione e sopravvivenza degli osteoclasti. Una seconda importante via coinvolge il M-CSF prodotto dagli osteoblasti e il recettore per l'M-CSF presente nei progenitori degli osteoclasti. L'attivazione del recettore per il M-CSF stimola un'attività tirosin chinasi, altresì importante per la generazione degli osteoclasti. L'altra importante via di segnalazione è la via di segnalazione di WNT/ $\beta$  catenina. Le WNT prodotte dalle cellule stromali del midollo si legano ai recettori LRP5 e LRP6 sugli osteoblasti e pertanto determinano

L'attivazione della  $\beta$ catenina e la produzione di OPG. L'importanza di queste vie è provata dalle rare ma significative mutazioni della linea germinale nei geni OPG, RANK, RANKL e LRP5 che provocano gravi anomalie del metabolismo osseo.

I processi di formazione e riassorbimento osseo sono strettamente associati e soggetti a meccanismi di fine regolazione a vari livelli. Ad esempio, dato che OPG e RANKL si oppongono l'un l'altro, il riassorbimento o la formazione di osso possono essere di volta in volta favoriti semplicemente facendo oscillare da una parte o dall'altra il rapporto RANKL/OPG. I fattori sistemici che influenzano l'espressione di RANKL e OPG comprendono ormoni (ormone paratiroideo, estrogeni, testosterone e glucocorticoidi), vitamina D, citochine infiammatorie (ad es IL-1) e fattori di crescita (come il BMP, bone mineral protein): ciascuno probabilmente agisce alterando i livelli di segnalazione di NF- $\kappa$ B e WNT/ $\beta$ -catenina negli osteoclasti ed osteoblasti. Nello specifico gli estrogeni e gli androgeni incrementano la secrezione di OPG da parte degli osteoblasti, riducono il rapporto RANK/OPG, downregolano l'espressione di RANK sugli osteoclasti e riducono i livelli di riassorbimento osseo<sup>26</sup>.

## 2.2 OSTEOPOROSI



**Figura 8: alterazioni strutturali dell'osso osteoporotico**

L'osteoporosi è una malattia caratterizzata da ossa porose e riduzione della massa ossea (Figura 8). Le alterazioni strutturali predispongono l'osso alla frattura. Il processo può essere localizzato ad un solo osso o segmento scheletrico, come

nell'osteoporosi da disuso di un arto, o può coinvolgere l'intero scheletro, come manifestazione di una malattia metabolica dell'osso. L'osteoporosi generalizzata può essere, a sua volta, primitiva o secondaria ad altre condizioni. L'osteoporosi è oggettivata tramite la misurazione della "Bone Mineral Density" (BMD) e la determinazione del T score alla MOC DEXA (Dual-energy X-ray absorptiometry). (vedi paragrafi successivi). Il T score è definito come il numero di deviazioni standard sopra o sotto la media delle differenze tra il BMD del paziente e quello di riferimento di una popolazione di adulti sani di 30 anni dello stesso sesso. In contrasto il valore "Z score" corrisponde al numero di deviazioni standard sopra o sotto la media delle differenze nel BMD del paziente in relazione al BMD ottimale in base all'età e il sesso del paziente.

Il picco di massa ossea è raggiunto all'età adulta. La sua entità è determinata in gran parte da fattori ereditari, soprattutto da polimorfismi dei geni che regolano il metabolismo osseo<sup>27</sup>. Tuttavia contribuiscono anche attività fisica, forza muscolare, dieta e stato ormonale. Una volta raggiunto il suddetto picco, in ogni unità multicellulare di base a ogni ciclo di rimodellamento osseo, si verifica un piccolo deficit della formazione ossea. Di conseguenza, la perdita ossea legata all'età che può raggiungere in media lo 0,7% annuo, è un fenomeno biologico normale e prevedibile. Sono colpiti in egual misura i due sessi e i bianchi maggiormente rispetto ai neri.

I fattori che concorrono all'osteoporosi sembrano essere:

- Le modificazioni correlate all'età nelle cellule e nella matrice ossea hanno un forte impatto sul metabolismo osseo. Gli osteoblasti di individui anziani hanno un potenziale replicativo e biosintetico ridotto in confronto agli osteoblasti di individui più giovani<sup>28</sup>. Inoltre le proteine legate alla matrice cellulare (come i fattori di crescita, che sono mitogeni per le cellule osteoprogenitrici e stimolano l'attività di sintesi degli osteoblasti) perdono la loro efficacia biologica con il trascorrere del tempo. Ne consegue una minore capacità di produrre osso. Questa variante è nota come osteoporosi sensile o a basso turnover.
- La riduzione dell'attività fisica aumenta un tasso di perdita ossea nei modelli sperimentali animali e umani, perché le forze meccaniche stimolano il normale rimodellamento osseo. La perdita ossea osservata in un arto immobilizzato o paralizzato,

la riduzione di massa scheletrica individuata in astronauti esposti ad una ambiente privo di gravità per periodi prolungati e la maggiore densità ossea degli atleti sono tutti esempi che evidenziano il ruolo dell'attività fisica nella prevenzione della perdita ossea.

- Anche i fattori genetici sono importanti. Si stima che il 60-80% della variazione della densità ossea sia geneticamente determinata geneticamente. Negli studi di associazione sull'intero genoma (Genome-Wide Association Studies GWAS) i principali geni comprendono RANKL, OPG, RANK<sup>29</sup>. Sono stati associati anche il locus MHC (forse in relazione agli effetti dell'infiammazione sul metabolismo) e il gene per il recettore degli estrogeni calcio.

- L'adeguato apporto nutrizionale di calcio è importante. E' stato dimostrato che le ragazze adolescenti, ma non i ragazzi, tendono ad avere un insufficiente apporto alimentare di calcio. Questo deficit di calcio si verifica in un periodo di rapido accrescimento osseo, non permettendo di raggiungere un adeguato picco di massa ossea; pertanto questi soggetti presentano un rischio più elevato di sviluppare osteoporosi.

- Influenze ormonali. Nel decennio dopo la menopausa, la riduzione annuale della massa ossea può raggiungere il 2% dell'osso corticale e il 9% dell'osso spongioso. Le donne possono perdere fino al 35% del loro osso corticale e il 50% dell'osso trabecolare nei 30 o 40 anni dopo la menopausa. Il rischio di incorrere in una frattura di osso per osteoporosi severa è di circa il 30-40% nella donna in postmenopausa<sup>30</sup>. L'osteoporosi post menopausale è caratterizzata da un'accelerazione ormono-dipendente della perdita ossea, che si verifica nel decennio successivo alla menopausa. La carenza di estrogeni svolge il ruolo principale di questo fenomeno e la terapia estrogenica sostitutiva durante la menopausa ha un effetto protettivo contro la perdita di massa ossea. Gli effetti degli estrogeni sulla massa ossea sono mediati dalle citochine. Livelli ridotti di estrogeni portano un aumento della secrezione di citochine infiammatorie da parte dei monociti del sangue e delle cellule del midollo osseo. Tali citochine stimolano il rimodellamento e l'attività degli osteoclasti, aumentando i livelli di RANKL e riducendo l'espressione di OPG. Si verifica un'attività osteoblastica compensatoria, ma insufficiente e si giunge a quella che è classificata come osteoporosi ad elevato turnover.

## **2.3 BONE HEALTH NEL PAZIENTE IN TERAPIA ONCOLOGICA SISTEMICA PER CARCINOMA MAMMARIO**

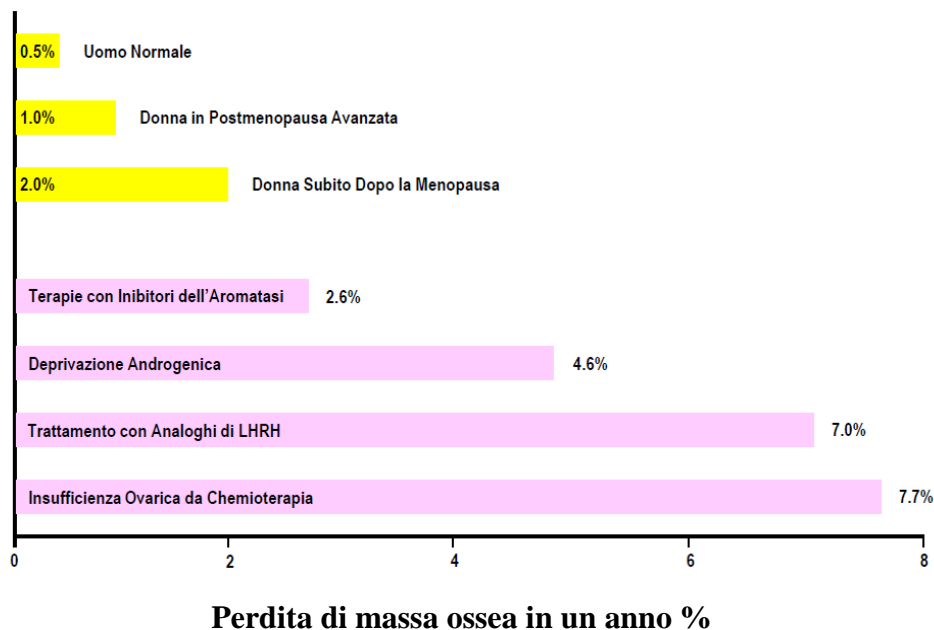
Le donne con una storia di cancro al seno presentano un aumentato rischio di osteoporosi secondaria alle terapie sistemiche adiuvanti<sup>31,32,33,34</sup>. L'incidenza di fratture vertebrali osteoporotiche è risultata del 5,4 % nelle donne con nuova diagnosi di carcinoma mammario in confronto con il rischio del solo 1,5% registrato in donne di età corrispondenze ma senza diagnosi di tumore.

Terapie sistemiche adiuvanti per il cancro alla mammella associate ad un aumentato rischio di perdita ossea includono:

- trattamenti Antiestrogenenici (chimico o chirurgico di ablazione ovarica, l'inibizione dell'aromatasi, e nei pazienti in premenopausa, tamoxifene)
- chemioterapie che promuovono la disfunzione ovarica prematura.
- farmaci di supporto, come i glucocorticoidi

Gli analoghi del GnRH, il tamoxifene e la chemioterapia in premenopausa, così come gli AI e la chemioterapia in postmenopausa, tramite soprattutto la riduzione dei livelli circolanti di estrogeni endogeni, aumentano il riassorbimento causando una perdita precoce della normale integrità scheletrica. Non bisogna infatti dimenticare come gli estrogeni, protagonisti indiscussi della cancerogenesi mammaria e quindi “bersaglio” principale delle terapie dei tumori ormonosensibili, siano anche ormoni cruciali per l'omeostasi ossea. Pertanto, la terapia antitumorale volta alla diminuzione dei livelli circolanti di estrogeni può essere causa di collaterale diminuzione della massa ossea.

Una rappresentazione grafica delle alterazioni del BMD provocate da vari trattamenti oncologici, in confronto con i valori fisiologici di riduzione fisiologica di % di densità ossea in menopausa, è data dalla figura che segue:



La chemioterapia e le associate terapie di supporto possono avere un effetto negativo sulla massa ossea, anche se gli effetti diretti della chemioterapia sulla massa ossea di questa popolazione non sono ben stabiliti. Una interferenza diretta dei chemioterapici sul metabolismo osseo è stata dimostrata, ma il meccanismo con cui la chemioterapia causa perdita di massa ossea è principalmente l'insufficienza ovarica indotta. I dati pubblicati suggeriscono che le donne che ricevono chemioterapia adiuvante, ma non terapia endocrina, possono perdere dall' 1 a 10 per cento della loro massa ossea entro un anno dalla chemioterapia<sup>35,36,37</sup>.

Con un regime chemioterapico CMF la riduzione della BMD è del 6,5%, perdita ossea che non si recupera dopo la sospensione della chemioterapia.

Sull'effetto della terapia endocrina adiuvante in questa popolazione di pazienti esistono sicuramente più dati.

Tamoxifene assunto per 5 anni in premenopausa riduce il rimodellamento osseo e causa un aumento del rischio di frattura osteoporotica del 32%. L'effetto dell'utilizzo oltre i 5 anni del tamoxifene richiede ulteriori studi, in virtù delle nuove raccomandazioni che prevedono 10 anni di trattamento nelle donne a più alto rischio di recidiva<sup>38</sup>. L'associazione del tamoxifene con LHRH/GnRH analoghi<sup>39</sup> potenzia ulteriormente la perdita di massa ossea, anche se con effetto reversibile. In pazienti trattati con goserelin la riduzione in BMD a livello lombare è stata del 10,5%,

rispetto al 6,5% di riduzione registrato nelle pazienti in premenopausa trattate con solo CMF ( $p < 0,001$ )<sup>40</sup>. La perdita di massa ossea nelle pazienti in premenopausa in terapia con AI + LHRH/GnRH analoghi è risultata inoltre maggiore di quella registrata nelle pazienti che assumevano tamoxifene + LHRH analoghi (-13,6% rispetto al -9% dopo 3 anni)<sup>41</sup>.

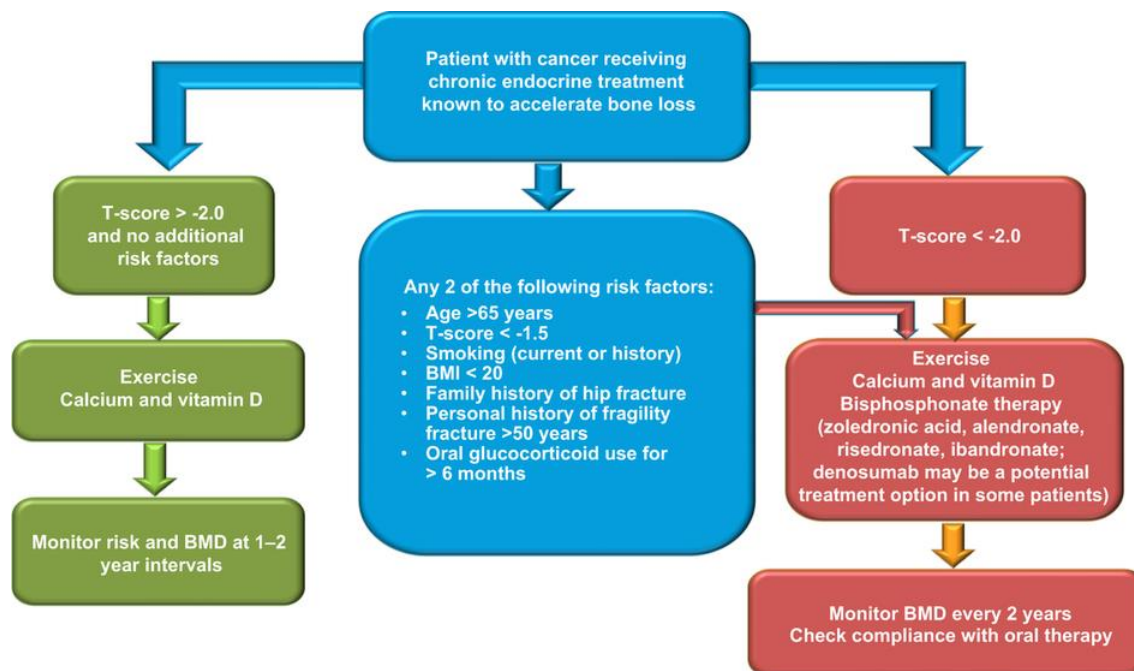
Per quanto riguarda le donne in postmenopausa, dati generati da Health Initiative Observational Study delle Donne (WHI-OS) hanno dimostrato che le donne con una storia di cancro al seno diagnosticato dopo i 55 anni hanno un rischio maggiore di fratture rispetto a quella senza una storia di tumore mammario<sup>42</sup>. Dopo la menopausa il tamoxifene può favorire la stabilizzazione e indurre un lieve aumento della massa ossea e molto probabilmente tale effetto è secondario alla specificità d'organo di questo farmaco appartenente alla classe dei modulatori selettivi del recettore dell'estrogeno<sup>43,44</sup>.

