Indice

Parte 1 4

1. Introduzione 4
2. Fisiologia del sistema Osso-Cervello "Bone/ Brain Cross-Talk" 5
3. Sistema Ipotalamico e rimodellamento osseo 5
   - 3.1. Leptina 6
   - 3.2. 5-OH Triptamina (5-HT) 7
   - 3.3. Neuromedina-U e ritmo circadiano 8
   - 3.4. Neuropeptide Y (NPY) ed i suoi recettori 9
   - 3.5. Sistema dei recettori dei Cannabinoidi 10
   - 3.6. CART (Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript) e Recettore 4 della Melanocortina 11
4. Acido Glutammico 12
5. Neuropeptidi 13
   - 5.1. CGRP (Calcitonin Gene-Related Protein) 13
   - 5.2. VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) 14
   - 5.3. Sostanza P 14
6. Semaforine 15
7. Fattore Neurotrofico cerebrale (BDNF) 17
8. Sistema β-Adrenergico 18
9. Ossido Nitrico 19
10. Ormoni Ipofisari 19

Parte 2 21

1. Correlazione con alcune patologie umane 21
2. Neuro-osteoartropatia di Charcot 21
3. Sindrome Complessa da Dolore Regionale (Algodistrofia) 22

4. Osteoporosi 23

5. Depressione 25

6. Malattia di Parkinson 26

7. Demenza di Alzheimer 28

Parte 3 29

1. Lo studio C.O.D.E.: i perchè dello studio 29

2. C.O.D.E. STUDY (Connections between outcome of osteoporotic fractures, Depression, Delirium & Dementia in the Elderly): presentazione. 31

2.1. Obiettivi dello studio 31

2.2. Arruolamento 32

2.3. Materiali e Metodi 32

2.3.1. Criteri di inclusione 32

2.3.2. Criteri di esclusione 32

2.3.3. Procedura dello studio e breve descrizione degli strumenti di valutazione 33

2.3.4. Analisi statistiche 35

3. Risultati 35

3.1. Caratteristiche pre-frattura del campione in studio 36

3.1.1. Caratteristiche socio-demografiche 36

3.1.2. Caratteristiche cliniche e funzionali 36

3.2. Insorgenza di disturbi neuropsichiatrici a seguito della frattura di femore 38

3.3. Andamento osservato dei disturbi neuropsichiatrici 40

3.4. Influenza dei disturbi neuropsichiatrici sul recupero funzionale 43

3.5. Influenza dei disturbi neuropsichiatrici sul recupero motorio precoce 46

3.6. Influenza dei disturbi neuropsichiatrici sul recupero motorio a T1-T2-T3 48

3.7. Influenza delle patologie neuropsichiatriche pre-frattura su disabilità e cadute 51

3.8. Influenza delle patologie neuropsichiatriche pre-frattura sul recupero funzionale e motorio 53

4. Discussione 54

5. Conclusioni 58

6. Appendice 60

6.1. Descrizione delle scale di valutazione 60

6.1.1. Mini Mental State Examination (MMSE - Folstein MF et al., 1975) 60

6.1.2. Mini International Neuropsichiatric Interview Plus (M.I.N.I. PLUS - Sheehan D et al., versione italina 5.0.0 1998) 60

6.1.3. Geriatric Depression Scale (GDS - Brink TL et al., 1982) 61

6.1.4. Confusion Assessment Method (CAM - Sharon K et al., 1990) 61

6.1.5. Personal Mastery (Berry JM et al., 1993) 61

6.1.6. Barthel Index (Mahoney FI et Barthel DW, 1960) 61

6.1.7. Cumulated Ambulation Score (CAS - Foss NB et al., 2006) 62

6.1.8. Visual Analogic Scale (VAS - Turk DC, 2001) 62

6.1.9. Short Physical Performance Battery (SPPB - Guralnik JM et al., 1994) 63

6.1.10. Indice di Charlson (Charlson ME et al., 1987) 63

6.1.11. Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index (WOMAC - Bellamy N, 2002) 63

