

	Catena laterale R ₁	Catena laterale R ₂	Potenza
Etidronato*	OH	CH ₃	1 ×
Clodronato*	Cl	Cl	10 ×
Tiludronato**	H	CH ₂ -S-fenil-Cl	10 ×
Pamidronato**	OH	(CH ₂) ₂ NH ₂	100 ×
Neridronato**	OH	(CH ₂) ₅ NH ₂	100 ×
Alendronato**	OH	(CH ₂) ₃ NH ₂	> 100 × < 1.000 ×
Risedronato***	OH	CH ₂ -3-piridina	> 1.000 × < 10.000 ×
Ibandronato***	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃)	> 1.000 × < 10.000 ×
Zoledronato***	OH	CH ₂ -imidazolo	> 10.000 ×

* prima generazione
 ** seconda generazione
 *** terza generazione
 — Amino-bisfosfonati

Figura 2. BF: struttura chimica e potenza relativa nell'inibire *in vitro* il riassorbimento osseo. L'attività antiassorbitiva dei singoli BF varia da composto a composto e dipende dalla catena laterale. L'introduzione di un gruppo ossidrilico all'atomo di carbonio in posizione 1 aumenta l'effetto d'inibizione del riassorbimento. Una classe a parte è rappresentata dagli amino-BF (presenza di gruppo aminico terminale nella catena laterale legata al carbonio). Anche per gli amino-derivati è importante la lunghezza della catena laterale (alendronato è 10 volte più potente di pamidronato e di neridronato). L'efficacia dei BF è ulteriormente aumentata se all'atomo di azoto vengono aggiunti gruppi metilici o pentilici. Anche quando l'atomo di azoto è presente all'interno di un anello benzenico (risedronato) o di un gruppo imidazolico (zoledronato) è possibile ottenere un ulteriore aumento della potenza antiassorbitiva

indifferenziati), in parte da un accorciamento del ciclo vitale cellulare delle cellule osteoclastiche già differenziate [2].

Il potere anti-riassorbitivo ottenuto *in vitro* (da 1 a 10.000 volte) varia a seconda dei diversi BF ed è in parte riferibile alla differente struttura della catena laterale [1] (Figura 2). La presenza di uno o più gruppi aminici nella catena laterale conferisce una potenza crescente e maggiore rispetto ai non-amino-bisfosfonati di prima e seconda generazione [1, 2]. In Italia sono attualmente disponibili in commercio etidronato, clodronato, neridronato, alendronato, risedronato e ibandronato, mentre pamidronato e zoledronato sono disponibili per uso ospedaliero nel trattamento delle metastasi scheletriche.

■ Bisfosfonati: due differenti meccanismi d'azione

Anche se l'utilizzo di questi farmaci in terapia è iniziato dagli anni Settanta, il loro meccanismo d'azione a livello molecolare è stato chiarito solo negli ultimi anni e, in particolare, è emerso un differente effetto tra i BF sulla base della loro struttura chimica. Oggi i BF vengono classificati in 2 grandi gruppi con differente meccanismo di azione [3]:

- le molecole contenenti un gruppo aminico, gli amino-BF
- e quelle che sono state sintetizzate per prime, come etidronato, clodronato e tiludronato, prive di un gruppo aminico, i non-amino-BF.

Etidronato e clodronato, molto simili al pirofosfato, sono metabolizzati all'interno degli osteoclasti e della linea cellulare da cui derivano (monociti-macrofagi) in un

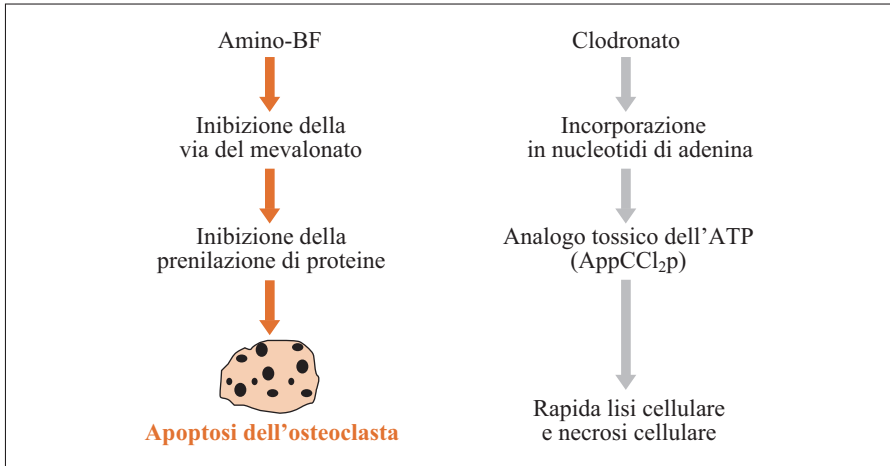


Figura 3. Differente meccanismo di azione degli amino-BF e dei non-amino-BF (clodronato) sugli osteoclasti.