La terapia endocrina adiuvante con un inibitore dell'aromatasi (AI) favorisce la perdita ossea e le potenziali fratture da osteoporosi. Gli AI impediscono la conversione degli androgeni periferici, considerata la principale fonte di estrogeni nelle donne in postmenopausa, in estrogeni<sup>45,46</sup>. Ciò provoca un rapido declino dei livelli di estrogeni portando, per i meccanismi precedentemente analizzati, alla perdita di tessuto osseo<sup>47,48</sup>. La riduzione in estradiolo circolante indotta da AI è associata con un aumento relativo del 40% nel tasso di fratture osteoporotiche se comparato al tamoxifene<sup>49</sup>. Tale perdita ossea sembra però parzialmente migliorare dopo sospensione del trattamento adiuvante con AI<sup>50</sup>. L'effetto dei diversi IA di terza generazione sull'osso è stato confrontato quantitativamente, in modo indiretto, ricavando il rischio annuale di fratture osteoporotiche registrato per 1000 donne. L'utilizzo di exemestane era associato ad una minore incidenza annua di fratture (19,2%) in confronto ad anastrozolo e letrozolo (rispettivamente 21,6% e 22% di rischio registrato)<sup>51,52,53</sup>.

Data la rilevanza del problema negli ultimi anni si sono moltiplicate le linee guida sulla gestione della Bone Health nelle pazienti in terapia per tumore mammario<sup>54</sup>. La prima "Guideline" per la prevenzione e il trattamento dell'"Aromatase Induced Bone Loss" (AIBL) risale al 2008<sup>55</sup>. Nel 2011 tali linee guida furono aggiornate introducendo la stratificazione del rischio non solo in base alla BMD ma anche



tramite “fattori di rischio clinico” adeguatamente selezionati e veniva inoltre aggiunto il Denosumab tra le opzioni terapeutiche<sup>56</sup>. Recentemente l'European Society for Medical Oncology (ESMO) ha confermato tali fattori che aumentano il rischio di frattura nelle donne con tumore mammario in postmenopausa e stilato una flow chart per la stratificazione del rischio, la prevenzione e il trattamento della AIBL<sup>57</sup> (vedi Figura 9).



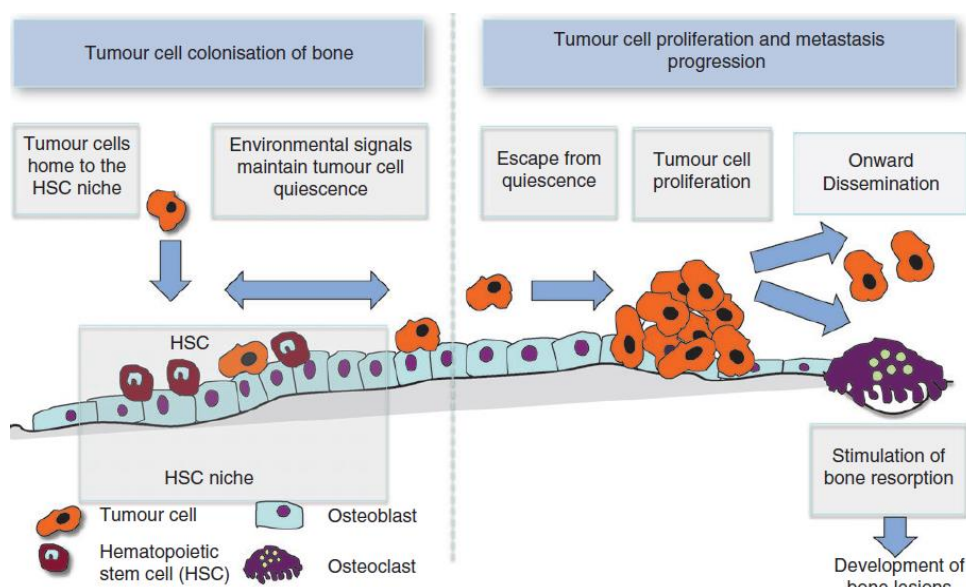
**Figura 9. ESMO Clinical Practice Guidelines International guideline for managing bone health during cancer treatment**

Le principali opzioni terapeutiche consistono in supplementazione di calcio (1000-mg/die) e vitamina D (1000-2000 UI/die) + farmaci modulatori dell'omeostasi ossea come i bifosfonati e il Denosumab.

L'utilizzo di tali trattamenti in adiuvante per la preservazione della bone health in tale classe di pazienti ha inoltre permesso di supporre e dimostrare un effetto anche antitumorale di bifosfonati e denosumab. Farmaci modulatori del metabolismo osseo utilizzati in adiuvante per la bone health si sono infatti dimostrati capaci di ridurre il numero delle DTC (dormant tumor cells- DTCs) e la loro persistenza nel midollo osseo<sup>58</sup>. È noto infatti che le DTC rappresentano la principale fonte di recidiva nelle

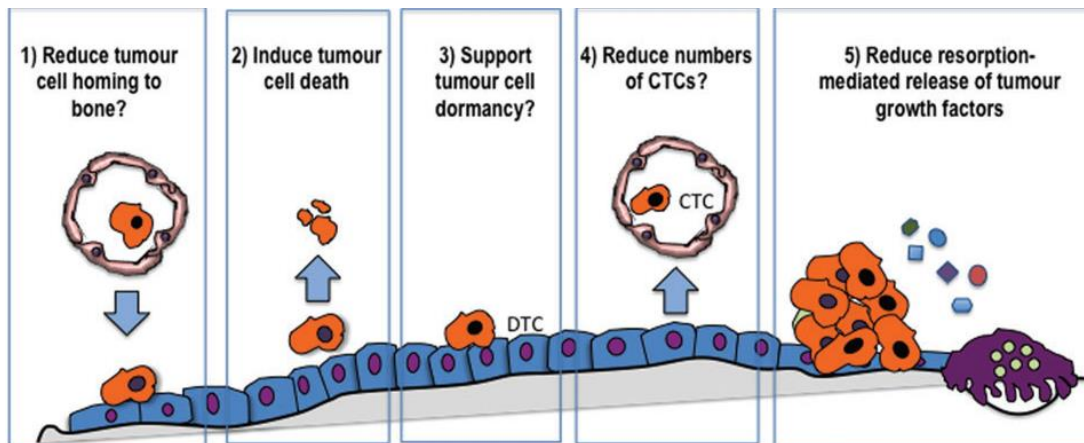


pazienti con neoplasia mammaria precoce. Molti studi hanno dimostrato un valore prognostico negativo delle DTC nel midollo osseo o della cellule tumorali circolanti (CTC)<sup>59</sup>. Il "microambiente" che si viene a creare nel midollo osseo rappresenta un "santuario" per queste cellule tumorali, che riescono così ad evadere l'effetto citotossico delle terapie antiblastiche sistemiche somministrate in adiuvante<sup>60</sup>. All'interno di questa "nicchia" le DTC rimangono dormienti finché fattori di crescita (rilasciati soprattutto dall'osso rimaneggiato dagli osteoclasti) non ne attiva la crescita e proliferazione. (vedi figura 10)



**Figura 10. Le fasi della meta statizzazione: dalla colonizzazione e quiescenza nella nicchia/santuario del midollo osseo alla proliferazione e disseminazione metastatica**

Alterando il microambiente del midollo osseo, santuario per le cellule dormienti, la terapia con bifosfonati in adiuvante può quindi rappresentare uno strumento per prevenire le recidive di malattie nelle pazienti con tumore mammario operato<sup>61</sup>. Ulteriori studi hanno inoltre dimostrato che l'effetto antitumorale dei bifosfonati in adiuvante è in realtà relato ad un intervento più complesso del farmaco che sembra interferire sulla nicchia preneoplastica del microambiente osseo su vari livelli: homing delle CTC, attività/sopravvivenza non solo degli osteoclasti ma anche degli osteoblasti, delle cellule immunitarie e delle DTC stesse. (vedi figura 11)



**Other cell types in the bone/tumour microenvironment shown to be affected by BPs:**

- **Osteoblasts:** Reduced by a single dose of Zol *in vivo* (79)
- **Macrophages:** Increased polarisation to M1 anti-tumour phenotype in mammary tumour, no evidence from bone metastasis models (80)
- **Immune cells:** Stimulation of immune cells by BPs affects tumour growth specifically in those tumours outside bone (81)

**Figura 11. Potenziali effetti dei bifosfonati sulle varie fasi di formazione delle metastasi ossee**

Le più attuali raccomandazioni introducono quindi la terapia con bifosfonati in adiuvante non solo per la prevenzione della CTIBL ma anche per l'accertato ruolo antitumorale, tradotto in termini di prevenzione delle metastasi e confermato impatto sulla sopravvivenza (solo in pazienti con bassi livelli di ormoni sessuali femminili)<sup>62,63</sup>.

### 3. EVENTI AVVERSI CARDIOVASCOLARI ED INIBITORI DELL'AROMATASI

È noto come i livelli circolanti di estrogeni regolino i livelli plasmatici di lipidi con un effetto cardioprotettivo importante. Fisiologicamente, con la menopausa<sup>64</sup>, tale effetto protettivo viene meno e il rischio di accidenti cardiovascolari aumenta.

Il trattamento ormonale adiuvante per il carcinoma mammario, come visto per l'osteoporosi, accelera le complicanze da ipoestrogenismo e pertanto diversi studi hanno approfondito tale aspetto in corso di IA.

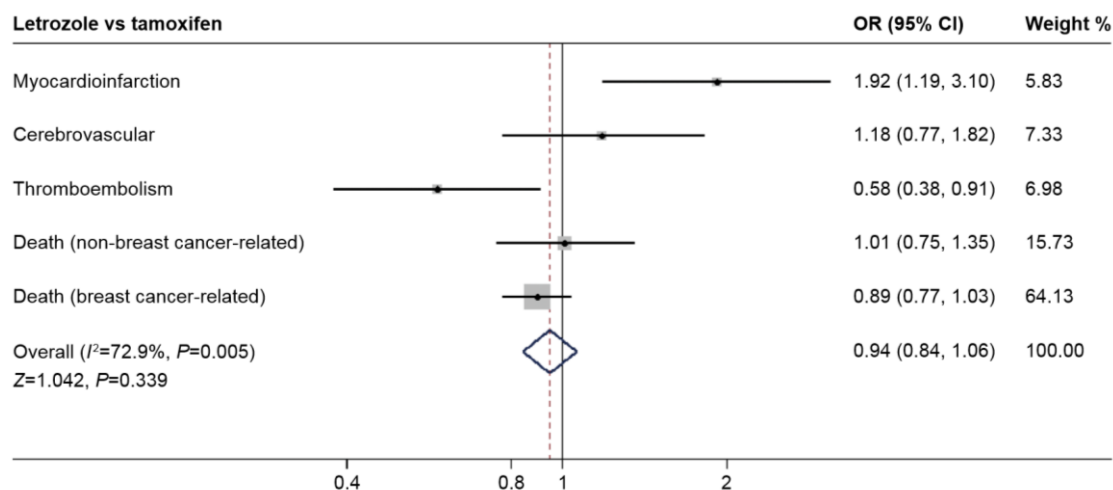
Nella tabella che segue (tabella 5) Bundred, nella sua review del 2005, ha sintetizzato gli effetti delle terapie ormonali sul profilo lipidico delle pazienti<sup>65</sup>. Si evince una variabilità di effetto, probabilmente relata ad una differenza nei meccanismi di azione dei diversi farmaci. Il tamoxifene si è visto ridurre i livelli di colesterolo. La somministrazione di AI è stata invece associata ad un incremento dei valori circolanti di colesterolo VLDL ed LDL e ad una riduzione del colesterolo HDL e dei trigliceridi<sup>66,67</sup>.

	LDL cholesterol	HDL cholesterol	Total cholesterol	Triglycerides	Total: HDL cholesterol	Lp(a)	Apo B
Tamoxifen	↓	—	↓	?	?	↓	↓
Anastrozole	↑/—	↑/—	↑/—	—	—	↑/—	↑/—
Letrozole	↑/—	—	↑/—	—	↑/—	?	↑/—
Exemestane	↓/—	↓/—	↓/—	↓	?	—	—

**Tabella 5. Effetti delle terapie antiestrogeniche nei livelli di lipidi plasmatici<sup>68,69,70,71,72,73</sup>**

Per quanto concerne il rischio di eventi cerebrovascolari e tromboembolici, questo è stato confermato essere maggiore in caso di trattamento con tamoxifene piuttosto che in corso di terapia adiuvante con IA. Per esempio, nel trial ATAC (ATAC trialist Group 2002) la terapia con anastrozolo era associata con un rischio cerebrovascolare e tromboembolico significativamente inferiore che col tamoxifene<sup>74</sup>. I risultati dello studio IES allo stesso modo hanno mostrato eventi tromboembolici più frequenti durante terapia con tam<sup>75</sup>. Inoltre, nessun evento tromboembolico è stato registrato con letrozolo (comparato con megestrolo acetato, ma nel setting metastatico), nello studio di Dombernowsky et al<sup>76</sup>.

Sono stati analizzati gli eventi cardiovascolari verificatisi nello studio BIG 1-98 ed è stato riscontrato una simile incidenza di eventi avversi cardiaci con letrozolo e tamoxifene con un maggior numero di eventi avversi cardiaci di grado 3-5 nelle pazienti trattate con letrozolo rispetto a quelle che hanno ricevuto tamoxifene (2,4% verso 1,4%;  $p=0,001$ ), un maggior rischio di eventi tromboembolici in terapia con tamoxifene (tamoxifen, 3.9%; letrozole, 1.7%;  $P < .001$ ). Non è stata riscontrata alcuna differenza tra i due farmaci per quanto riguarda l'incidenza di eventi cerebrovascolari o ipertensione<sup>77</sup>. Younus, nella sua review sistematica della letteratura in tema di rischio cardiovascolare in corso di terapia con AI, concludeva che i dati disponibili al 2011 su AI e lipoproteine plasmatiche e/o eventi cardiovascolari ischemici non suggeriscono quindi un effetto sfavorevole degli IA nelle pazienti con tumore mammario operato ER+<sup>78</sup>. Due metanalisi successive, una nel 2013 di Aydiner A<sup>79</sup>, ed una del 2015 del gruppo di Zhao<sup>80</sup>, hanno evidenziato invece come la terapia con AI è associata ad un maggior rischio di eventi cardiovascolari rispetto al tamoxifene, con l'eccezione degli eventi trombo embolici, più frequenti in corso di terapia con tam. Segue tabella esplicativa di controllo estratta dallo studio di Zhao. (tabella 6)



**Tabella 6. Forest plot di confronto tra tamoxifene ed AI (letrozolo) in termini di eventi avversi cardiovascolari**

Infine, in un recente studio che stratificava per razza di appartenenza le pazienti in ormonoterapia adiuvante con IA, durante il primo anno di trattamento non sono state registrate variazioni statisticamente significative nello spessore intimale delle

carotidi, nello score di rischio per malattie cardiovascolari aterosclerotiche, o di altre valide variabili associate ad un innalzamento del rischio cardiovascolare (livelli di protein C reattiva, colesterolo, pressione arteriosa)<sup>81</sup>. Ulteriori studi, con dati di follow up più lunghi, sono necessari per meglio caratterizzare il profilo di tossicità cardiovascolare degli IA.

#### **4. OSTEOPOROSI, CALCIFICAZIONE AORTICA ED ATEROSCLEROSI: RAZIONALE DELLO STUDIO**

Secondo i dati della World Health Organization (WHO) gli anziani rappresenteranno entro il 2015 il 20% della popolazione mondiale con un previsto incremento quindi delle patologie tipiche dell'età avanzata quali osteoporosi ed aterosclerosi<sup>82</sup>. Recentemente un numero crescente di studi ha dimostrato una correlazione tra BMD ed anomalie vascolari aterosclerotiche (comprese calcificazioni carotidee, malattia cardiovascolare e coronarica) indipendentemente dall'età e dal sesso dei pazienti<sup>83</sup>. Una recentissima metanalisi del 2016, analizzando i dati ricavati da 25 studi<sup>84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94</sup> per un totale di 10299 partecipanti, concludeva che la riduzione in BMD è un fattore predittivo indipendente di aterosclerosi e il rischio di anomalie vascolari aterosclerotiche aumenta al diminuire dei valori di BMD, indipendentemente da età, sesso, BMI, ipertensione o presenza di altri fattori di rischio vascolari<sup>95</sup>.

L'associazione di patologie ossee con l'aterosclerosi ha stimolato la ricerca di mediatori comuni che colleghino il metabolismo scheletrico e il sistema vascolare. L'osteoprotegerina (OPG) in particolare, regolatore chiave nel metabolismo osseo, è diventata oggetto di intenso interesse per il suo noto ruolo nelle malattie vascolari e nella calcificazione vasale. Studi in vitro e in modelli animali indicano che OPG inibisce la calcificazione vascolare e topi knockout per OPG mostravano un fenotipo di rapido sviluppo di calcificazione arteriosa ed osteoporosi<sup>96</sup>. Paradossalmente però, gli studi clinici suggeriscono che i livelli sierici di OPG aumentano in associazione con la calcificazione vascolare, la malattia coronarica, l'ictus e il rischio futuro di eventi cardiovascolari. Ciò ha portato a un ampio dibattito sul potenziale uso di OPG come bio-marcatore di malattia vascolare<sup>97</sup>.