RINGRAZIAMENTI 65

Bibliografia 66

Parte 1

1. Introduzione

L'osteoporosi è una patologia di rilevanza sociale, la sua incidenza aumenta con l'età sino ad interessare la maggior parte della popolazione oltre l'ottava decade di vita. Le più temibili complicanze dell'osteoporosi sono le fratture, specialmente quelle vertebrali e femorali. La fotografia dell'incidenza dell'osteoporosi nella popolazione italiana è abbastanza allarmante; si tratta infatti di circa 4 milioni di donne e di circa 800.000 uomini che si trovano in tal modo esposti ad un alto rischio di fratture (Atti dell'indagine conoscitiva sull'osteoporosi della XII Commissione del Senato della Repubblica Italiana). Ad 1 anno dalla frattura il 20% dei pazienti è deceduto, il 30% ha una disabilità permanente, il 40% una incapacità a deambulare autonomamente e l'80% una disabilità in almeno un'attività di vita quotidiana [1; 2; 3; 4]. La presenza di diverse comorbidità, molto comuni negli anziani, sono correlate ad elevate percentuali di caduta e di mortalità dopo frattura di femore [5]. Tra le comorbidità, i disturbi neuropsichiatrici rappresentano una sfida importante in termini di mortalità e recupero funzionale dei pazienti con frattura di femore [5; 6]. Un numero crescente di studi ha dimostrato la presenza di connessioni tra osteoporosi e tendenza alle cadute e fratture e diversi disturbi neuropsichiatrici tra cui depressione, demenza, malattia di Parkinson, delirium [7]. Depressione ed altri disturbi della sfera neuropsichiatrica presentano infatti aspetti eziopatologici e fisiopatologici in comune con quelli alla base dell'osteoporosi, dei processi di impoverimento della densità minerale ossea e naturalmente degli eventi di alterazione dell'equilibrio e tendenza alle cadute. Per tali motivi acquisisce sempre maggior interesse il campo di indagine che studia il rapporto neuro-fisio-patologico tra osso e cervello e lo studio del sistema di regolazione detto "bone-brain crosstalk" che mette in luce una correlazione diretta tra il tessuto osseo ed il sistema nervoso [8]. Le osservazioni cliniche relative a pazienti con concomitante presenza di patologie neurologiche quali lo stroke o che avevano subito traumi cranici o spinali ed osteopenia, osteoporosi, tendenza alle fratture hanno inizialmente evidenziato

l'esistenza di una regolazione metabolica ossea di tipo neuronale [9; 10; 11; 12; 13; 14], mentre numerosi e più recenti studi in vitro, in vivo e analisi genetiche su topi hanno confermato che l'omeostasi del tessuto osseo dipende anche da un controllo neuronale sia periferico che centrale [15]. Nel soggetto anziano fragile dove una serie di concomitanti alterazioni psicofisiche interagendo tra loro determinano una riduzione delle risposte fisiologiche [16; 17] e dove a seguito dell'evento caduta compaiono disabilità, comorbidità, disturbi neuropsichiatrici e morte possiamo quindi individuare un esempio particolare e caratteristico di correlazione osso-cervello e di conseguenza un buon modello di studio di tale correlazione.

2. Fisiologia del sistema Osso-Cervello "Bone/ Brain Cross-Talk"

Il rimodellamento osseo è un processo complesso regolato da diversi segnali ormonali paracrini/autocrini, meccanici e trascrizionali che agiscono sugli osteoblasti e sugli osteoclasti in varie fasi della loro vita [18; 19]; ad oggi un crescente numero di studi suggerisce che anche i segnali nervosi giocano un ruolo importante nella regolazione di tale processo [15]. Il sistema di regolazione neuronale detto "bone-brain crosstalk" mette in luce una correlazione diretta tra il tessuto osseo ed il sistema nervoso [8]. La prima documentazione della presenza di una relazione anatomica fra nervi e tessuto osseo si deve a Charles Estienne e risale al 1545, mentre evidenze relative all'esistenza di componenti regolatorie neuronali del processo di rimodellamento osseo sono state descritte per decenni nella letteratura clinica [20]. Oggi le molteplici scoperte relative all'interazione tra il rimodellamento osseo e numerosi neuroni e neuropeptidi appartenenti al sistema nervoso centrale hanno creato un nuovo campo di ricerca, lo studio del sistema neuroscheletrico.