In questi ultimi anni studi *in vivo* e *in vitro* hanno evidenziato che, al contrario di quanto si riteneva in passato, BF di diversa generazione inibiscono il riassorbimento osteoclastico attraverso meccanismi di azione differenti. In particolare gli amino-BF inibiscono l'attività degli osteoclasti mediante un effetto stimolatorio specifico sull'apoptosi cellulare (morte cellulare programmata). Diversamente, clodronato, una volta entrato nella cellula mediante pinocitosi, verrebbe metabolizzato e incorporato in nucleotidi di adenina per formare un analogo tossico dell'ATP capace di indurre la rapida lisi cellulare e la conseguente necrosi osteoclastica

analogo non idrolizzabile dell'ATP: l'adenosina 5^l-(β,γ -diclorometilene) trifosfato (AppCCl₂p) nel caso del clodronato (Figura 3) [3]. L'incorporazione di questi BF in analoghi dell'ATP comporta diverse conseguenze nel metabolismo della cellula osteoclastica (riduzione dei depositi dell'ATP, inibizione della sintesi proteica ecc.) che si traducono in un effetto citotossico con morte cellulare.

Al contrario, gli amino-BF non sono metabolizzati all'interno della cellula, non determinano un'azione citotossica, ma, in modo selettivo, inibiscono un enzima (farnesil-pirofosfato sintetasi) che catalizza la biosintesi degli steroli (colesterolo) a partire dal mevalonato e in particolare la formazione di intermedi come il farnesil-pirofosfato (FPP) e il geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP) (Figura 4). L'inibizione della sintesi di questi gruppi isoprenilici comporta la mancata prenilazione di diverse classi di proteine fra cui le GTP-binding protein come Ras, Rho, Rac che svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento del ciclo vitale cellulare (morfologia cellulare, proliferazione cellulare, trasduzione di segnali ecc.) [3]. Le modificazioni biochimico-funzionali e morfologiche che ne conseguono comportano per gli osteoclasti l'impossibilità di formare vescicole e di organizzare i *ruffled border* e, come effetto finale, una più rapida morte cellulare programmata (apoptosi cellulare). Queste importanti differenze sul meccanismo d'azione emerse fra i bisfosfonati di prima generazione come etidronato e clodronato e gli amino-BF di seconda e terza generazione come alendronato, neridronato, risedronato ecc., possono comportare, in ultima analisi, una differente efficacia anti-riassorbitiva fra le due diverse classi di farmaci, efficacia superiore negli amino-BF rispetto a quelli privi del gruppo aminico.

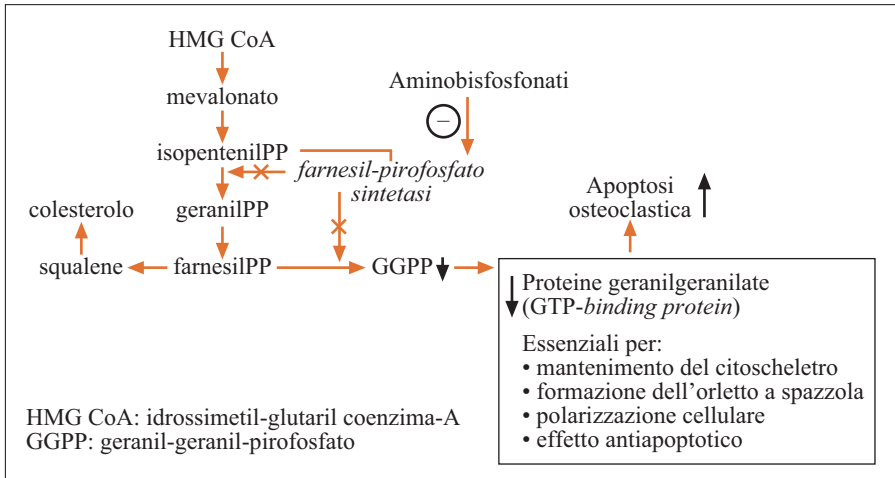


Figura 4. Amino-BF: stimolazione dell'apoptosi osteoclastica mediante inibizione enzimatica della via del mevalonato.

La via del mevalonato (sintesi del colesterolo) rappresenta un ciclo essenziale per garantire e prolungare la vita e la funzione della cellula osteoclastica. Durante questo ciclo la sintesi di prodotti intermedi come il geranyl-geranyl-pirofosfato (GGPP) è necessaria come substrato per la prenilazione di proteine geranyl-geranilate (GTP-binding protein) fondamentali per il mantenimento della vita e delle funzioni cellulari (formazione dell'orletto a spazzola, polarizzazione cellulare ecc.) [3]. L'inibizione specifica dell'enzima farnesil-pirofosfato sintetasi che catalizza la sintesi di GGPP e determina la prenilazione delle GTP-binding protein da parte degli amino-BF rappresenta il target specifico molecolare di questi farmaci, in grado di spiegare i loro effetti diretti sugli osteoclasti (stimolazione dell'apoptosi cellulare ecc.) con inibizione del riassorbimento osseo