E' stato inoltre dimostrato come un'aumentata attività del RANK-RANKL, dovuta, come precedentemente detto, alla riduzione dell'attività dell'osteoprotegerina, si traduca in una attivazione delle BMP (proteine mineralizzanti dell'osso), in particolare di BMP2 e BMP4 che, espresse in maniera aberrante, si legano ai recettori per i BMP delle cellule muscolari lisce della parete vascolare; tale legame, favorito inoltre dallo stato pro-infiammatorio tipico del paziente tumorale (quindi

dall'aumento del TNF, dei ROS e delle stesse OX-LDL prodotte in eccesso) ma anche da una condizione di precedente aterosclerosi, attiva i geni SMAD4 e RSMAD che a loro volta attivano il gene RUNX2, passaggio fondamentale per la differenziazione della cellula vasale da mesenchimale a cellula osteogenica.

Questi fenomeni determinano un incremento del deposito di calcio in sede intima con formazione, quindi, di calcificazione soprattutto aortiche (Figura 12).

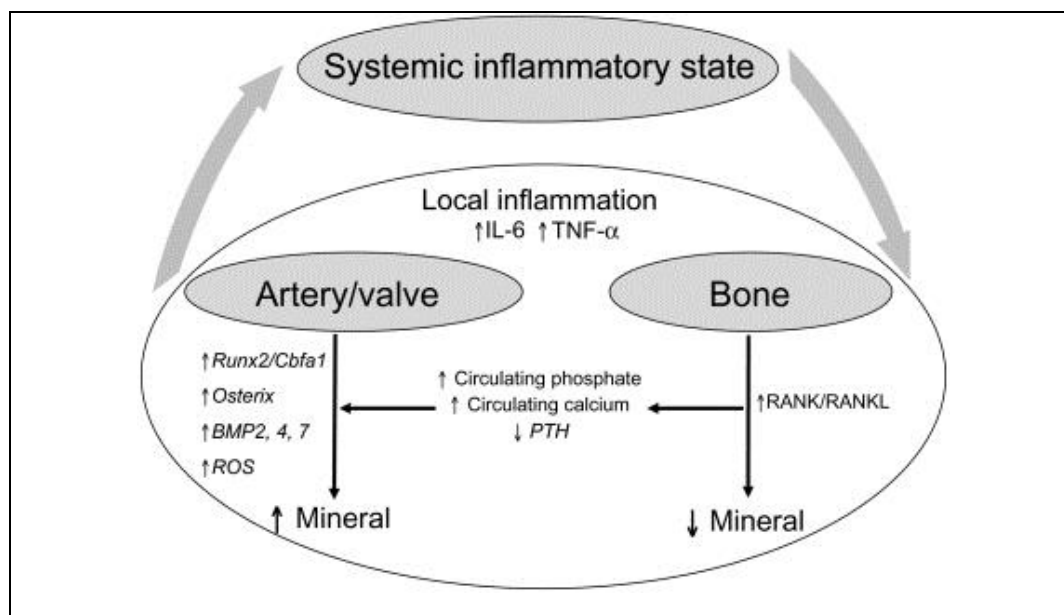


Figura 12: Modello biologico ipotetico di relazione tra calcificazione vascolare, osteoporosi ed infiammazione

Nel postmenopausa la spiegazione biologica è più immediata: la riduzione dei livelli di estrogeno induce un'alterata o ridotta espressione dei livelli di osteoprotegerina<sup>98</sup> con aumento della calcificazione vasale e, come precedentemente trattato, ad una perdita di massa ossea. Nello studio Rotterdam del 2015<sup>99</sup>, gli autori hanno riportato un'associazione significativa tra perdita di massa ossea e calcificazioni alle arterie coronariche solo nelle donne con bassi livelli di estradiolo.

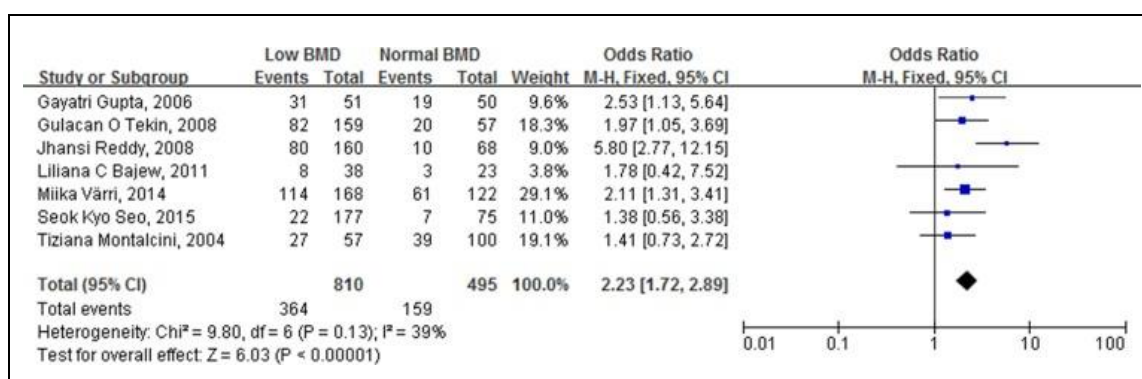
Schultz e. et al., nel 2004, hanno evidenziato, in donne in postmenopausa, una significativa correlazione tra la presenza di calcificazione aortica e l'osteoporosi, indicando come il maggior grado di calcificazioni correli con una maggiore perdita di massa ossea<sup>100</sup>. Bagger e coll<sup>101</sup> hanno dimostrato, in uno studio prospettico, una correlazione significativa tra avanzata calcificazione aortica e basso BMD, perdita



accelerata di massa ossea e rischio 2,3 volte aumentato di frattura al femore prossimale in donne in menopausa. El Maghraoui e coll<sup>102</sup>, ha riportato che un'estesa calcificazione aortica è associata con l'insorgenza di fratture vertebrali indipendentemente da età, BMI, storia di fratture e BMD, in donne postmenopausali. Nello studio di Zhou del 2014 la calcificazione aortica era risultata correlare in modo statisticamente significativo con un rischio triplicato di fratture vertebrale in una popolazione di donne cinesi in stato menopausale<sup>103</sup>. Ulteriori analoghe conferme di correlazione in età menopausale tra BMD e calcificazione aortica<sup>104,105,106,107</sup>, o altra anomalia vascolare aterosclerotica<sup>108,109</sup>,<sup>110</sup> sono ad oggi disponibili in letteratura.

In un recente studio cross sectional l'osteoporosi è stato confermato essere un fattore di rischio indipendente per la calcificazione dell'aorta addominale e la supplementazione in calcio e vitamina D non sembrava indurre un aumento della calcificazione vascolare nelle donne in menopausa<sup>111</sup>.

Il dato di correlazione con il rischio di calcificazione vascolare è stato confermato anche per valori di BMD nel range di osteopenia, non solo per valori di osteoporosi conclamata<sup>112</sup>. A tal proposito segue forest plot ricavato dalla metanalisi di Chenyi dove si analizzano i dati delle pazienti donne in età menopausale (tabella 7). Le Odds ratio (OR) combinate per incidenza di anomalie vascolari aterosclerotiche in pazienti con basso BMD (osteopeniche) rispetto a pazienti con BMD normale, era 2,23 (95% CI [1,72 -2,89], p<0.00001).



**Tabella 7. Forest plot di OR combinate per incidenza di anomalie vascolari aterosclerotiche in pazienti in menopausa con basso BMD rispetto a pazienti in menopausa con BMD nella norma.**



I dati disponibili di correlazione tra BMD e anomalie vascolari aterosclerotiche (soprattutto per la calcificazione dell'aorta addominale) in menopausa sono quindi ormai solidi ma non esistono standard per la valutazione del grado di calcificazione vascolare e quindi i diversi studi pubblicati utilizzano a riguardo metodi differenti, rendendo complesso il confronto dei risultati.

Gli inibitori dell'aromatasi, inducendo una rapida riduzione dei livelli di estrogeni, sono associati ad un aumento di rischio di osteoporosi e di eventi cardiovascolari. Non esistono inoltre in letteratura dati di correlazione tra BMD e calcificazione vascolare raccolti su dei setting di ipoestrogenismo differenti dalla menopausa, quale appunto la terapia adiuvante con inibitori dell'aromatasi in donne operate per carcinoma mammario.

## **OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Basandoci su quanto osservato in letteratura nella popolazione menopausale, abbiamo voluto, per la prima volta, verificare se le stesse correlazioni tra perdita ossea e calcificazioni vascolari fossero significative anche nelle pazienti oncologiche trattate con Inibitori dell'Aromatasi.

- Il primo obiettivo è stato quello di valutare la correlazione tra la perdita di massa ossea al momento dell'inizio della terapia con Inibitori dell'Aromatasi e il livello di calcificazioni basale al momento dell'inizio della terapia.
- Il secondo invece era valutare la correlazione tra le modificazione della densità ossea con le variazioni delle calcificazioni dell'aorta addominale durante la terapia con Inibitori dell'Aromatasi.

## **MATERIALI E METODI**

### **Popolazione e disegno dello studio**

Questo studio retrospettivo osservazionale ha analizzato i dati medici (informatizzati e cartacei) relativi a pazienti donne adulte (età > 18 anni) con diagnosi di carcinoma mammario invasivo operato e sottoposte a trattamento adiuvante con AI presso il Policlinico Universitario Campus Bio Medico di Roma. Sono state arruolate retrospettivamente pazienti trattate tra il Gennaio 2009 e il Settembre 2015. La popolazione esaminata comprende ottanta pazienti. Di queste pazienti sono stati ricavati dati relativi ad un tempo di 12 mesi dall'inizio della terapia con Inibitori dell'Aromatasi.

Lo studio è stato prima approvato da comitato etico dell'ospedale universitario Campus Bio Medico di Roma. I dati relativi ai pazienti arruolati sono stati resi anonimi prima delle analisi.

I criteri d'inclusione utilizzati per l'arruolamento dei pazienti nello studio sono stati:

- Diagnosi istologica di un carcinoma mammario infiltrante;
- Pazienti trattati in setting adiuvante dopo chirurgia radicale;
- Assenza di metastasi a distanza;

- Performance status 0-2;
- Stato ormonale post-menopausale
- Assenza di alterazioni della crasi ematica, renali ed epatiche
- Età  $\geq$  18 anni
- Assenza di malattie infettive in atto
- Assenza di altri tumori maligni

Viceversa i criteri di esclusione sono stati:

- Pazienti affetti da malattie degenerative croniche.
- Terapia cortisonica assunta in cronico
- Anamnesi positiva per patologie cardiovascolari e cerebrovascolari
- Assunzione di terapie con statine e antiaggreganti

Delle pazienti arruolate retrospettivamente nello studio sono stati ricavati dagli archivi le immagini e i referti TC total-body e MOC DEXA relativi al “tempo zero” (prima dell’inizio della terapia con IA) e i corrispettivi dati ricavati dagli stessi esami strumentali ripetuti dopo un anno di trattamento con IA.

Le immagini TC sono servite per ricavare il dato relativo alle calcificazioni aortiche. Abbiamo selezionato le scansioni addominali e valutato il tratto di aorta compreso tra T12 e L4<sup>113</sup>. Lungo questo segmento aortico abbiamo valutato la presenza, quindi il numero, o meno di calcificazioni. Ricontrata la calcificazione, ne abbiamo analizzato, in sezione assiale, la lunghezza, espressa in centimetri, e tale misurazione è stata effettuata per ogni singola scansione della calcificazione. Nei pazienti con più calcificazioni abbiamo calcolato l'altezza media tra le varie calcificazioni, la calcificazione con l'altezza maggiore e l'altezza totale, considerando, cioè, tutte le calcificazioni come un'unica sola calcificazione (Figura 13).



**Figura 13: misurazione della lunghezza della calcificazione**

Successivamente con il metodo delle ROI (region of interest) abbiamo valutato, sempre in assiale, la densità di ogni singola calcificazione, espressa in Unità Hounsfield (HU), e in presenza di più calcificazioni abbiamo valutato la densità media tra le varie calcificazioni e la calcificazione avente la densità massima ( Figura 14).



**Figura 14: misurazione in TC della densità delle calcificazioni aortiche**

Una volta ottenuti tali valori, per ottemperare al primo obiettivo propostoci, li abbiamo confrontati singolarmente con i valori di T score Femorale e T score Lombare registrati al “tempo zero”.

Nella seconda fase dello studio abbiamo valutato la correlazione tra le modificazione della densità ossea con le variazioni delle calcificazioni dell'aorta addominale durante la terapia con Inibitori dell'Aromatasi (dopo un anno di trattamento).

Per fare questo abbiamo utilizzato la MOC DEXA dopo dodici mesi di trattamento e abbiamo calcolato la differenza, delta, tra i valori del T score Femorale e Lombare con quelli al "tempo zero".

Alla TC a dodici mesi abbiamo ricalcolato il numero, la densità e l'altezza delle calcificazioni e in seguito abbiamo calcolato il delta per ogni singolo parametro confrontandolo con quelli rilevato alla TC basale.

Per quanto concerne la diagnostica ci siamo quindi avvalsi dell'utilizzo della MOC DEXA e della TC SCAN TOTAL BODY.

### **Mineralometria Ossea Computerizzata**

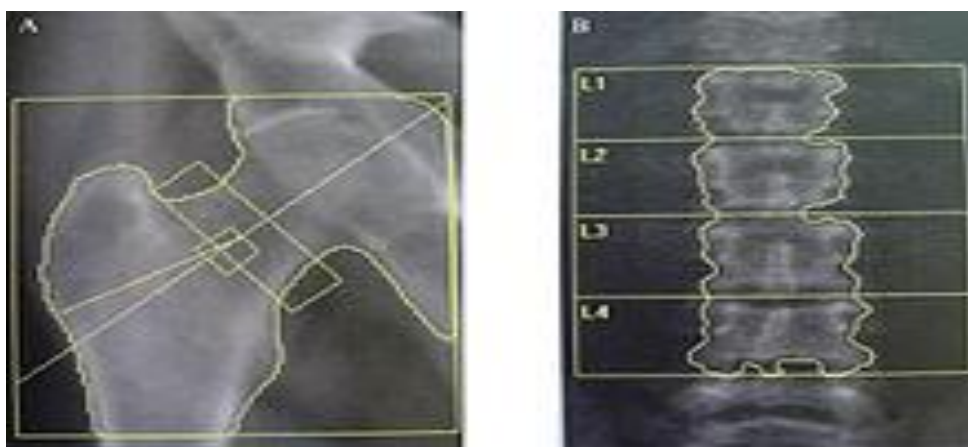
La mineralometria ossea computerizzata (MOC), è un mezzo per la misura della densità minerale ossea (Bone Mineral Density, BMD). Di questa tecnica esistono diverse tipologie, tra cui in particolare la MOC SPA (MOC a singolo raggio fotonico), MOC DPA (MOC a doppio raggio fotonico), la MOC DEXA (Dual-energy X-ray absorptiometry), la MOC QTC (tomografia quantitativa computerizzata) e la MOC QUS (ultrasonografia quantitativa). Adesso le metodiche cui si ricorre maggiormente per eseguire una mineralometria sono la MOC DEXA, che richiede l'utilizzo di un apparecchio a raggi X, e la MOC QUS, che fa affidamento su apparecchiature basate su ultrasuoni. L'assorbimetria a raggi X a doppia energia (DXA, precedentemente DEXA) comporta l'emissione di due fasci di raggi X, con differenti livelli di energia, che vengono inviati sul tessuto osseo del paziente. Una volta sottratto l'assorbimento del tessuto molle, è possibile determinare l'assorbimento del fascio da parte dell'osso e quindi la densità minerale ossea. Tale assorbimento per il principio dell'assorbimetria fotonica è infatti proporzionale alla densità dei tessuti ossei. Ad oggi l'assorbimetria a raggi X a doppia energia è la tecnologia più usata e più studiata. La scansione DEXA è in genere utilizzata per diagnosticare e valutare l'evoluzione

dell'osteoporosi, laddove la scintigrafia nucleare ossea risulta più sensibile ad alcune malattie metaboliche ossee, quali infezioni, fratture o tumori.

Le scansioni DXA sono utilizzate principalmente per valutare la densità minerale ossea. Tali scansioni possono anche essere utilizzate per misurare la composizione corporea e la percentuale di grassi con un alto grado di precisione<sup>114</sup>.