3. Sistema Ipotalamico e rimodellamento osseo

L'ipotalamo con la sua barriera ematoencefalica è una delle regioni più ricche di funzioni regolatorie dell'intero organismo in quanto integra segnali provenienti non solo dai tessuti periferici ma anche da altre zone interne all'ambiente cerebrale [21; 22]. L'implicazione dell'ipotalamo nella regolazione del rimodellamento osseo è stata scoperta grazie a due

ben conosciute e apparentemente indipendenti osservazioni epidemiologiche: i pazienti obesi sono generalmente protetti dall'osteoporosi e l'osteoporosi tipicamente insorge a seguito di un deficit gonadico. Tutto questo ha suggerito l'esistenza di un comune meccanismo di regolazione della riproduzione, del peso corporeo e del rimodellamento osseo [23; 24].

3.1. Leptina

Il primo modello di studio relativo al controllo centrale e neuronale del tessuto osseo coinvolgeva l'azione di un segnale endocrino non proveniente dall'osso ma dal tessuto adiposo. La leptina è infatti un peptide secreto dagli adipociti che agisce con l'ipotalamo per il controllo del peso corporeo [21; 25]; è un ormone multifattoriale di 16 KDa derivato dagli adipociti e deputato alla regolazione della riproduzione e del metabolismo energetico attraverso il suo recettore di membrana ObRb localizzato a livello dei neuroni ventromediali dell'ipotalamo. Ad oggi la Leptina è considerata anche un importante fattore nella modulazione della massa ossea [26; 27]. La scoperta che il deficit di leptina o del suo recettore (ObRb) determina un'elevata densità ossea nel topo, nonostante l'ipogonadismo, ha suggerito un ruolo inibitorio della leptina nella regolazione della densità di massa ossea [28; 24]. Tutto questo è stato confermato anche dalla dimostrazione che l'infusione intracerebroventricolare di leptina in topi con deficit leptinico (ob/ob mice) causa una significante perdita di massa ossea [24; 29; 30]. Secondo le osservazioni di Ducy et al.[24] è infatti proprio la condizione di resistenza leptinica presente nei pazienti obesi a determinare la protezione dalla perdita di massa ossea [30]. Al contrario, alcuni studi quali quello di Steppan et al. [31] e quello di Burguera et al. [32] hanno mostrato come la somministrazione parenterale di leptina in topi ob/ob induca un incremento significativo della lunghezza, della superficie totale e della densità di massa ossea del femore [30]. Lo studio di Halloway et al. ha dimostrato l'effetto inibitorio della leptina sulla rigenerazione degli osteoclasti sia in colture cellulari murine che umane (effetto mediato dal sistema RANKL/RANK/OPG) [30; 33]. Così come negli studi condotti in vivo anche negli esperimenti in vitro il ruolo della leptina appare controverso [30]. Thomas et al. hanno suggerito un'azione leptinica nei processi di differenzazione degli osteoblasti considerando anche la comune origine degli osteoblasti e degli adipociti da un singolo precursore del midollo osseo [24; 30; 34]; questo meccanismo non è ancora ben conosciuto ma sembra essere collegato all'attivazione della cascata STAT-kinasi. La leptina potrebbe quindi essere provvista di un'azione autocrina/paracrina oltre che endocrina