■ Bisfosfonati: differenti interazioni con la matrice ossea

Recenti scoperte indicano che i BF mostrano una differente capacità di legarsi ai cristalli di idrossiapatite [4]. Simulando *in vitro* una situazione ambientale sovrapponibile a quella fisiologica è stata valutata la costante di affinità (misura della capacità adsorbitiva alla superficie minerale a una temperatura di 37 °C) di 6 diversi bisfosfonati. I risultati hanno dimostrato un'affinità per la fase minerale diversa per i vari BF (zoledronato > alendronato > ibandronato > risedronato > etidronato > clodronato) (Figura 5). Questa diversa capacità di *binding* all'idrossiapatite probabilmente contribuisce a spiegare differenze fra i diversi BF in termini di *uptake* e persistenza nell'osso, di reversibilità e persistenza degli effetti, e potrebbe parzialmente giustificare la differente potenza anti-riassorbitiva. Dal momento che i BF vengono incorporati nella matrice ossea l'emivita è molto lunga, anche fino ad alcuni anni. La proposta di una tendenza variabile dei differenti composti ad accumularsi nel tessuto osseo sarebbe spiegata dalle caratteristiche fisico-chimiche delle singole molecole: risedronato avrebbe un'emivita ossea più breve rispetto ad alendronato o a zoledronato, che possiedono maggiore affinità per i cristalli di idrossiapatite. Queste proprietà possono avere pertanto potenziali implicazioni cliniche nella comprensione delle diversità fra i BF in termini di una differente persistenza dell'effetto anti-riassorbitivo (maggiore nel caso di alendronato e di zoledronato) dopo la sospensione della terapia e un conseguente mantenimento di un turnover soppresso per un periodo più lungo nel caso di alcuni composti rispetto ad altri.

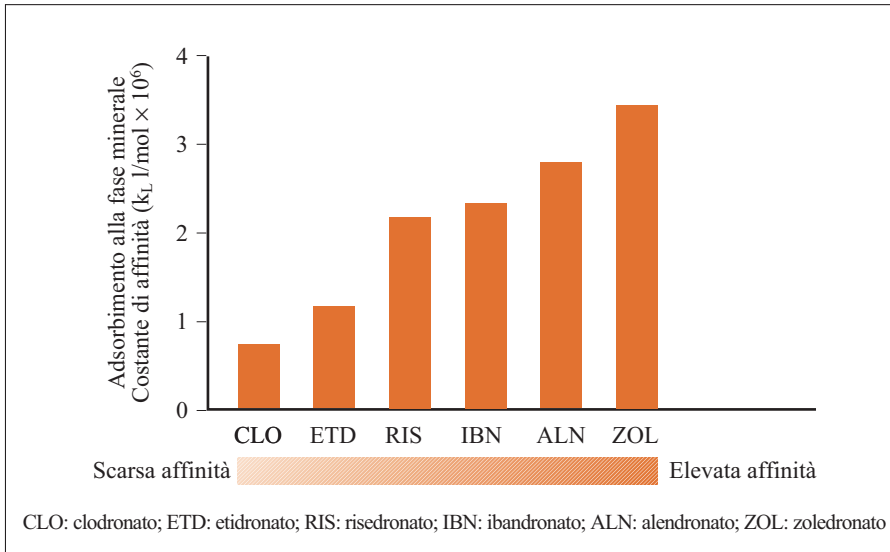


Figura 5. BF: diversa affinità di *binding* per i cristalli di idrossiapatite.

Recentemente è stato dimostrato che i BF presentano una differente capacità di legarsi ai cristalli di idrossiapatite. L'affinità per la fase minerale è risultata diversa per i vari BF (zoledronato > alendronato > ibandronato > risedronato > etidronato > clodronato) [4]; questi risultati potrebbero spiegare almeno in parte la lunga persistenza dell'effetto di alcune di queste molecole dopo una singola somministrazione (zoledronato) o dopo la sospensione di un trattamento di lunga durata (alendronato). Clodronato invece mostra una bassa affinità e questo giustificerebbe la ridotta efficacia se somministrato a intervalli di tempo troppo lunghi

Rassegna bibliografica

■ Zoledronato: inibizione dell'osteoclastogenesi tramite l'aumento della produzione osteoblastica di osteoprotegerina e riduzione dell'espressione di RANK-L nelle cellule a fenotipo osteoblastico

Il lavoro di Pan e coll. [5] pubblicato recentemente sul *Journal of Bone and Mineral Research* aggiunge nuove informazioni sul meccanismo d'azione degli amino-BF e, in particolare, dell'acido zoledronico. Come sopra menzionato, l'inibizione del riassorbimento osseo dei BF dipende da un effetto diretto proapoptotico sulla cellula osteoclastica, mentre i meccanismi con cui questi composti esercitano un effetto inibitorio sull'osteoclastogenesi non erano completamente chiariti. È ormai ampiamente dimostrato che il RANK-L (*Receptor Activator Nuclear factor Kb-Ligand*) rappresenta il mediatore finale dell'attività osteoclastogenica e osteoriassorbitiva del network citochinico (IL-1, TNF, IL-6) e ormonale (PTH) [6, 7]. Questo polipeptide, espresso sulla membrana cellulare degli osteoblasti e prodotto dalle stesse cellule in forma solubile, si lega con elevata affinità al suo recettore specifico (RANK) presente nei precursori emopoietici osteoclastici del midollo osseo e sulla membrana osteoclastica. Parallelamente, l'osteoprotegerina (OPG), un polipeptide di 380 aminoacidi prodotto in numerosi tipi cellulari fra cui le cellule del sistema immunitario e le cellule stromali-osteoblastiche, è stata identificata come l'inibitore biologico solubile del RANK-L, capace di contrastarne gli