Infatti mediante specifici algoritmi matematici viene calcolata la misura del patrimonio minerale dello scheletro, il quale è costituito in prevalenza da cristalli di idrossiapatite di calcio.

Con la MOC DEXA s'individuano il T-score e lo Z-score. Si tratta di due indici statistici elaborati per rendere possibile il confronto dei valori della densità minerale (BMD, Bone Mineral Density) di un determinato paziente con i valori medi di densità riscontrabili in una popolazione di riferimento definita come "normale o sana". Il T-score è utilizzato di preferenza in soggetti di età superiore ai trent'anni. Valori negativi di T-score e di Z-score stanno a indicare che la densità ossea di un determinato individuo si pone al di sotto della media. Al ridursi del T-score o dello Z-score il rischio di fratture aumenta.



**Figura 15: valutazione del T Score Femorale e Lombare**

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha definito le seguenti categorie, in base alla densità ossea, nelle donne bianche (Figura 8):

Normalità: T-score non inferiore a -1

Osteopenia iniziale: T-score compreso tra -1 e -1,5

Osteopenia: T-score compreso tra -1,6 e -2,5

Osteoporosi: T-score inferiore a -2.5

Osteoporosi grave (consolidata): T-score inferiore a -2.5 e una o più fratture  
atraumatiche oppure fratture per traumi di lieve entità.

### **Tomografia Computerizzata**

La tomografia computerizzata (Figura 9), in radiologia, indicata con l'acronimo TC o CT (dall'inglese *computed tomography*), è una metodica diagnostica per immagini, che sfrutta radiazioni ionizzanti (raggi X) e consente di riprodurre sezioni o strati (tomografia) corporei del paziente ed effettuare elaborazioni tridimensionali. Per la produzione delle immagini è necessario l'intervento di un elaboratore di dati (computerizzata)<sup>115</sup>.



**Figura 16: TC SCAN**

Il principio su cui si basa la ricostruzione tomografica è che acquisendo tante proiezioni radiografiche dello stesso oggetto ad angolazioni diverse è possibile ricostruire l'oggetto nella sua terza dimensione. Infatti acquisendo una radiografia in pratica si ottiene una misura integrale (cioè una somma lungo il percorso) dell'attenuazione del fascio di raggi X lungo una certa direzione. Riprendendo altre proiezioni a diversi angoli si ottengono altre misure che possono essere utilizzate per risolvere il problema inverso della ricostruzione dell'oggetto che le ha generate. Per

ottenere la terza dimensione si utilizzano complessi algoritmi matematici tra i quali i metodi di retroproiezione filtrata (algoritmo Filtered Back Projection, FBP) se il fascio di raggi X è parallelo o a ventaglio, il metodo di Feldkamp se il fascio è conico oppure metodi iterativi<sup>116</sup>.

L'emettitore del fascio di raggi X ruota attorno al paziente ed il rivelatore, al lato opposto, raccoglie l'immagine di una sezione del paziente; il lettino del paziente scorre in modo molto preciso e determinabile all'interno di un tunnel di scansione, presentando a ogni giro una sezione diversa del corpo. Le sequenze di immagini, assieme alle informazioni dell'angolo di ripresa, sono elaborate da un computer, che presenta il risultato sul monitor. Tale risultato è costituito da una serie di sezioni non necessariamente contigue di spessore preimpostato: l'insieme delle sezioni ricostruite costituiscono i dati inerenti al volume di scansione che possono essere ricostruiti da un software di rendering tridimensionale per produrre immagini tomografiche di qualsiasi piano spaziale (frontale, sagittale, assiale) o, in alternativa, per ottenere immagini tridimensionali o endoscopiche.

### **Analisi statistica**

Le analisi di correlazione sono state ottenute utilizzando il test di Pearson. Le variazioni di densità delle calcificazioni aortiche tra la TC basale e quella a 12 mesi dall'inizio del trattamento con IA sono state confrontate tramite t test per variabili continue (Mann Whitney U test).

Sono stati considerati significativi valori di  $p < 0.005$ . Le analisi statistiche sono state eseguite tramite il software SPSS (versione 19.00, SPSS, Chicago).



## RISULTATI

### Caratteristiche dei pazienti

Ottanta pazienti sono state incluse nello studio. L'età media delle pazienti è stata di sessanta anni. Tutte le pazienti, in stato ormonale postmenopausale, avevano una diagnosi istologica di carcinoma mammario ER+ PR+. Secondo la classificazione TNM, sono state incluse pazienti fino allo stadio IIB.

Le caratteristiche clinico patologiche delle pazienti arruolate sono sintetizzate nella tabella che segue (tabella 8):

<b>Caratteristiche</b>	<b>Nr pazienti</b>	<b>% Pazienti</b>
N° totale dei casi	75	
Età (anni)		
Media ( $\pm$ DS)	60 $\pm$ 11	
Mediana (range)	60 (41-81)	
<60 anni	35	46,6
>60 anni	40	53,5
Sesso		
Femmine	75	100
Maschi	0	0
Diagnosi istologica di carcinoma mammario ER+ PR+	75	100
Stato ormonale:		
post menopausale	75	100
premenopausale	0	0
Stadio		
Ia	9	12
Ib	14	18,6
IIa	41	54,6
IIb	11	14,6
III	0	0
IV	0	0

Tabella 8. Caratteristiche clinico-patologiche delle pazienti

Segue inoltre tabella con i dati di analisi descrittiva dei risultati di numero/dimensione/densità delle placche aterosclerotiche aortiche evidenziate alla

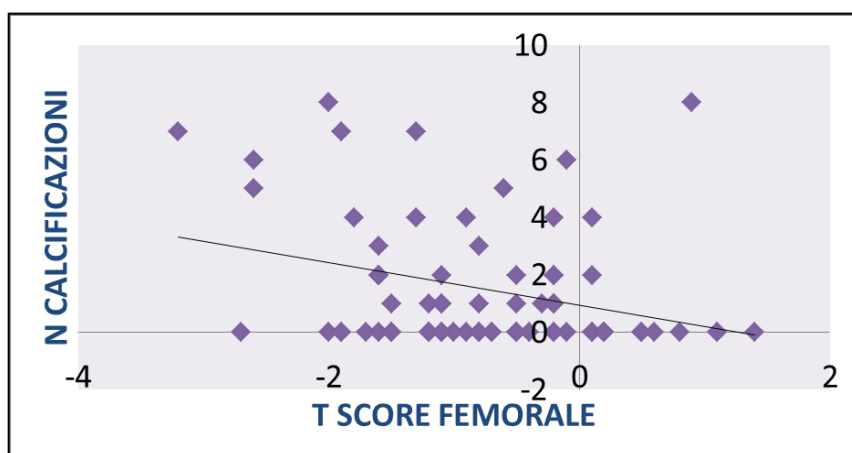
TC basale e dopo 12 mesi di ormonoterapia con IA e dei risultati MOC (T score femorale e lombare) sempre ai tempi T0 e T1. (tabella 9)

<b>VARIABILE</b>	<b>STATISTICA</b>	<b>(T0)</b>	<b>(T1)</b>
<b><u>N^A CALCIFICAZIONI</u></b>	<i>Media</i>	1,48	2
	<i>Mediana</i>	0	1
	<i>Deviazione standard</i>	2,23	2,4
	<i>intervallo</i>	0-8	0-10
<b><u>DENSITA' MEDIA (HU)</u></b>	<i>Media</i>	87	128
	<i>Mediana</i>	0	152
	<i>Deviazione standard</i>	120	117
	<i>intervallo</i>	0/545	0/384
<b><u>DENSITA' MAX (HU)</u></b>	<i>Media</i>	118	168
	<i>Mediana</i>	0	157
	<i>Deviazione standard</i>	174	174
	<i>intervallo</i>	0/712	0/712
<b><u>ALTEZZA MEDIA (cm)</u></b>	<i>Media</i>	0.5	0.7
	<i>Mediana</i>	0	0.6
	<i>Deviazione standard</i>	0.8	0.7
	<i>intervallo</i>	0/3,4	0/2.9
<b><u>ALTEZZA MAX (cm)</u></b>	<i>Media</i>	0.8	01,14
	<i>Mediana</i>	0	0.7
	<i>Deviazione standard</i>	1.3	1.5
	<i>intervallo</i>	0/5,3	0/7,2
<b><u>ALTEZZA TOT (cm)</u></b>	<i>Media</i>	1.8	2.5
	<i>Mediana</i>	0	0.9
	<i>Deviazione standard</i>	3,3	3,8
	<i>intervallo</i>	0/15,2	0/18,2
<b><u>T SCORE FEMORALE BASALE (DS)</u></b>	<i>Media</i>	-0.73	-0.9
	<i>Mediana</i>	-0.75	-0.9
	<i>Deviazione standard</i>	0.94	0.8
	<i>intervallo</i>	-2,6/1,1	-2,5/1,1
<b><u>T SCORE LOMBARE BASALE (DS)</u></b>	<i>Media</i>	-1,1	-1,3
	<i>Mediana</i>	-1,1	-1,3
	<i>Deviazione standard</i>	1,2	1,1
	<i>intervallo</i>	-4.9 /1,27	-4.9 /1

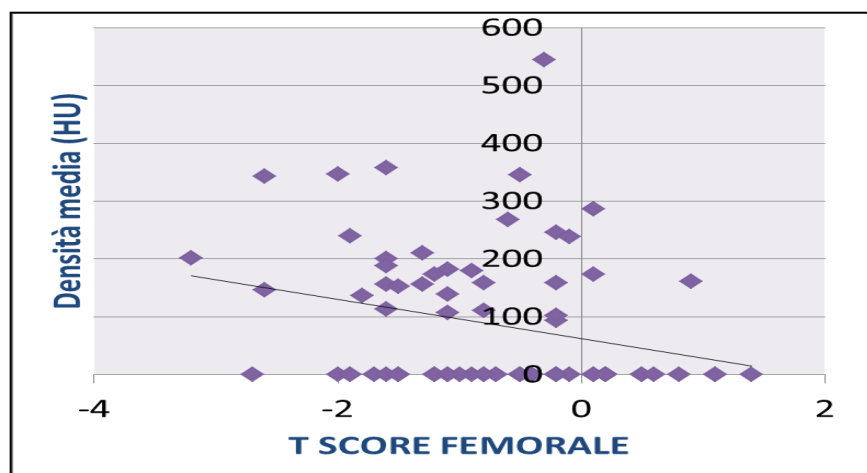
**Tabella 9. Analisi descrittiva dei risultati TC e MOC al tempo zero (T0) e dopo 12 mesi di terapia ormonale (T1)**

**Correlazione tra i parametri di calcificazione aortica e i valori di T score lombare e femorale in pazienti candidate a trattamento con IA.**

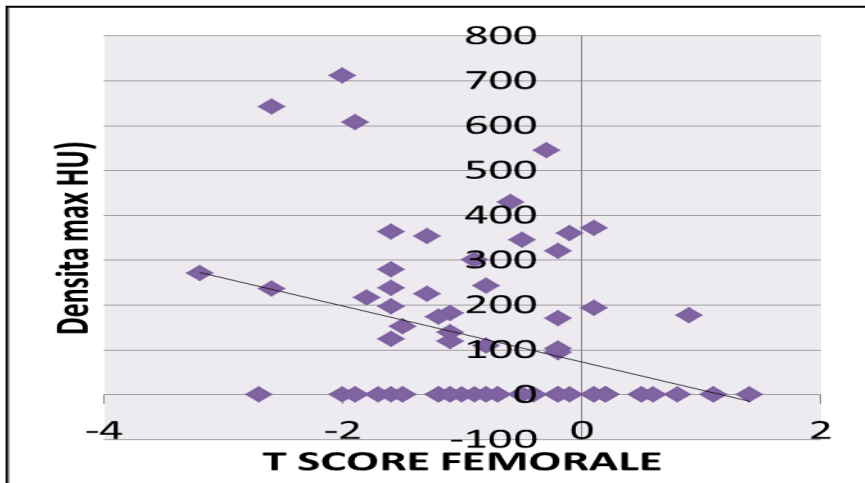
La prima correlazione individuata è stata quella tra il numero di calcificazioni alla TC basale e il T score femorale. Tale correlazione aveva una significatività importante  $P < 0,004$ . ( $r = -0.32$ )



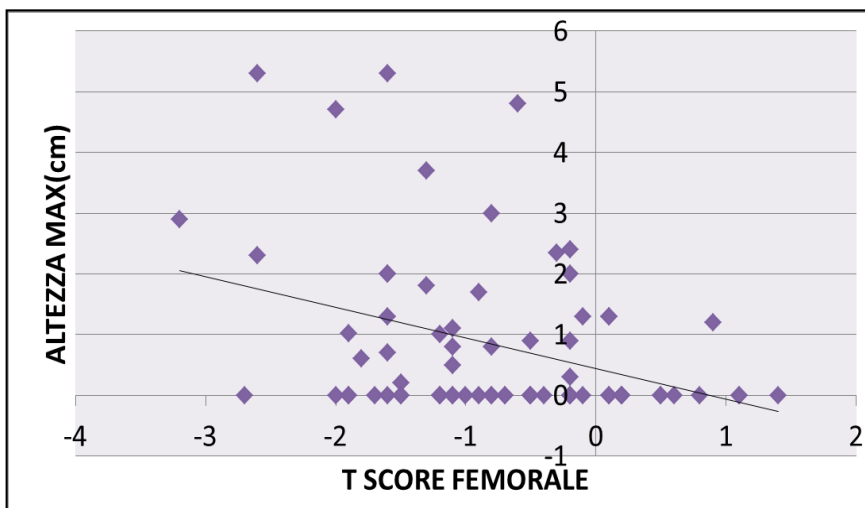
La seconda correlazione individuata è stata quella tra la densità media delle calcificazioni alla TC basale e il T score femorale. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,02$ . ( $r = -0.26$ )



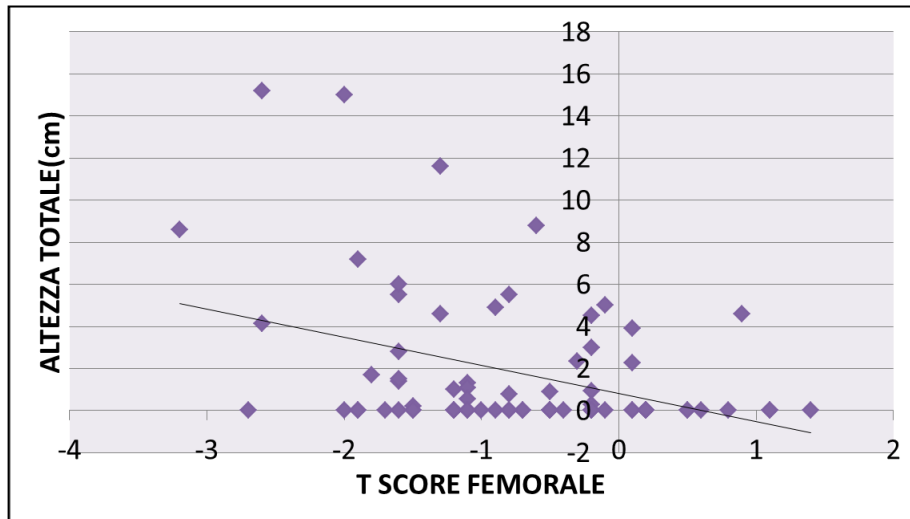
La terza correlazione individuata è stata quella tra la densità massima delle calcificazioni alla TC basale e il T score femorale. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,004$  ( $r = -0.33$ )



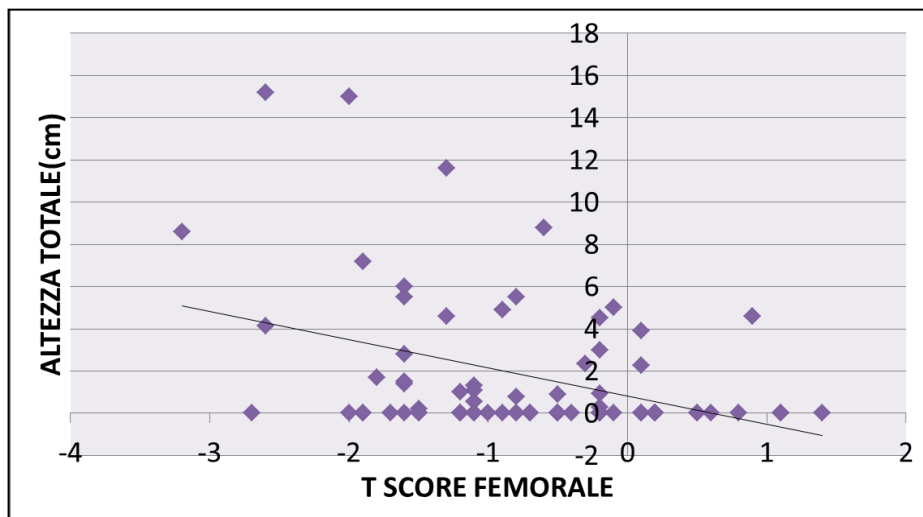
La quarta correlazione individuata è stata quella tra l'altezza media delle calcificazioni alla TC basale e il T score femorale. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,017$  ( $r = -0.27$ )