come è confermato dalla sua escrezione e secrezione da parte di colture primarie di adipociti ed osteoblasti umani [30]. Studi condotti sull'uomo suggeriscono un intervento della leptina nel controllo del metabolismo osseo in differenti periodi della vita [30; 35]. Donne affette da anoressia nervosa che pertanto presentano un profilo ormonale simile a quello riscontrato nei topi ob/ob, sviluppano una forma di osteoporosi più severa di altre donne affette da amenorrea ipotalamica, una condizione caratterizzata da ipoestrogenismo ma senza bassi livelli di leptina [30; 36; 37]. In una popolazione di donne non obese , sia in pre che in post menopausa, è stata osservata un'importante correlazione tra i livelli sierici di leptina ed il valore di indice di massa corporea (Body Mass Index- BMI) che persiste anche dopo aggiustamento per età, peso corporeo, livello di massa grassa corporea e di superficie ossea [30; 38]. La correlazione tra leptina, indice di massa grassa corporea e BMI è stata confermata da diversi studi nella popolazione femminile ma non in quella maschile suggerendo la possibile esistenza di un dimorfismo sessuale [39].

3.2. 5-OH Triptamina (5-HT)

Lo studio del meccanismo d'azione della Leptina sul tessuto osseo ha recentemente condotto alla scoperta che anche la serotonina avrebbe un importante ruolo in tale sistema. Yadav et al. hanno infatti mostrato che proprio la serotonina prodotta a livello cerebrale (brain-derived serotonin, BDS) è in grado di modulare l'effetto della leptina sulla massa ossea [29; 38; 40; 41]. I recettori della 5-HT sono stati identificati in tutte le principali tipologie di cellule ossee (osteoblasti, osteociti ed osteoclasti) e la loro stimolazione ne influenza l'attività [21; 42; 43]. A tal proposito numerosi sono gli studi giunti a risultati contrastanti; alcune prove in vitro suggeriscono infatti un effetto stimolatorio della serotonina sulla formazione di nuovo tessuto osseo e questo tramite l'aumentato rilascio di prostaglandina E_2 da cellule osteocito simili (MLO-Y4) e la proliferazione delle cellule MC_3T_3-E1 e degli osteoblasti [44]. Al contrario altri studi suggeriscono un effetto inibitorio della serotonina sulla formazione di nuovo tessuto osseo. La 5-HT ha infatti determinato una riduzione della proliferazione di osteoblasti murini [45] e l'inibizione del rilascio di ossido nitrico da parte di quest'ultimi [21; 46]. La serotonina viene sintetizzata a partire dalla triptamina sia nel cervello che nel duodeno (a livello delle cellule cromaffini) ed entrambe le forme hanno mostrato un'azione regolatoria sul rimodellamento osseo [47]. Il ben conosciuto effetto osteoanabolico del gene Lrp5 per esempio può essere in parte spiegato dall'inibizione dell'azione della serotonina di derivazione intestinale [48]. La molecola responsabile dell'azione della serotonina

duodenale sulla trascrizione osteoblastica si chiama FOXO1 ed è stata identificata negli osteoblasti [49]. Alcuni studi clinici hanno mostrato una relazione inversa tra i livelli sierici di serotonina e densità e qualità dell'osso; pazienti trattati con farmaci antidepressivi quali gli inibitori del reuptake della serotonina (SSRIs) presentano infatti una bassa densità di massa ossea al femore ed un elevato rischio di frattura osteoporotica [50; 51]. Allo stesso modo un recente studio retrospettivo basato sull'osservazione per un periodo di 11 anni di una popolazione di adolescenti con disordini alimentari ha messo in evidenza che i soggetti che utilizzavano farmaci SSRI avevano una minore densità di massa ossea (BMD, z-score) rispetto ai controlli [47; 52]. Per questo motivo l'uso di farmaci SSRI in pazienti osteoporotici e/o ad elevato rischio di fratture da fragilità dovrebbe essere sempre attentamente valutato [47; 53]. La serotonina è inoltre il precursore della melatonina la quale ha dimostrato un'azione inibitoria sulla proliferazione osteoclastica in vitro nonostante sembri non influenzare la formazione di nuovo tessuto osseo. E' stato dimostrato che dosi farmacologiche di melatonina riducono il numero degli osteoclasti del 76%, mentre incrementano il volume osseo del 49% e lo spessore trabecolare del 19% [47; 54]. Sono comunque necessari ulteriori studi ed approfondimenti per fare chiarezza sull'argomento.