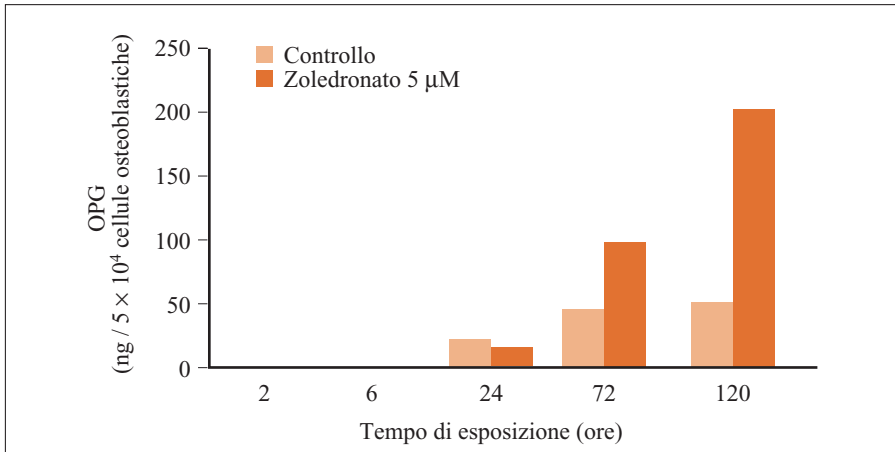


Figura 6. Zoledronato aumenta *in vitro* la produzione di osteoprotegerina (OPG) in colture primarie di osteoblasti umani.

L'OPG, un polipeptide di 380 aminoacidi prodotto da una varietà di fenotipi cellulari, fra cui le cellule del sistema immunitario e le cellule osteoblastiche, è stata identificata come l'inibitore biologico solubile del RANK-L, capace di contrastarne gli effetti pro-osteoclastogenesi e anti-apoptotici sull'osteoclasta maturo. Nello studio di Pan e coll. [5] è stato dimostrato un aumento della produzione di OPG da parte degli osteoblasti trattati per 72-120 ore con acido zoledronico alla dose di 5 μM

effetti osteoclastogenici, pro-riassorbimento e antiapoptotici sull'osteoclasta maturo. OPG agirebbe come un recettore *decoy* in competizione con il recettore specifico RANK per prevenire il legame RANKL-RANK [6, 7].

Gli Autori hanno esaminato gli effetti dell'acido zoledronico sulla produzione di OPG e l'espressione di RANK-L in colture primarie di cellule osteoblastiche umane utilizzando la citofluorimetria, il dosaggio ELISA per la misurazione di OPG nei sovrantanti e tecniche di biologia molecolare (RT-PCR e Western-blot) per l'espressione e la misurazione del RANK-L e di una metalloproteasi nelle cellule osteoblastiche. I risultati dimostrano un aumento della produzione di OPG da parte degli osteoblasti trattati per 72-120 ore con acido zoledronico alla dose di 5 μM (Figura 6), mentre con la stessa concentrazione il BF riduce l'espressione intracellulare e transmembrana di RANK-L nelle stesse cellule, come evidenziato dai risultati ottenuti mediante immunofluorescenza indiretta e citofluorimetria. Quest'ultimo effetto avverrebbe a livello post-traduzionale attraverso la produzione e l'espressione nella cellula osteoblastica di una metalloproteasi-disintegrina TACE (*TNFα converting enzyme*) capace di degradare e inattivare la molecola RANK-L.

Commento

È ormai dimostrato da tempo come il RANK-L giochi un ruolo cruciale nella fisiopatologia di malattie associate a elevato riassorbimento osseo (osteoporosi post-menopausale, osteoporosi da glucocorticoidi, malattia ossea di Paget, artrite reumatoide, sindromi ipercalcemiche paraneoplastiche, metastasi ossee) [6, 8-10]. Ed è altrettanto noto come gli amino-BF rappresentino la terapia di scelta in queste patologie [11, 12].

I risultati ottenuti in questo lavoro permettono di aggiungere ulteriori informazioni sui meccanismi mediante i quali gli amino-BF possono esercitare la loro efficacia anti-riassorbitiva. Accanto al noto effetto diretto sull'apoptosi osteoclastica sarebbe presente anche un'azione indiretta sul reclutamento e la differenziazione delle cellule a fenotipo osteoclastico mediante un effetto sugli osteoblasti, inibendo l'espressione del RANK-L e aumentando il suo inibitore biologico OPG. Già in passato alcune ipotesi supportate da esperimenti *in vitro* prendevano in considerazione gli osteoblasti e i loro prodotti solubili (fattori stimolanti l'osteoclastogenesi) come principale bersaglio dei bisfosfonati [13, 14]. Queste nuove scoperte evidenziano con maggiore chiarezza un meccanismo di azione alternativo degli amino-BF attraverso la mediazione della cellula a fenotipo osteoblastico. A confermare questi risultati vi è la più recente dimostrazione che i BF inibiscono anche l'espressione del RANK-L indotta dal desametasone in cellule linfoblastiche e in cellule umane a fenotipo osteoblastico [15].