La quinta correlazione individuata è stata quella tra l'altezza massima delle calcificazioni alla TC basale e il T score femorale. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,014$  ( $r = -0.36$ )

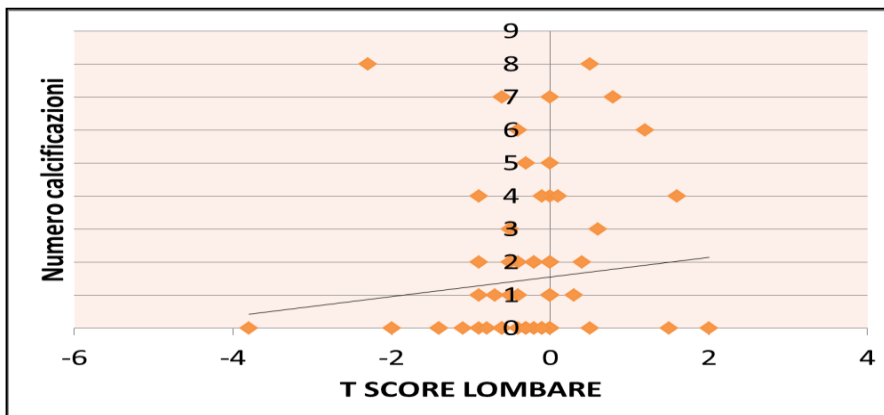


La sesta correlazione individuata è stata quella tra l'altezza totale delle calcificazioni alla TC basale e il T score femorale. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,005$  ( $r = -0.39$ )

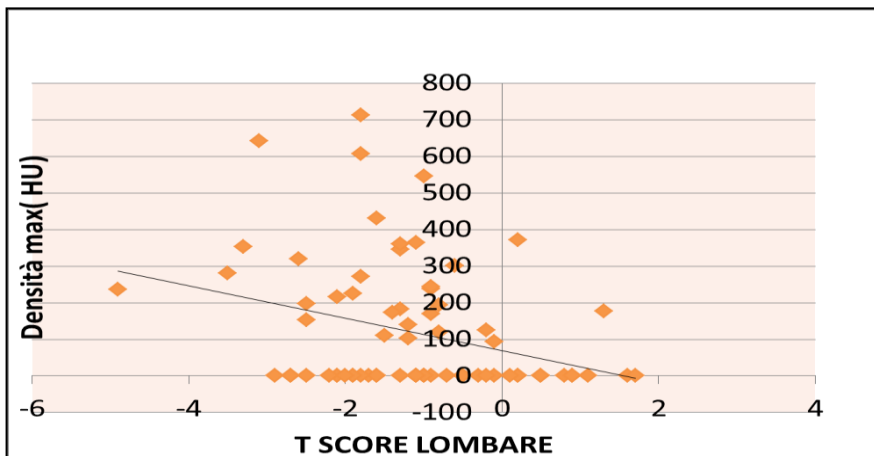


Le stesse valutazioni sono state eseguite con il T score lombare

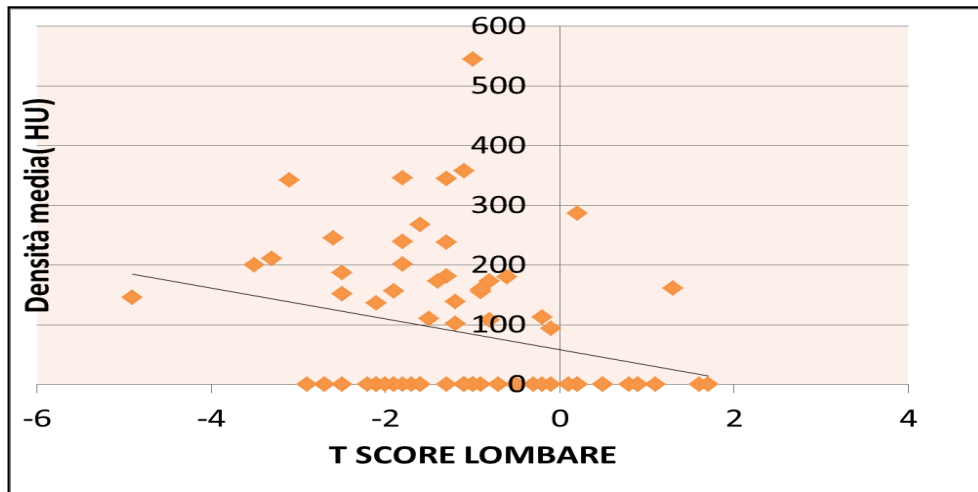
La prima correlazione individuata è stata quella tra il numero di calcificazioni alla TC basale e il T score lombare. Tale correlazione non risultava significativa pari a  $P < 0,052$  ( $r = -0,22$ )



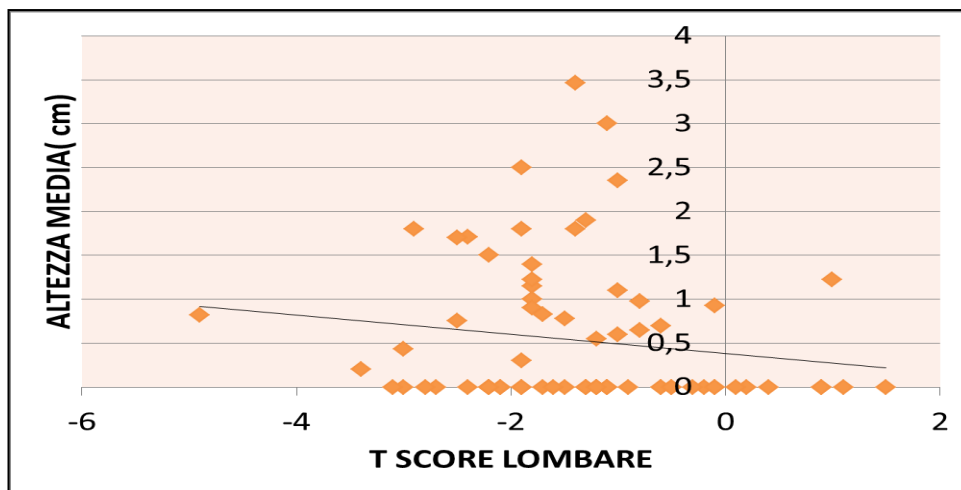
La seconda correlazione individuata è stata quella tra la densità massima delle calcificazioni alla TC basale e il T score lombare. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,007$  ( $r = -0,30$ )



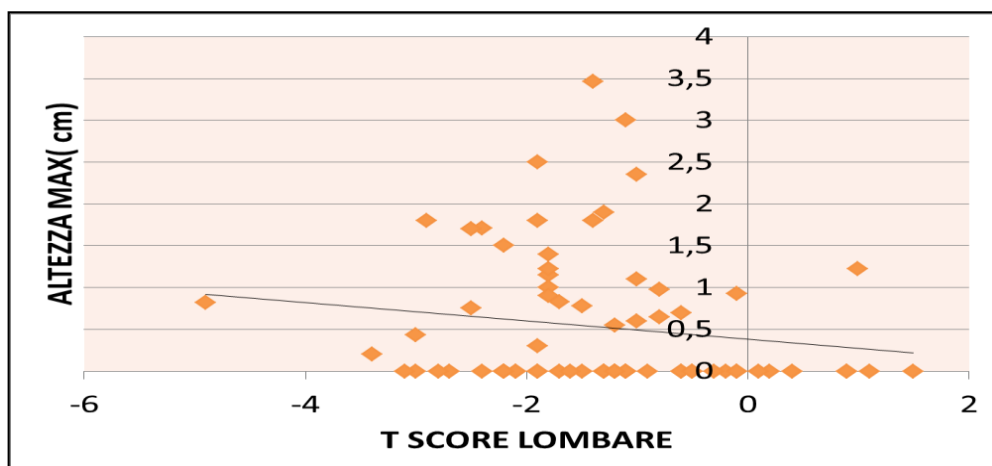
La terza correlazione individuata è stata quella tra la densità media delle calcificazioni alla TC basale e il T score lombare. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,03$  ( $r = -0.25$ )



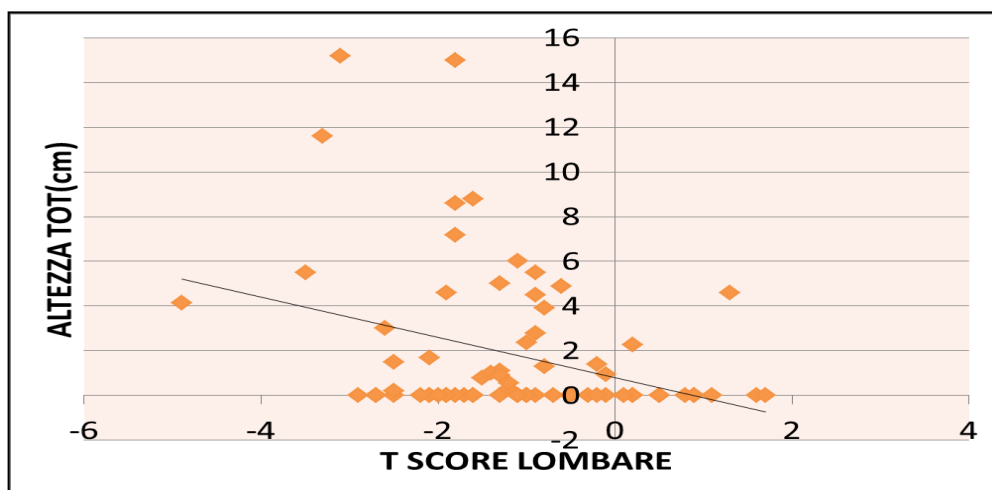
La quarta correlazione individuata è stata quella tra l'altezza media delle calcificazioni alla TC basale e il T score lombare. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,03$  ( $r = -0.24$ )



La quinta correlazione individuata è stata quella tra la altezza massima delle calcificazioni alla TC basale e il T score lombare. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,007$  ( $r = -0.30$ )



La sesta correlazione individuata è stata quella tra l'altezza massima delle calcificazioni alla TC basale e il T score lombare. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,006$  ( $r = -0.30$ )

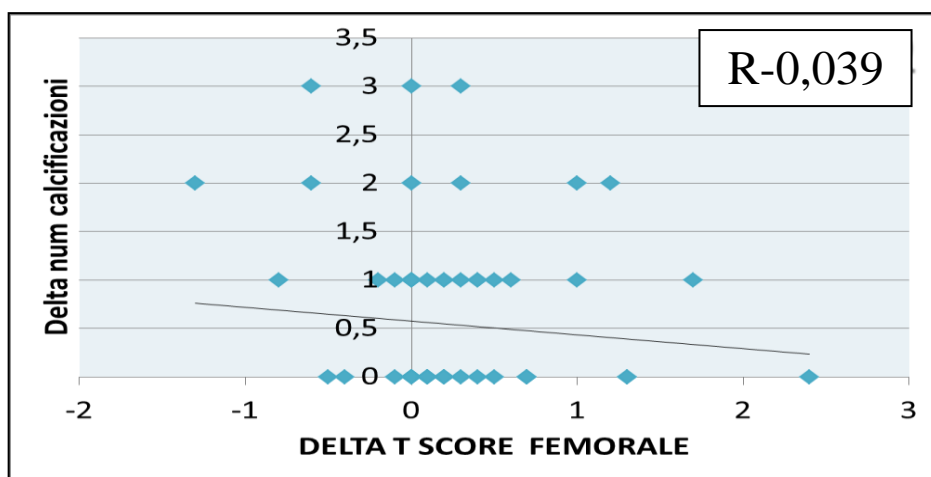


**Correlazione tra le variazioni nei parametri di calcificazione aortica e i valori di T score lombare e femorale in corso di trattamento con Inibitori dell'Aromatasi**

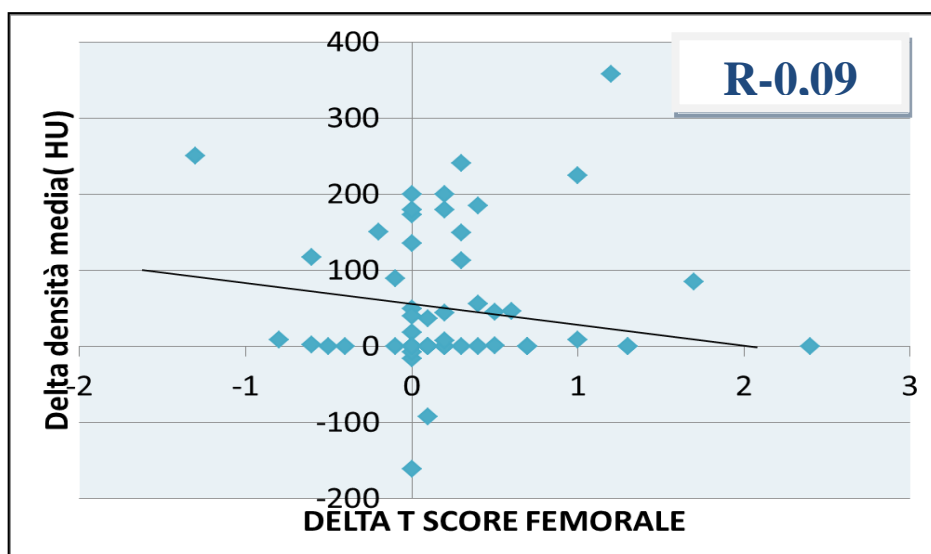


Nella seconda fase dello studio abbiamo valutato la correlazione tra le modificazione della densità ossea con le variazioni delle calcificazioni dell'aorta addominale durante la terapia con Inibitori dell'Aromatasi.