■ Bisfosfonati: effetti su bersagli cellulari diversi dalla cellula osteoclastica

Fino a qualche anno fa si pensava che i BF agissero selettivamente sugli osteoclasti e sui loro precursori (la linea monocito-macrofagica) nelle aree di elevato riassorbimento osseo. Più recentemente sono emerse anche azioni dirette su altri fenotipi cellulari, indipendentemente dai loro effetti antiosteoclastici, a dimostrazione che il microambiente osseo in fase di riassorbimento non è necessariamente richiesto per una captazione cellulare dei BF. Questa interessante review [16] analizza le più recenti acquisizioni, emerse dai più importanti lavori originali, riguardanti gli effetti dei BF su alcuni target cellulari diversi dalla cellula osteoclastica e le potenziali ripercussioni da un punto di vista terapeutico.

Effetti sugli osteoblasti e sugli osteociti

Numerosi lavori riportano positivi effetti dei BF sulle cellule osteoformatrici. In colture di midollo osseo murino alendronato ed etidronato stimolano la formazione di precursori osteoblastici e di noduli mineralizzati *in vitro* e *in vivo* [17]. Anche un altro amino-BF, il neridronato, aumenta nelle cellule mature osteoblastiche la proliferazione, la produzione di fosfatasi alcalina e la mineralizzazione [18]. Non è ancora chiaro il meccanismo che comporta un'attività pro-differenziativa dei precursori osteoblastici verso cellule mature ad attività osteosintetica: è stata ipotizzata, anche in questo caso, l'inibizione da parte dei BF della via del mevalonato anche se l'azione di stimolo sull'osteoblastogenesi verrebbe esercitata anche dai non-amino-BF. A confermare l'effetto benefico di questi farmaci sulle cellule a fenotipo osteoblastico, il lavoro di Plotkin e coll. [19] ha dimostrato che gli amino-BF sembrano esercitare un effetto anti-apoptotico e proliferativo specifico sugli osteoblasti e sugli osteociti. Tali effetti sono il risultato di un'attivazione (fosforilazione) di chinasi intracitoplasmatiche (ERK 1 e 2) capaci di inibire l'apoptosi cellulare prolungando la vita e le funzioni delle cellule a fenotipo osteoblastico. In particolare alendronato, somministrato *in vivo* nel topo, si mostra capace di bloccare l'effetto pro-apoptotico del prednisolone sugli osteoblasti e sugli osteociti mediante l'attivazione di queste chinasi. Tutti questi risultati potrebbero in parte spiegare gli incrementi di massa ossea mostrati da alendronato anche dopo 10 anni di terapia e l'efficacia degli amino-BF nell'osteoporosi.

si indotta da cortisone, dove la rarefazione ossea e l'aumentato rischio fratturativo sarebbero il risultato di una riduzione della neoformazione ossea e del numero degli osteociti.

Effetti sull'angiogenesi e sulle cellule tumorali

Studi sul modello animale di ratto indicano che i BF sono capaci di inibire l'angiogenesi in diversi modelli di neoplasia (cancro della prostata, della mammella, tumori epiteliali ecc.) [20]. Questo effetto avverrebbe attraverso l'inibizione selettiva di metalloproteinasi prodotte dai macrofagi attivati in sede tumorale e comporterebbe una mancata attivazione di un fattore a elevata attività angiogenetica, il *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [21]. L'attività antitumorale dei BF è anche dimostrata da vari studi preclinici *in vitro* e *in vivo* che indicano un'azione pro-apoptotica sulle cellule neoplastiche e un effetto inibitorio sui meccanismi che regolano l'adesione, l'invasione e la proliferazione delle cellule tumorali [22, 23]. Un recente studio italiano ha dimostrato che l'effetto pro-apoptotico e anti-proliferativo degli amino-BF (e non di clodronato) su una linea cellulare di carcinoma mammario sarebbe dovuto a un'inibizione specifica dell'attività telomerasica particolarmente aumentata nelle cellule neoplastiche [24]. Queste azioni, associate a una riduzione del turnover osseo e a un impoverimento dei fattori di crescita presenti nella matrice ossea, potrebbero contribuire a limitare la diffusione di metastasi ossee. Naturalmente questi studi preclinici rappresentano un importante viatico per l'ottimizzazione della terapia con BF in oncologia.

Effetti sulle cellule del sistema immunitario

Recenti evidenze indicano che gli amino-BF determinano l'espansione clonale e l'attivazione di linfociti T gamma/delta, le cellule che rappresentano la prima linea di difesa contro batteri, virus e tumori linfoidi [25, 26]. L'effetto sarebbe dovuto a un accumulo di isopentenil-pirofosfato (aumentato dopo l'inibizione della via del mevalonato da parte dei BF) in grado di attivare i recettori $\gamma\delta$ dei linfociti T: il risultato finale comporterebbe un'aumentata proliferazione e attivazione cellulare associata a produzione di citochine (IL-2). Inoltre, i BF sarebbero in grado di sensibilizzare cellule tumorali (come nel mieloma multiplo) o cellule osteoclastiche all'attività citotossica dei linfociti T.