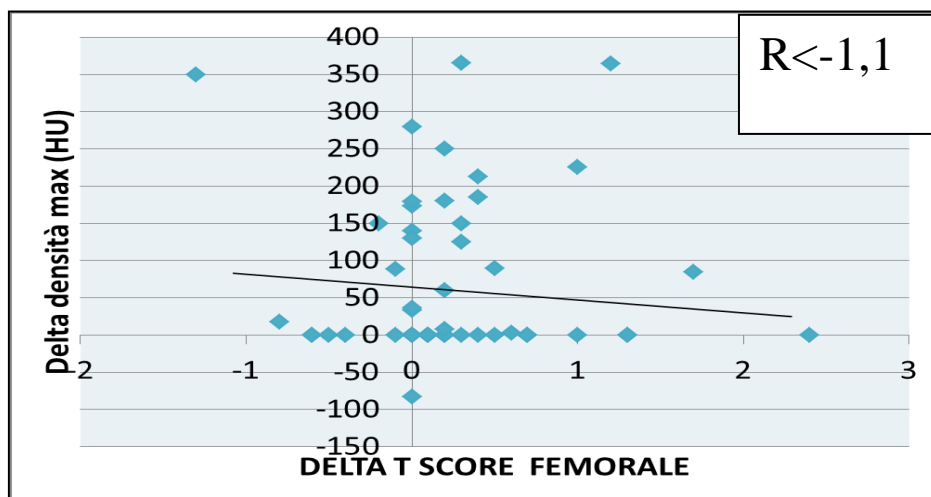
La prima correlazione individuata è stata quella tra il delta numero delle calcificazioni alla TC a dodici mesi e il delta T score femorale alla MOC dopo dodici mesi di terapia. Ne è risultato un rapporto di correlazione inversa, pari a R-0,039



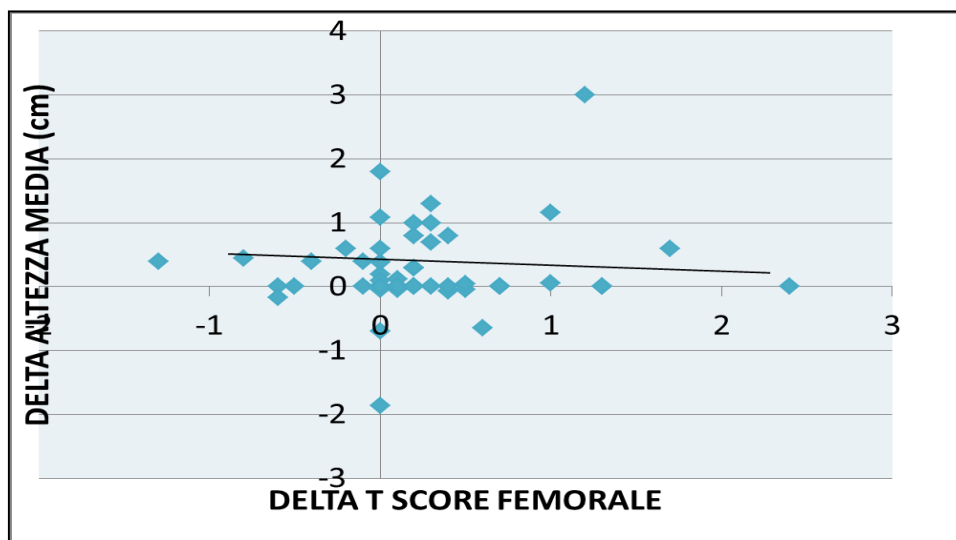
La seconda correlazione individuata è stata quella tra il delta densità media delle calcificazioni alla TC a dodici mesi e il delta T score femorale alla MOC dopo dodici mesi di terapia. Tale rapporto presentava una correlazione inversa pari a R<-0,09



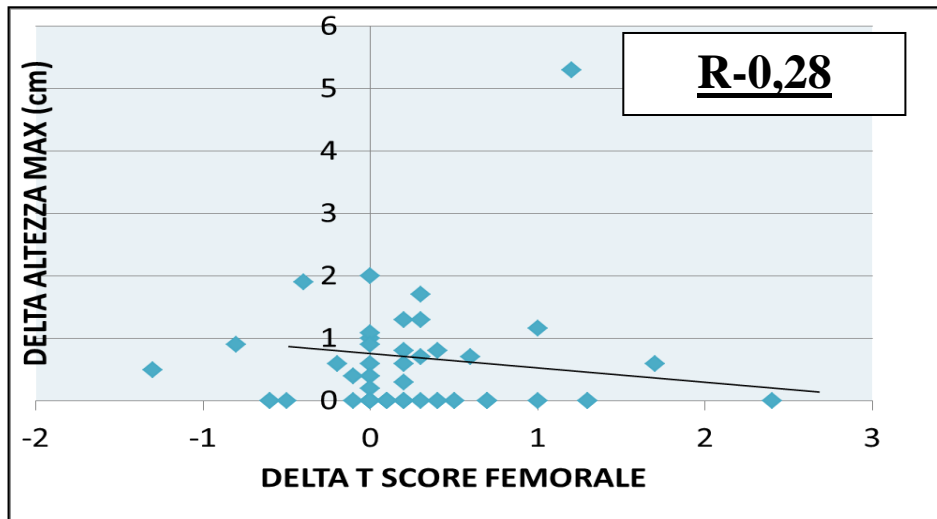
La terza correlazione individuata è stata quella tra il delta densità massima delle calcificazioni alla TC a dodici mesi e il delta T score femorale alla MOC dopo dodici mesi di terapia. Tale rapporto presentava una correlazione inversa pari a  $R < -1,1$



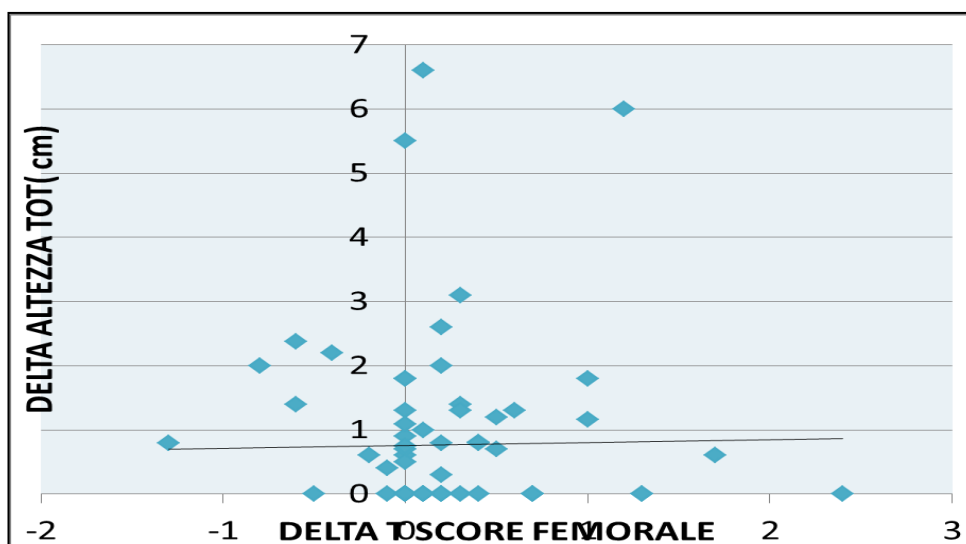
La quarta correlazione individuata è stata quella tra il delta altezza media delle calcificazioni alla TC a dodici mesi e il delta T score femorale alla MOC dopo dodici mesi di terapia. Tale rapporto presentava una correlazione inversa pari  $R < -0,04$



La quinta correlazione individuata è stata quella tra il delta altezza massima delle calcificazioni alla TC a dodici mesi e il delta T score femorale alla MOC dopo dodici mesi di terapia. Tale correlazione aveva un rapporto pari a R-0,28

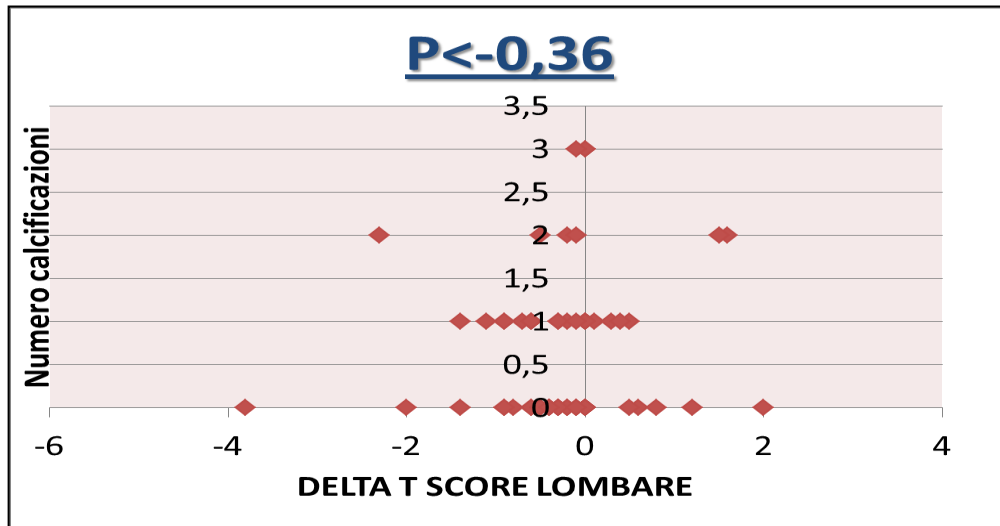


La sesta correlazione individuata è stata quella tra il delta altezza totale delle calcificazioni alla TC a dodici mesi e il delta T score femorale alla MOC dopo dodici mesi di terapia. Tale rapporto presentava una correlazione inversa pari R<-0,09

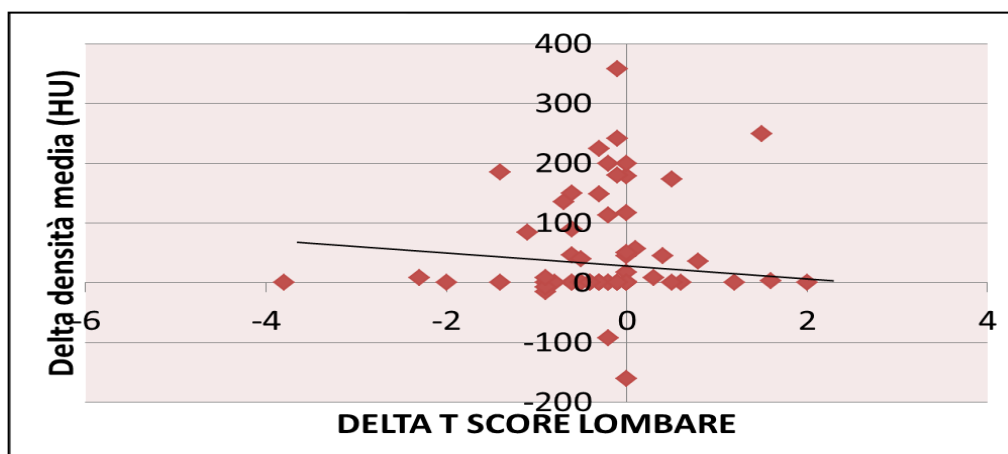


Le stesse valutazioni sono state eseguite con il delta T score lombare

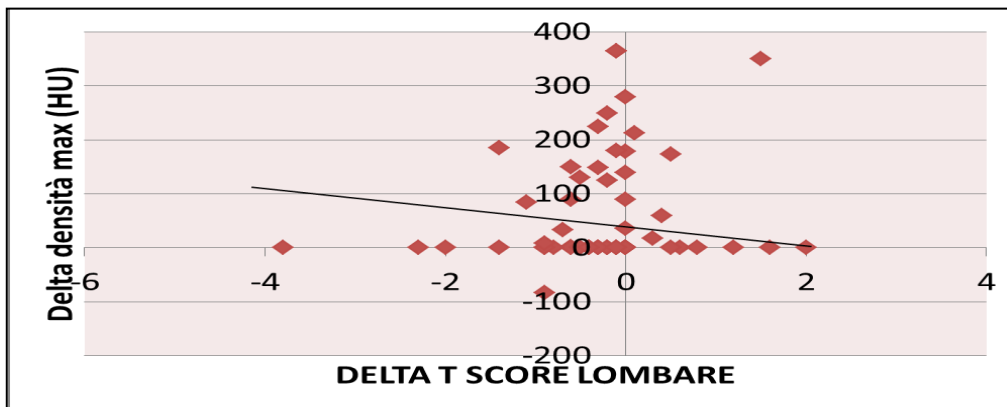
La prima correlazione individuata è stata quella tra il delta numero delle calcificazioni alla TC a dodici mesi e il delta T score lombare alla MOC dopo dodici mesi di terapia. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,05$



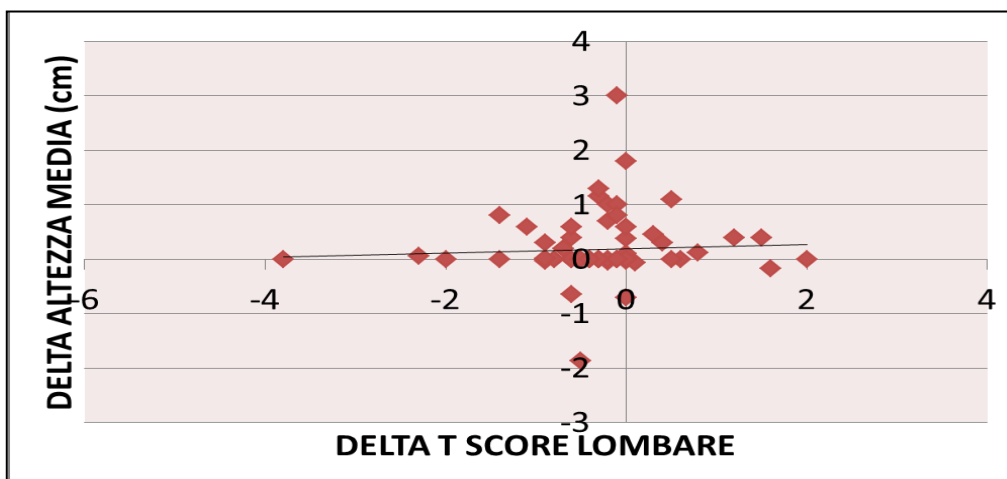
La seconda correlazione individuata è stata quella tra il delta densità media delle calcificazioni alla TC a dodici mesi e il delta T score lombare alla MOC dopo dodici mesi di terapia. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,008$



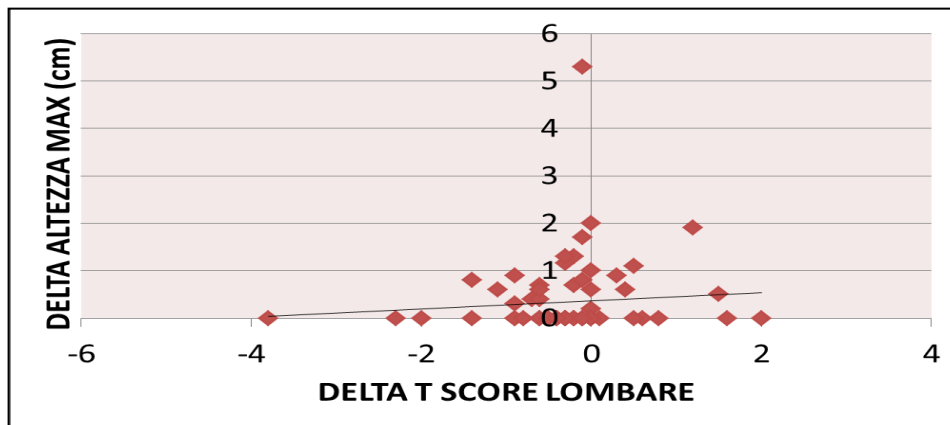
La terza correlazione individuata è stata quella tra il delta densità massima delle calcificazioni alla TC a dodici mesi e il delta T score lombare alla MOC dopo dodici mesi di terapia. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,006$



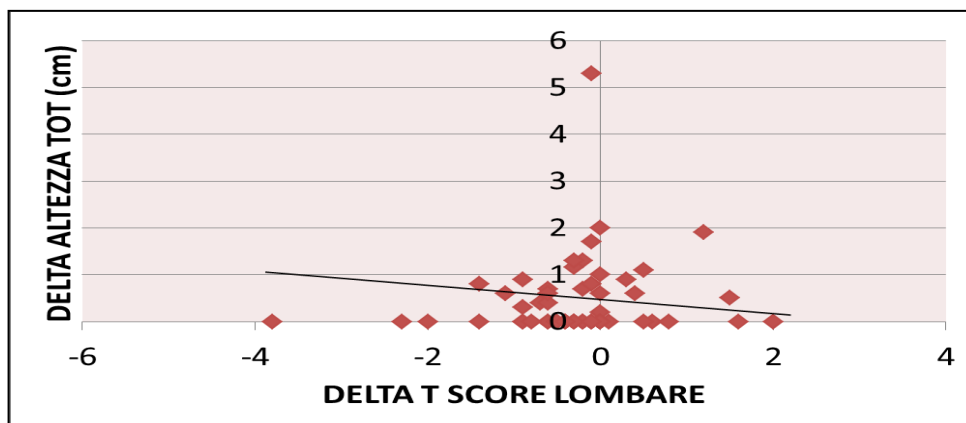
La quarta correlazione individuata è stata quella tra il delta altezza media delle calcificazioni alla TC a dodici mesi e il delta T score lombare alla MOC dopo dodici mesi di terapia. Tale correlazione aveva una significatività pari a  $P < 0,009$



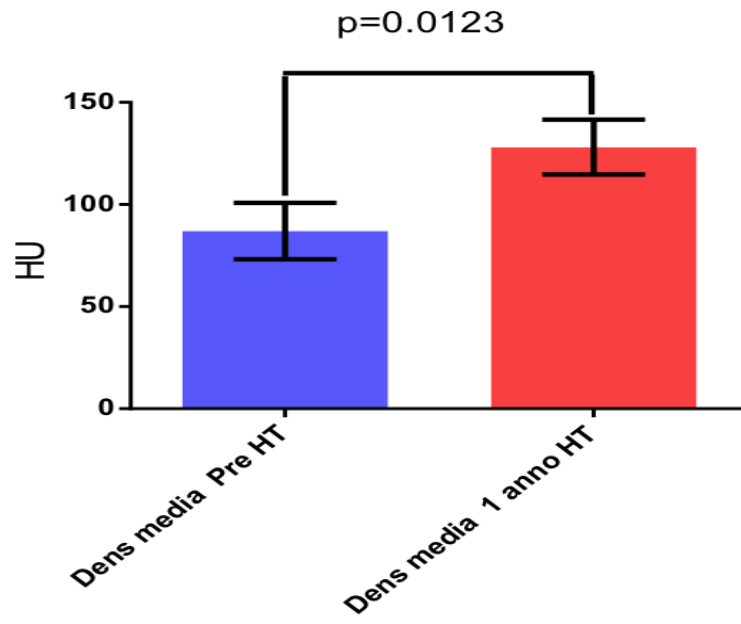
La quinta correlazione individuata è stata quella tra il delta altezza massima delle calcificazioni alla TC a dodici mesi e il delta T score lombare alla MOC dopo dodici mesi di terapia. Tale rapporto presentava una correlazione inversa pari  $R < -0,08$



La sesta correlazione individuata è stata quella tra il delta altezza totale delle calcificazioni alla TC a dodici mesi e il delta T score lombare alla MOC dopo dodici mesi di terapia. Tale rapporto presentava una correlazione inversa pari  $R < -0,19$



Una successiva valutazione che abbiamo eseguito è il confronto tra la densità media delle calcificazioni basali e la densità media delle calcificazioni a distanza di dodici mesi dall'inizio della terapia. La significatività è stata del  $P < 0,0123$



## DISCUSSIONE

Si può ragionevolmente affermare che gli obiettivi del nostro studio siano stati altresì raggiunti.

Per quanto concerne, infatti, la correlazione tra l'osteoporosi e il livello di calcificazioni dell'aorta addominale, diversi studi clinici hanno evidenziato come questa correlazione sussista in donne con età maggiore di 65 anni e quindi in avanzata fase post-menopausale<sup>100,101</sup>. Tuttavia, mentre nello studio di Bagger et al. le calcificazioni aortiche venivano valutate mediante RX addominale e confrontate con la MOC DEXA, lo studio di E. Schultz et al. confrontava l'osteoporosi con le calcificazioni rilevate alla TC addome.

**Nessuno di questi studi ha evidenziato come questa correlazione sia rilevante in pazienti oncologiche, trattate con Inibitori dell'Aromatasi.**

Dal nostro studio si evince una chiara correlazione tra i valori MOC e i valori delle calcificazioni rilevate in TC in pazienti oncologiche candidate a terapia ormonale.

Da quanto analizzato i vari T score e i singoli parametri delle calcificazioni (numero, densità media, densità massima, altezza media, altezza massima e altezza totale) presentano un rapporto di correlazione diretta per cui più i soggetti perdevano massa ossea, più aumentava il numero, la densità e l'altezza delle calcificazioni.

Abbiamo rilevato, inoltre, tale correlazione tanto con il T score Femorale, quanto con il T score lombare. L'unica differenza riscontrata è stata l'assenza di significatività tra il T score lombare e il numero di calcificazioni, correlazione esistente, invece, con il T score femorale. A nostro avviso tale dato è da associare probabilmente al numero dei soggetti esaminati.

Tali risultati non si discostano, anzi rimarcano i dati della letteratura precedente.

Tuttavia il contributo fornito dal **nostro studio** è volto a **porre l'accento su come la sola perdita di massa ossea, non già l'osteoporosi franca, possa essere correlata di per se alla presenza di calcificazioni aortiche.**

Non solo, ma il **trattamento con gli Inibitori dell'Aromatasi può essere considerato un modello di rapida sviluppo dell'osteoporosi.** Tali risultati non erano mai stati valutati in letteratura.



Abbiamo riscontrato, inoltre, una **correlazione inversa tra le modificazione della densità ossea con le variazioni delle calcificazioni dell'aorta addominale durante la terapia con Inibitori dell'Aromatasi.**

**I dati da noi rilevati hanno evidenziato come al peggioramento della perdita ossea, corrispondesse un aumento del numero di calcificazione, della loro densità e della loro altezza.**

Il rapporto di correlazione inversa rafforza la nostra ipotesi, poiché non solo, stando ai dati di partenza, **i soggetti più osteopenici presentavano più calcificazioni, ma anche perché questo trend in peggioramento si associava a un aumento anche delle calcificazioni a conferma dell'accelerazione di entrambi i processi (perdita di densità ossea e calcificazione aortica) in corso di terapia con inibitori dell'aromatasi.**

**Un altro dato interessante è stato che: laddove i pazienti, pur perdendo massa ossea, non presentavano un aumento delle calcificazioni, gli stessi subivano un aumento della densità delle calcificazioni già esistenti.**

Le differenze tra i valori di densità media delle calcificazioni basali e di densità media delle calcificazioni a distanza di dodici mesi dall'inizio della terapia ormonale sono infatti risultate statisticamente significative.

Da ciò si evince come **tra tutti i valori delle calcificazioni rilevati, la densità media rappresenti il valore più direttamente connesso con le variazioni ormonali indotte da inibitori dell'aromatasi e probabilmente il valore più correttamente da correlare con le corrispettive variazioni di densità ossea.**

Non era mai stata valutata in letteratura la correlazione tra la perdita di massa ossea e il corrispettivo incremento di densità delle calcificazioni. Infatti tutti i lavori precedenti hanno confrontato unicamente la presenza delle calcificazioni o non già la qualità delle stesse. A nostro avviso questa correlazione è molto rilevante per le future implicazioni cliniche.

Alcuni studi sperimentali<sup>117</sup> hanno evidenziato come sia possibile sfruttare l'altezza totale della calcificazione per individuare il rischio di eventi cardiovascolari. Gli score utilizzati sono quelli proposti da Schousboe, Wilson, and Kiel<sup>118,119</sup>.

Secondo questo score l'altezza della calcificazione veniva valutata in confronto con l'altezza della vertebra adiacente la calcificazione, in particolar modo tra L1 e L4.

Più era elevata l'altezza della calcificazione maggiore era il rischio accidente cardiovascolare.

Pur non avendo valutato il rischio cardiovascolare, il nostro studio ha posto l'accento sull'importanza della correlazione dell'altezza delle calcificazioni con la perdita di massa ossea e questo potrebbe essere un ulteriore link che conferma quanto già visto in letteratura, ovvero la stretta relazioni tra l'osteoporosi, valutata nei suoi effetti vascolari con l'altezza delle calcificazioni, e il rischio cardiovascolare.

Nelle pazienti con osteoporosi la riduzione in BMD è stata infatti dimostrata essere un fattore predittivo indipendente di aterosclerosi<sup>95</sup>: ulteriori studi mirati potrebbero confermare questo ruolo predittivo di rischio cardiovascolare della perdita di massa ossea nelle donne in terapia con inibitori dell'aromatasi.

## **Prospettive future**

A nostro avviso, molteplici possono essere le implicazioni della valutazione della presenza delle calcificazioni al livello dell'aorta addominale.

In primis, per quanto detto in precedenza e confermato dalla letteratura (Schultz), è ragionevole ipotizzare che le **calcificazioni dell'aorta addominale possano essere considerate un fattore predittivo di perdita di massa ossea in corso terapia con inibitori dell'aromatasi**. E pertanto in quelle pazienti per le quali si è in dubbio sull'inizio o meno di una terapia con bifosfonati, la presenza delle calcificazioni potrebbe essere considerata un fattore che fa pendere l'ago della bilancia verso la scelta di iniziare il trattamento.

Inoltre è verosimile supporre che un trattamento anti-osteoporotico, quali appunto il Denosumab o i Bifosfonati, possano modificare lo stato di calcificazioni. Questo dunque potrebbe essere considerato un segno indiretto di risposta al trattamento.

Un'ultima considerazione va al ruolo della TC.

E' pioneristico pensare che la TC possa sostituire la MOC, ma è razionale ipotizzare che la TC possa fornire informazioni aggiuntive alla MOC, soprattutto grazie alla valutazione della densità delle calcificazioni. Se è vero che tale densità aumenta con il diminuire della massa ossea, grazie alla TC di controllo potrebbe essere possibile valutare queste ulteriore diminuzione.

Molti sono gli aspetti che questo studio ci ha permesso di valutare, come molti sono gli approfondimenti che potrebbero ancora essere effettuati.

Per questo il nostro studio non può ritenersi terminato, poiché vogliamo continuare a confrontare le calcificazioni dell'aorta con la MOC non solo dopo dodici mesi di terapia, ma per tutto il quinquennio del trattamento.

## Bibliografia

- 
- <sup>1</sup> DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin* 2011;61:409–18
  - <sup>2</sup> Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013;63:11–30.
  - <sup>3</sup> Germain D. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2011. p. 473–84.
  - <sup>4</sup> Desta Z, Flockhart DA. Germline pharmacogenetics of tamoxifen response: have we learned enough? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007. p. 5147–9.
  - <sup>5</sup> Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011. p. 646–74.
  - <sup>6</sup> Iqbal M, Davies MPA, Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Sloane JP. Subgroups of non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells. *J Pathol*. 2001;193:333–8.
  - <sup>7</sup> Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:791–9.
  - <sup>8</sup> Wiseman BS, Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*. 2002;296:1046–9.
  - <sup>9</sup> Van de Vijver MJ., He YD., van 't Veer LJ., et al. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
  - <sup>10</sup> Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013;24:2206-2223
  - <sup>11</sup> Edge SB, Byr DR, Compton CC, et al, editors. American Joint Committee on cancer (AJCC). *Cancer Staging manual*. Seventh edition. New York, Springer 2009.
  - <sup>12</sup> Dunne C, Burke JP, Morrow M, and Kell MR. Effects of margin status on local recurrence after breast conservation and radiation therapy for ductal carcinoma in situ. *J Clin Oncol* 2009;27:1615-1620.
  - <sup>13</sup> Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, et al. Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC trial. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:599-609.
  - <sup>14</sup> Galimberti V, Cole BF, Zurrada S et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2013;14:297-305.

- 
- <sup>15</sup> Bartelink H, Horiot J-C, Poortmans PM, et al. Impact of a Higher Radiation Dose on Local Control and Survival in Breast-Conserving Therapy of Early Breast Cancer: 10-Year Results of the Randomized Boost Versus No Boost EORTC 22881-10882 Trial. *J Clin Oncol* 2007;25:3259-3265.
- <sup>16</sup> Tsoutsou PG, Koukourakis MI, Azria D, et al. Optimal timing for adjuvant radiation therapy in breast cancer: a comprehensive review and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;2:102-116.
- <sup>17</sup> NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Breast Cancer. Version 1.2012. www.nccn.org
- <sup>18</sup> Adaniel C, Jhaveri K, Heguy A, et al. Genome-based risk prediction for early stage breast cancer. *Oncologist*. 2014 Oct;19(10):1019-1027.
- <sup>19</sup> RG, Rea DW, Handley K, et al. aTtom: Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6,953 women with early breast cancer. *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 5)
- <sup>20</sup> Francis PA, Regan MM, Fleming GF et al. Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*. 2015 Jan 29;372(5):436-446.
- <sup>21</sup> Bernhard J, Luo W, Ribic K et al. Patient-reported outcomes with adjuvant exemestane versus tamoxifen in premenopausal women with early breast cancer undergoing ovarian suppression (TEXT and SOFT): a combined analysis of two phase 3 randomised trials. *Lancet Oncol*. 2015 Jul;16(7):848-858.
- <sup>22</sup> Mankin HJ, Mankin CJ. Metabolic bone disease: a review and update. *Instr Course Lect*. 2008;57:575-93.
- <sup>23</sup> Day TF, Yang Y. Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90 Suppl 1:19-24.
- <sup>24</sup> Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem*. 2008;283:5866-75.
- <sup>25</sup> Lustberg MB, Reimbolt RE, Shapiro CL. Bone health in adult cancer survivorship. *Clin Oncol* 2012;30:3665-3674.
- <sup>26</sup> Bord S, Ireland DC, Beavan SR, et al: The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 32:136-141, 2003
- <sup>27</sup> Carbonell Sala S, Brandi ML. 2006 update on genetic determinants of osteoporosis. *J Endocrinol Invest*. 2007;30:2-7.
- <sup>28</sup> Chan GK, Duque G. Age-related bone loss: Old bone, new facts. *Gerontology*. 2002. p. 62-71.
- <sup>29</sup> Stykarsdottir U, Halldorsson B V, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med [Internet]*. 2008;358:2355-65.
- <sup>30</sup> Nakamura T. World Health Organization. *Clinical Calcium* 2007;17: 1022-1028

---

<sup>31</sup> Greep NC, Giuliano AE, Hansen NM, Taketani T, Wang H-J, Singer FR. The effects of adjuvant chemotherapy on bone density in postmenopausal women with early breast cancer. *Am J Med.* 2003;114:653–9.

<sup>32</sup> Zmuda JM, Cauley JA, Ljung BM, Bauer DC, Cummings SR, Kuller LH. Bone mass and breast cancer risk in older women: differences by stage at diagnosis. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:930–6.

<sup>33</sup> Van Poznak C, Sauter NP. Clinical management of osteoporosis in women with a history of breast carcinoma. *Cancer.* 2005. p. 443–56.

<sup>34</sup> Lustberg MB, Reinbolt RE, Shapiro CL. Bone health in adult cancer survivorship. *J Clin Oncol* [2012;30:3665–74.

<sup>35</sup> Shapiro CL, Manola J, Leboff M: Ovarian failure after adjuvant chemotherapy is associated with rapid bone loss in women with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 19:3306-3311, 2001

<sup>36</sup> Shapiro CL, Halabi S, Hars V, et al: Zoledronic acid preserves bone mineral density in premenopausal women who develop ovarian failure due to adjuvant chemotherapy: Final results from CALGB trial 79809. *Eur J Cancer* 47:683-689, 2011

<sup>37</sup> Saarto T, Blomqvist C, Valimaki M, et al: Chemical castration induced by adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy causes rapid bone loss that is reduced by clodronate: A randomized study in premenopausal breast cancer patients. *J Clin Oncol* 15:1341-1347, 1997

<sup>38</sup> Burstein HJ, Temin S, Anderson H et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol* 2014; 32: 2255–2269.

<sup>39</sup> Fogelman I, Blake GM, Blamey R, et al: Bone mineral density in premenopausal women treated for node-positive early breast cancer with 2 years of goserelin or 6 months of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF). *Osteoporos Int* 14:1001-1006, 2003

<sup>40</sup> Jonat W, Kaufmann M, Sauerbrei W, et al. Goserelin versus CMF as adjuvant therapy in premenopausal patients with node positive breast cancer: the Zoladex Early Breast Cancer Research Association Study. *J Clin Oncol* 2002;20: 4628-35.

<sup>41</sup> Gnant M, Mlineritsch B, Luschin-Ebengreuth G et al. Adjuvant endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal women with early-stage breast cancer: 5-year followup of the ABCSG-12 bone-mineral density substudy. *Lancet Oncol* 2008; 9: 840–849.

<sup>42</sup> Brufsky A, Bundred N, Coleman R, Lambert-Falls R, Mena R, Hadji P, et al. Integrated analysis of zoledronic acid for prevention of aromatase inhibitor-associated bone loss in postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole. *The oncologist.* 2008 p. 503–14

<sup>43</sup> Kristensen B, Ejlersen B, Dalgaard P, et al: Tamoxifen and bone metabolism in postmenopausal low-risk breast cancer patients: A randomized study. *J Clin Oncol* 12:992-997, 1994

- 
- <sup>44</sup> Powles TJ, Hickish T, Kanis JA, et al: Effect of tamoxifen on bone mineral density measured by dual-energy x-ray absorptiometry in healthy premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Oncol* 14:78-84, 1996
- <sup>45</sup> Markopoulos C, Tzoracoleftherakis E, Polychronis A, Venizelos B, Dafni U, Xepapadakis G, et al. Management of anastrozole-induced bone loss in breast cancer patients with oral risedronate: results from the ARBI prospective clinical trial. *Breast cancer research : BCR.* 2010 p. R24.
- <sup>46</sup> Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:2431–42.
- <sup>47</sup> Bundred NJ, Campbell ID, Davidson N, et al: Effective inhibition of aromatase inhibitor-associated bone loss by zoledronic acid in postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole: ZO-FAST study results. *Cancer* 112:1001- 1010, 2008
- <sup>48</sup> Llombart A, Frassoldati A, Pajja O, et al: Immediate administration of zoledronic acid reduces aromatase inhibitor-associated bone loss in postmenopausal women with early breast cancer: 12-month analysis of the E-ZO-FAST trial. *Clin Breast Cancer* 12:40-48, 2012
- <sup>49</sup> Mouridsen H, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A et al. Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 766–776.
- <sup>50</sup> Eastell R, Adams J, Clack G et al. Long-term effects of anastrozole on bone mineral density: 7-year results from the ATAC trial. *Ann Oncol* 2011; 22: 857–862.
- <sup>51</sup> Coombes RC, Kilburn LS, Snowdon CF, Paridaens R, Coleman RE, Jones SE, Jassem J, Van de Velde CJ, Delozier T, Alvarez I, et al. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2–3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007;369:559–570
- <sup>52</sup> ATAC Trialists' Group. Results of the ATAC (arimidex, tamoxifen, alone or in combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet.* 2005;365:60–62. [PubMed]
- <sup>53</sup> Coates AS, Keshaviah A, Thurlimann B, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Colleoni M, et al. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1–98. *Journal of Clinical Oncology.* 2007;25:486–492.
- <sup>54</sup> Hadji P, Body JJ, Aapro MS et al. Practical guidance for the management of aromatase inhibitor-associated bone loss. *Ann Oncol* 2008; 19: 1407–1416.
- <sup>55</sup> Reid DM, Doughty J, Eastell R, Heys SD, Howell A, McCloskey EV et al. Guidance for the management of breast cancer treatment-induced bone loss: a consensus position statement from a UK Expert Group. *Cancer Treat Rev* 2008; 34(Suppl 1):S3–18
- <sup>56</sup> Hadji P, Aapro MS, Body JJ, Bundred NJ, Brufsky A, Coleman RE et al. Management of aromatase inhibitor-associated bone loss in postmenopausal women with breast cancer: practical guidance for prevention and treatment. *Ann Oncol* 2011; 22: 2546–2555.
- <sup>57</sup> Coleman R, Body JJ, Aapro M, Hadji P, Herrstedt J. Group EGW. Bone health in cancer patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2014; 25(Suppl 3):iii124–iii137

---

<sup>58</sup> Gnant M, Hadji P. Prevention of bone metastases and management of bone health in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:216

<sup>59</sup> Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353: 793-802.