Due importanti scoperte confermano queste ipotesi: 1) in pazienti con mieloma multiplo refrattario, in terapia con amino-BF la risposta antitumorale è associata a una significativa proliferazione dei linfociti T- $\gamma\delta$ e 2) osteoclasti umani esposti ad amino-BF vanno incontro a una lisi cellulare mediata dalle cellule T di un'entità 10 volte superiore rispetto a quella ottenuta con la presenza dei soli linfociti negli osteoclasti di controllo [16].

Commento

Questa review sintetizza le più recenti scoperte sul meccanismo d'azione e sugli effetti dei BF su cellule bersaglio alternative alla cellula osteoclastica. Quello che emerge da questi risultati è il pleiotropismo di questi farmaci che un tempo si pensava selettivamente attivi sulle cellule a fenotipo osteoclastico. Anche se particolarmente "avidì" di tessuto osseo, i BF (e in particolare gli amino-BF) dimostrano effetti extrascheletrici (per esempio, sulle cellule tumorali o sulle cellule del sistema immunitario) che in realtà rivelano meccanismi d'azione più complessi e che ricerche future devono confermare, anche in vista di un

loro potenziale utilizzo clinico soprattutto in campo immunologico o come terapia adiuvante in oncologia. Attualmente la ricerca sui BF nel campo oncologico sta avendo un enorme sviluppo.

Gli effetti stimolatori dei BF sulle cellule osteoblastiche, con l'evidenza di precisi meccanismi di azione a livello molecolare, aggiungono nuove informazioni che potrebbero chiarire, almeno in parte, alcuni risultati ottenuti dagli amino-BF nei trial clinici condotti in pazienti affetti da osteoporosi. Per esempio, da un recente trial si evidenziano continui aumenti di densità minerale ossea vertebrale in donne con osteoporosi trattate con alendronato per 10 anni, fenomeno che non può essere spiegato con la sola inibizione del riassorbimento osseo.

■ **Gli aumentati livelli di OPG nel siero di donne osteoporotiche ottenuti dopo una terapia di 1 anno con alendronato o risedronato correlano con gli incrementi di BMD femorale**

Lo scopo di questo trial prospettico controllato e randomizzato condotto dall'équipe di Dobnig [27] è stato quello di valutare i potenziali effetti di un anno di terapia con amino-BF sui livelli sierici di osteoprotegerina e RANK-L. Cinquantasei donne affette da osteoporosi post-menopausale sono state randomizzate per ricevere un trattamento orale con alendronato (10 mg/die) o con risedronato (5 mg/die) in combinazione con calcio e vitamina D (n=37) o per assumere soltanto una supplementazione con calcio e vitamina D (gruppo controllo; n=19). Sono stati misurati i livelli di OPG e RANK-L nel siero, all'inizio dello studio, dopo 2, 6 e 12 mesi di terapia, oltre alle concentrazioni sieriche del CTX prima del trattamento e dopo 12 mesi. La densità minerale ossea al collo e al trocantere femorale è stata misurata all'inizio e al termine dello studio. Dopo 1 anno di trattamento, nel gruppo in terapia con gli amino-BF era presente un significativo aumento percentuale della densità minerale ossea a livello sia del collo femorale (3,3%) che del trocantere (4,6%), mentre nel gruppo di controllo risultava una perdita ossea che comunque non era statisticamente significativa. Gli aumenti di massa ossea indotta dai BF erano accompagnati da una significativa riduzione del marker di riassorbimento CTX dopo 12 mesi (-43%). Per quanto riguarda l'OPG, i livelli sierici nel gruppo controllo diminuivano significativamente del 9% dopo 2 mesi per ritornare dopo 6 e 12 mesi a valori sovrapponibili a quelli presenti prima dello studio; al contrario nei soggetti in terapia con alendronato o risedronato i livelli di OPG nel siero aumentavano significativamente dopo 6 mesi e 12 mesi (Figura 7), mentre le concentrazioni del RANK-L non si modificavano per tutto il periodo del trattamento. Dall'analisi di regressione univariata emergeva una correlazione positiva statisticamente significativa fra gli incrementi dei livelli di OPG dopo 1 anno e quelli della BMD femorale (trocantere: $r=0,59$; $p<0,001$. Collo: $r=0,50$; $p<0,001$). Questi livelli di correlazione si rivelavano persino superiori a quelli negativi (e attesi) fra le variazioni del CTX e quelle della BMD (trocantere: $r=-0,35$, $p=0,03$. Collo: $r=-0,23$, $p\leq 0,16$). Nel gruppo di controllo non si evidenziavano correlazioni fra OPG e BMD. Sulla base di questi importanti risultati gli Autori suggeriscono un futuro potenziale ruolo del dosaggio dell'OPG nel predire la risposta individuale nei soggetti in terapia con BF.