<sup>60</sup> Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res* 2006;66:4553-7.

<sup>61</sup> Clezardin P. Potential anticancer properties of bisphosphonates: insights from preclinical studies. *Anticancer Agents Med Chem* 2012;12:102-13.

<sup>62</sup> Hadji P., Coleman R. E., Wilson C., et al. Adjuvant bisphosphonates in early breast cancer: consensus guidance for clinical practice from a European Panel. *Annals of Oncology* 2016; 27: 379–390

<sup>63</sup> Santini D, Stumbo L, Spoto C, D'Onofrio L, Pantano F, Iuliani M, Fioramonti M, Zoccoli A, Ribelli G, Virzi V, Vincenzi B, Tonini G. Bisphosphonates as anticancer agents in early breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Breast Cancer Res.* 2015 Sep 2;17(1):121

<sup>64</sup> Wittteman JCM, Grobbee DE, Kok FJ, Hofman A and Valkenburg HA: Increased risk of atherosclerosis in women after the menopause. *Br Med J* 298: 642-644, 1989.

<sup>65</sup> NJ Bundred. The effects of aromatase inhibitors on lipids and thrombosis. *British Journal of Cancer* (2005) 93(Suppl 1), S23–S27

<sup>66</sup> ATAC Trialists' Group. Results of the ATAC (arimidex, tamoxifen, alone or in combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet.* 2005;365:60–62. [PubMed].

<sup>67</sup> Coates AS, Keshaviah A, Thurlimann B, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Colleoni M, et al. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1–98. *Journal of Clinical Oncology.* 2007;25:486–492.

<sup>68</sup> Atalay G, Dirix L, Biganzoli L, Beex L, Nooij M, Cameron D, Lohrisch C, Cufer T, Lobelle JP, Mattiacci MR, Piccart M, Paridaens R (2004) The effect of exemestane on serum lipid profile in postmenopausal women with metastatic breast cancer: a companion study to EORTC Trial 10951, 'Randomized phase II study in first line hormonal treatment for metastatic breast cancer with exemestane or tamoxifen in postmenopausal patients'. *Ann Oncol* 15: 211–217

<sup>69</sup> Boccardo F, Rubagotti A, Amoroso D, Mesiti M, Massobrio M, Benedetto C, Porpiglia M, Rinaldini M, Paladini G, Distante V, Franchi R, Failla G, Bordonaro R, Sismondi P, on Behalf of the Italian Tamoxifen Arimidex (ITA) Trial (2003) Anastrozole appears to be superior to tamoxifen in women already receiving adjuvant tamoxifen in women already receiving adjuvant tamoxifen treatment. 26th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; 3–6 December 2003: San Antonio, Texas. Abstract 3

<sup>70</sup> Dewar J, Nabholz JM, Bonnetterre J, Buzdar A, Robertson JFR, Thurlimann B, Clark G (2000) The effect of anastrozole (Arimidex) on plasma lipids – data from a randomised comparison of



---

anastrozole vs tamoxifen in postmenopausal women with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 64: 51 (Abstract 164)

<sup>71</sup> Elisaf MS, Bairaktari ET, Nicolaides C, Kakaidi B, Tzallas CS, Katsaraki A, Pavlidis NA (2001) Effect of letrozole on the lipid profile in postmenopausal women with breast cancer. *Eur J Cancer* 37: 1510–1513

<sup>72</sup> Goss PE, Grynopas MD, Josse R (2001) The effects of the steroidal aromatase inactivator exemestane on bone and lipid metabolism in the ovariectomized rat. *Breast Cancer Res Treat* 69: 224 (Abstract 132)

<sup>73</sup> Kataja V, Hietanen P, Joensuu H, Ala-Luhtala T, Asola R, Kokko R, Holli K (2002) The effects of adjuvant anastrozole, exemestane, tamoxifen, and toremifene on serum lipids in postmenopausal women with breast cancer – a randomised study. 25th San Antonio Breast Cancer Symposium; 11–14 December 2002; San Antonio, Texas. Abstract 634

<sup>74</sup> ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) Trialists' Group (2002) Anastrozole alone or in combination with tamoxifen vs tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 359: 2131–2139

<sup>75</sup> Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, Jones SE, Alvarez I, Bertelli G, Ortmann O, Coates AS, Bajetta E, Dodwell D, Coleman RE, Fallowfield LJ, Mickiewicz E, Andersen J, Lonning PE, Cocconi G, Stewart A, Stuart N, Snowdon CF, Carpentieri M, Massimini G, Bliss JM, Intergroup Exemestane Study (2004) A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med* 350: 1081–1092

<sup>76</sup> Dombernowsky P, Smith I, Falkson G, Leonard R, Panasci L, Bellmunt J, Bezwoda W, Gardin G, Gudgeon A, Morgan M, Fornasiero A, Hoffmann W, Michel J, Hatschek T, Tjabbes T, Chaudri HA, Hornberger U, Trunet PF (1998) Letrozole, a new oral aromatase inhibitor for advanced breast cancer: double-blind randomized trial showing a dose effect and improved efficacy and tolerability compared with megestrol acetate. *J Clin Oncol* 16: 453–461

<sup>77</sup> Mouridsen H, Keshaviah A, Coates AS, Rabaglio M, Castiglione-Gertsch M, Sun Z, et al. Cardiovascular adverse events during adjuvant endocrine therapy for early breast cancer using letrozole or tamoxifen: safety analysis of BIG 1-98 trial. *J Clin Oncol.* 2007;25:5715–22

<sup>78</sup> Younus M, Kissner M, Reich L, Wallis N. Putting the cardiovascular safety of aromatase inhibitors in patients with early breast cancer into perspective: a systematic review of the literature. *Drug Saf.* 2011 Dec 1;34(12):1125-49.

<sup>79</sup> Aydiner A. Meta-analysis of breast cancer outcome and toxicity in adjuvant trials of aromatase inhibitors in postmenopausal women. *Breast.* 2013 Apr;22(2):121-9

<sup>80</sup> Zhao X, Liu L, Li K, Li W, Zhao L, Zou H. Comparative study on individual aromatase inhibitors on cardiovascular safety profile: a network meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2015 Sep 29;8:2721-30.

<sup>81</sup> Gallicchio L, Calhoun C, Helzlsouer K. Effect of Aromatase Inhibitor Therapy on the Cardiovascular Health of Black and White Breast Cancer Patients. *Clin Breast Cancer.* 2016 Jun;16(3):e23-31.

---

<sup>82</sup> Sinnott B, Syed I, Sevruckov A, Barengolts E. Coronary calcification and osteoporosis in men and postmenopausal women are independent processes associated with aging. *Calcified tissue international* 2006;78(4):195–202.

<sup>83</sup> Ouchi Y, Akishita M, deSouza AC, Nakamura T, Orimo H 1993 Age-related loss of bone mass and aortic/aortic valve calcification—reevaluation of recommended dietary allowance of calcium in the elderly. *Ann NY Acad Sci* 676:297–307

<sup>84</sup> Tanko LB, Christiansen C, Cox DA, Geiger MJ, McNabb MA, Cummings SR. Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2005;20(11):1912–20

<sup>85</sup> Marcovitz PA, Tran HH, Franklin BA, O'Neill WW, Yerkey M, Boura J, et al. Usefulness of bone mineral density to predict significant coronary artery disease. *The American journal of cardiology* 2005;96(8):1059–63.

<sup>86</sup> Reddy J, Bilezikian JP, Smith SJ, Mosca L. Reduced bone mineral density is associated with breast arterial calcification. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(1):208–11.

<sup>87</sup> Yesil Y, Ulger Z, Halil M, Halacli B, Yavuz BB, Yesil NK, et al. Coexistence of osteoporosis (OP) and coronary artery disease (CAD) in the elderly: it is not just a by chance event. *Archives of gerontology and geriatrics* 2012;54(3):473–6.

<sup>88</sup> Prasad M, Reriani M, Khosla S, Gossl M, Lennon R, Gulati R, et al. Coronary microvascular endothelial dysfunction is an independent predictor of development of osteoporosis in postmenopausal women. *Vascular health and risk management* 2014;10:533–8.

<sup>89</sup> Varri M, Tuomainen TP, Honkanen R, Rikkonen T, Niskanen L, Kroger H, et al. Carotid intima-media thickness and calcification in relation to bone mineral density in postmenopausal women—the OSTPRE-BBA study. *Maturitas* 2014;78(4):304–9

<sup>90</sup> Seo SK, Yun BH, Noe EB, Suh JW, Choi YS, Lee BS. Decreased bone mineral density is associated with coronary atherosclerosis in healthy postmenopausal women. *Obstetrics & gynecology science* 2015;58(2):144–9.

<sup>91</sup> Mikumo M, Okano H, Yoshikata R, Ishitani K, Ohta H. Association between lumbar bone mineral density and vascular stiffness as assessed by pulse wave velocity in postmenopausal women. *Journal of bone and mineral metabolism* 2009;27(1):89–94.

<sup>92</sup> Seo SK, Cho S, Kim HY, Choi YS, Park KH, Cho DJ, et al. Bone mineral density, arterial stiffness, and coronary atherosclerosis in healthy postmenopausal women. *Menopause (New York, NY)* 2009;16(5):937–43.

<sup>93</sup> Pennisi P, Russo E, Gaudio A, Veca R, D'Amico F, Mangiafico RA, et al. The association between carotid or femoral atherosclerosis and low bone mass in postmenopausal women referred for osteoporosis screening. Does osteoprotegerin play a role? *Maturitas* 2010;67(4):358–62.

<sup>94</sup> Mahmoud Shokry AAH GI, et al. Relation between postmenopausal osteoporosis and coronary and peripheral arterial disease. *Middle East Fertility Society Journal* 2012;17::181–6.

---

<sup>95</sup> Chenyi Ye, Mingyuan Xu, Shengdong Wang, Shuai Jiang, Xi Chen, Xiaoyu Zhou, and Rongxin He. Decreased Bone Mineral Density Is an Independent Predictor for the Development of Atherosclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0154740.

<sup>96</sup> Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu WL, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998; 12: 1260–1268.

<sup>97</sup> Van Campenhout A, Golledge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009. p. 321–9.

<sup>98</sup> Osako KM, Hironori N, Koibuchi N, et al. Estrogen inhibit vascular calcification via vascular RANKL system. Common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circ Res* 2010;107: 466-475.

<sup>99</sup> Campos-Obando N, Kavaousi M, Roeters van Lennep JE, et al. Bone health and coronary artery calcification: the rotterdam study. *Atherosclerosis* 2015;241(1):278-83

<sup>100</sup> Schulz E1, Arfai K, Liu X, Sayre J, Gilsanz V. Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Sep;89(9):4246-53.

<sup>101</sup> Bagger YZ, Tanko LB, Alexandersen P, Qin G, Christiansen C. Radiographic measure of aorta calcification is a site-specific predictor of bone loss and fracture risk at the hip. *Journal of internal medicine* 2006;259(6):598–605.

<sup>102</sup> El Maghraoui A, Rezqi A, Mounach A, et al. vertebra fractures and andominal aortic calcification in postmenopausal women. A cohort study *Bone* 2013;56:213-216.

<sup>103</sup> Zhou R, Zhou H, Cui M, et a. The associatio betweenaortic calcification and fracture risk in postmenopausl women in china: the prospective chongqing osteoporosis study. *Plos One* 2014;9(5):e93882

<sup>104</sup> Jie KG, Bots ML, Vermeer C, Witteman JC, Grobbee DE 1996 Vitamin K status and bone mass in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study. *Calcif Tissue Int* 59:352–356

<sup>105</sup> Hak AE, Pols HAP, van Hemert AM, Hofman A, Witteman JCM 2000 Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1926–1931

<sup>106</sup> Fodor D, Bondor C, Albu A, Muntean L, Simon SP, Poanta L, et al. Relation between intima-media thickness and bone mineral density in postmenopausal women: a cross-sectional study. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina* 2011;129(3):139–45

<sup>107</sup> Périard D, Folly A, Meyer M-AR, Gautier E, Krieg M-A, Hayoz D. Aortic calcification and the risk of osteoporotic fractures. *Rev Med Suisse*. 2010;6:2200–3.

<sup>108</sup> Barengolts EI, Berman M, Kukreja SC, Kouznetsova T, Lin C, Chomka EV 1998 Osteoporosis and coronary atherosclerosis in asymptomatic postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 62:209–213 -

<sup>109</sup> Kiel DP, Kauppila LI, Cupples LA, Hannan MT, O'Donnell CJ, Wilson PWF 2001 Bone loss and the progression of abdominal aortic calcification over a 25 year period: the Framingham Heart Study. *Calcif Tissue Int* 68:271

- 
- <sup>110</sup> Sinnott B, Syed I, Sevrakov A, Barengolts E. Coronary calcification and osteoporosis in men and postmenopausal women are independent processes associated with aging. *Calcified tissue international* 2006;78(4):195–202.
- <sup>111</sup> Lampropoulus CE, Kalamara P, Konsta M, et al. Osteoporosis and vascular calcification in postmenopausal women : a cross sectional study. *Climateric* 2016; 19(3): 303-7.
- <sup>112</sup> Hanna TN, Zygmunt ME, Harmouche E, et l. Association of llumbar fractures, abdominal aortic calcification, and osteopenia. *Clin Imaging* 2015 ; 39(4) :662-6
- <sup>113</sup> Schulz E, Arfai K, Liu X, Sayre J, Gilsanz V. Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2004 Sep [cited 2014 Jul 17];89(9):4246–53.
- <sup>114</sup> St-Onge M-P, Wang J, Shen W, Wang Z, Allison DB, Heshka S, et al. Dual-energy x-ray absorptiometry-measured lean soft tissue mass: differing relation to body cell mass across the adult life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59:796–800.
- <sup>115</sup> Ter-Pogossian MM. Image Reconstruction from Projections, *The Fundamentals of Computerized Tomography* by G. T. Herman. Medical Physics. 1984. p. 90.
- <sup>116</sup> Shannoun F, Blettner M, Schmidberger H, Zeeb H. Radiation protection in diagnostic radiology. *Dtsch Arztebl Int* [Internet]. 2008;105:41–6.
- <sup>117</sup> Schousboe JT, Wilson KE, Hangartner TN. Detection of aortic calcification during vertebral fracture assessment (VFA) compared to digital radiography. *PLoS One*. 2007;2.
- <sup>118</sup> Kauppila LI, Polak JF, Cupples LA, Hannan MT, Kiel DP, Wilson PWF. New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: A 25-year follow-up study. *Atherosclerosis*. 1997;132:245–50.
- <sup>119</sup> Oei HHS, Vliegenthart R, Hak AE, Iglesias Del Sol A, Hofman A, Oudkerk M, et al. The association between coronary calcification assessed by electron beam computed tomography and measures of extracoronary atherosclerosis: The Rotterdam Coronary Calcification Study. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:1745–51.