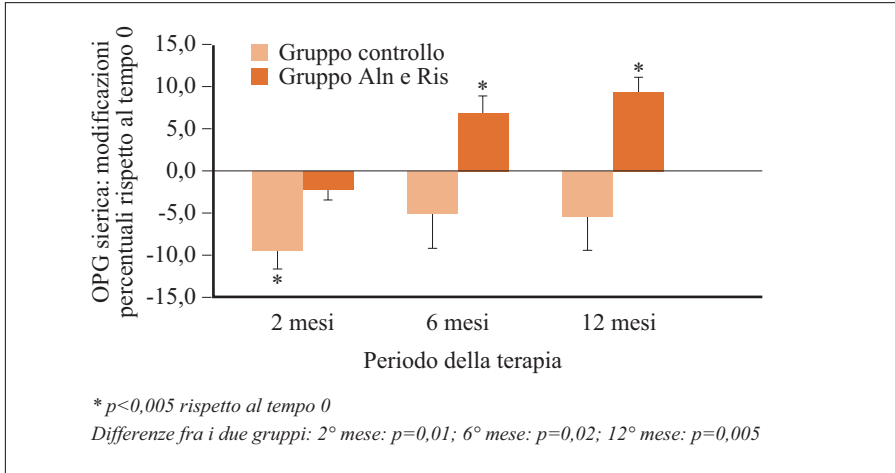


Figura 7. Alendronato e risedronato aumentano *in vivo* i livelli sierici di osteoprotegerina (OPG) in donne affette da osteoporosi.

Cinquantasei donne affette da osteoporosi post-menopausale sono state trattate con una terapia orale di alendronato (10 mg/die) o risedronato (5 mg/die) in combinazione con calcio e vitamina D (n=37) oppure con la sola supplementazione di calcio e vitamina D (gruppo controllo; n=19). I livelli di OPG sono stati misurati all'inizio dello studio e dopo 2, 6 e 12 mesi di trattamento. Al contrario del gruppo di controllo, i soggetti in terapia con alendronato o risedronato mostravano concentrazioni sieriche di OPG significativamente aumentate dopo 6 e 12 mesi rispetto ai valori misurati prima della terapia

Commento

I risultati ottenuti dalla ricerca di base con esperimenti *in vitro* spesso non trovano una conferma adeguata quando vengono cercati gli stessi effetti *in vivo* sull'uomo. Questo non sembrerebbe il caso riguardante l'azione degli amino-BF. L'aumentata produzione osteoblastica di OPG ottenuta *in vitro* da questi farmaci viene confermata *in vivo* dai risultati di questo studio in donne affette da osteoporosi post-menopausale, in terapia con alendronato o risedronato. Da un punto di vista concettuale è possibile considerare due potenziali meccanismi per spiegare l'aumentata produzione osteoblastica di OPG nel siero delle donne osteoporotiche in terapia con BF: 1) un meccanismo che chiama in causa un effetto diretto stimolatorio dei BF sulla produzione di OPG e 2) un meccanismo correlato a una modificazione dei processi di differenziazione osteoblastica durante la terapia con amino-BF.

In questo studio non si sono dimostrate modificazioni significative dei livelli sierici di RANK-L durante il trattamento con alendronato o risedronato in contrasto con i risultati ottenuti *in vitro*. A tutt'oggi non esistono studi *in vivo* che dimostrino un'inibizione dei livelli di RANK-L in terapia con BF. Poiché i risultati *in vitro* riguarderebbero una riduzione da parte di zoledronato dei livelli transmembrana di RANK-L (e non di quello solubile) [5], è possibile che le concentrazioni sieriche della citochina (risultato della sintesi di diversi tipi cellulari oltre agli osteoblasti) non riflettano esattamente quello che realmente avviene nel microambiente osseo durante le varie fasi di regolazione del turnover osseo da parte dei BF. In ogni caso il ruolo del RANK-L nelle modificazioni del metabolismo scheletrico indotte dai BF deve essere ulteriormente chiarito.

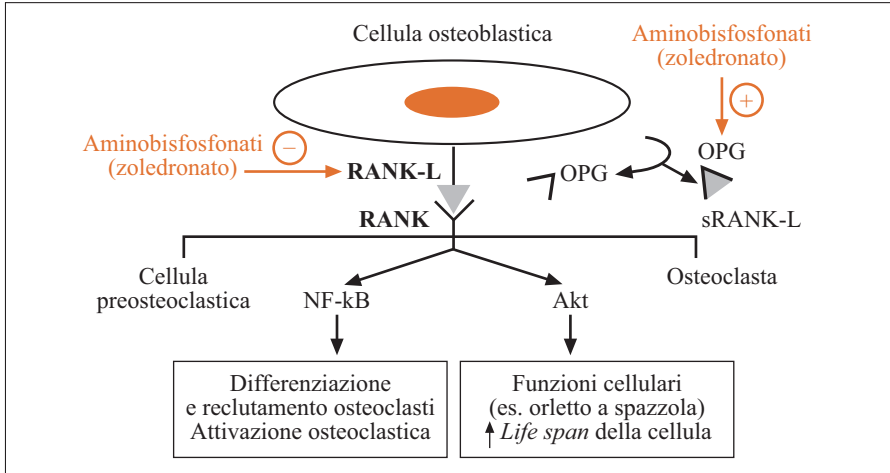


Figura 8. Nuovo ipotetico meccanismo di azione degli amino-BF: inibizione del riassorbimento osteoclastico mediante un effetto diretto sulla cellula osteoblastica.

Il legame RANK-L con il suo recettore specifico RANK è il risultato dell'interazione fra gli osteoblasti e le cellule a fenotipo osteoclastico (osteoclasti e preosteoclasti) e comporta l'attivazione di trasduttori del segnale intracellulare (NF- κ B e Akt) che a loro volta determinano la differenziazione delle cellule osteoclastiche, l'attivazione degli osteoclasti maturi a riassorbire osso e la sopravvivenza prolungata di queste cellule [7]. OPG agirebbe come un recettore *decoy* (cioè finto) in grado di competere con il vero recettore RANK impedendo il legame RANKL-RANK capace di trasdurre il segnale e l'attività biologica di RANK-L [7, 8]. Dai recenti studi *in vitro* con gli amino-BF si evidenzia la loro capacità di inibire il legame RANKL-RANK e pertanto di prevenire l'attivazione a cascata delle suddette vie endocellulari che comportano, in ultima analisi, un aumentato riassorbimento osseo. L'effetto sugli osteoblasti potrebbe essere un meccanismo aggiuntivo mediante il quale gli amino-BF favoriscono l'apoptosi degli osteoclasti anche in maniera indiretta

In conclusione, dai diversi lavori presentati emergono nuove interessanti informazioni sul meccanismo di azione dei bisfosfonati: durante la fase precoce del trattamento con questi farmaci l'effetto primario avverrebbe mediante un'azione diretta sulla cellula osteoclastica (apoptosi ecc.), mentre in una fase più tardiva la soppressione dell'attività osteoclastica e dell'osteoclastogenesi sarebbe influenzata da effetti indiretti dei BF (produzione di OPG, inibizione di RANK-L) attraverso la mediazione della cellula osteoblastica (Figura 8).

Bibliografia

1. Adami S (1994) Farmacologia dei bisfosfonati. In Bisfosfonati: una classe di farmaci in evoluzione. Elsevier Edizioni Mediche Roma 19-39
2. Fleisch H (1998) Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 19(1):80-100
3. Rogers MJ et al (1999) Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 24(5 Suppl):73S-79S
4. Nancollas GH et al (2006) Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 38(5):617-627
5. Pan B et al (2004) The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res* 9(1):147-154
6. Hofbauer LC et al (2000) The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15(1):2-12. Review
7. Boyle W J et al (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342. Review
8. Reddy SV (2004) Etiology of Paget's disease and osteoclast abnormalities. *J Cell Biochem* 93(4):688-696
9. Wada T et al (2006) RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 12(1):17-25

10. Walsh MC (2004) Bone loss in inflammatory arthritis: mechanisms and treatment strategies. *Current Opin Rheumatol* 16(4):419-427
11. Gatti D, Adami S (1999) New bisphosphonates in the treatment of bone diseases. 15(4):285-296
12. Licata AA (2005) Discovery, clinical development, and therapeutic uses of bisphosphonates. *Ann Pharmacother* 39(4):668-677
13. Sahni M et al (1993) Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 91: 2004-2011
14. Giuliani N (1998) Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol* 27(1):38-41
15. Kobayashi A et al (2005) The inhibitory effect of bisphosphonates on glucocorticoid-induced RANKL expression in human cells. *Scand J Rheumatol* 34(6):480-484
16. Bukowsky JF et al (2005) Alternative Bisphosphonate targets and mechanisms of action. *Biochem Biophys Res Commun* 18;328(3):746-750. Review
17. Giuliani N et al (1998) Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone* 22(5):455-461
18. Frediani B et al (2004) Long-term effects of neridronate on human osteoblastic cell cultures. *Bone* 35(4):859-869
19. Plotkin LI et al (2005) Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Biol Chem* 280(8):7317-7325
20. Fournier P et al (2002) Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 62(22):6538-6544
21. Santini D et al (2002) Pamidronate induces modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 8(5):1080-1084
22. Coxon FP et al (1998) Protein synthesis is required for caspase activation and induction of apoptosis by bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol* 54(4):631-638
23. Caraglia M et al (2004) The farnesyl transferase inhibitor R115777 (Zarnestra) synergistically enhances growth inhibition and apoptosis induced on epidermoid cancer cells by Zoledronic acid (Zometa) and Pamidronate. *Oncogene* 23(41):6900-6913
24. Dalle Carbonare L et al (2005) Bisphosphonates decrease telomerase activity and hTERT expression in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 240(1-2):23-31
25. Kunzmann V et al (1999) Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med* 340(9):737-738
26. Kunzmann V et al (2000) Stimulation of gamma/delta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 96(2):384-392
27. Dobnig H et al (2006) Changes in the RANK ligand/osteoprotegerin system are correlated to changes in bone mineral density in bisphosphonate-treated osteoporotic patients. *Osteoporos Int* 17(5):693-703