3.3. Neuromedina-U e ritmo circadiano

La Neuromedina U è un'altra molecola coinvolta nella correlazione leptina-tessuto osseo. Si tratta di un neuropeptide sintetizzato in diverse regioni del tratto gastrointestinale, del midollo spinale e del sistema nervoso centrale [55] sotto il controllo della leptina [27]. Secondo i risultati ottenuti da studi su topi obesi perchè deficienti di neuromedina U (NMU deficient mice) [27], tale molecola agirebbe sulla regolazione dell'appetito e sull'attivazione del sistema simpatico [56; 57] oltre che sulla regolazione della massa ossea; i topi con deficit di neuromedina infatti, mostrano anche un fenotipo caratterizzato da elevata massa ossea con aumentata attività di formazione di nuovo tessuto [56; 58]. In esperimenti condotti su osteoblasti in vitro la Neuromedina U non ha mostrato però influenzare nè la loro attività di proliferazione nè quella di differenzazione suggerendo l'origine centrale della regolazione della NMU stessa sulla formazione di nuovo tessuto osseo [55; 58]. In particolare è stato dimostrato che l'infusione intracerebro ventricolare di leptina in topi con deficit di neuromedina U (NMU-deficient mice) determinava un aumento del numero delle cellule osteoblastiche così come si poteva osservare anche in topi con deficit a livello di diversi geni regolatori del ritmo circadiano (circadian clock

genes); è stato perciò assunto che la neuromedina U determini la funzione di tali geni negli osteoblasti [56]. I geni regolatori del ritmo circadiano si sono conservati durante l'evoluzione a partire dagli archeobatteri fino agli esseri umani e sono presenti in molti organi e apparati; diversi studi ne hanno dimostrato l'azione regolatoria a livello della massa ossea e le tante molecole situate a livello degli organi periferici sono sincronizzate con quelle principali che si trovano nell'ipotalamo [20]. Tali molecole sono pertanto come degli "orologi" che nella regolazione della massa ossea agiscono anche sotto l'influenza di quello che è considerato l'orologio principale ipotalamico. A questo riguardo infatti è ben noto come in tutti i mammiferi incluso l'essere umano, la massa ossea subisca dei cambiamenti anche a seconda delle diverse stagioni [20]. E' stato comunque osservato che in determinate condizioni le molecole del ritmo circadiano possono funzionare indipendentemente dal controllo ipotalamico [59], per questo motivo l'azione diretta su tali molecole a livello degli osteoblasti potrebbe rappresentare una nuova frontiera terapeutica per le patologie che riguardano la massa ossea [20].

3.4. Neuropeptide Y (NPY) ed i suoi recettori

Il sistema del Neuropeptide Y rappresenta un altro importante fattore della correlazione fra l'ipotalamo ed il tessuto osseo. NPY è un peptide di 36 aminoacidi ampiamente espresso sia nel sistema nervoso centrale che periferico e gioca un ruolo importante nella regolazione di numerosi processi fisiologici tra cui il metabolismo energetico e l'omeostasi della massa ossea [40; 60]. Il neuropeptide Y è presente nel sistema nervoso centrale in molte regioni tra cui l'ipotalamo, la corteccia ed il tronco cerebrale, il corpo striato e strutture limbiche e soprattutto il nucleo arcuato dell'ipotalamo [61]. Nel sistema nervoso periferico si trova a livello del sistema simpatico ed è rilasciato insieme alla noradrenalina durante la stimolazione nervosa [61]. Anche gli osteoblasti e gli adipociti producono il neuropeptide Y [62; 63]. Sono stati scoperti 5 recettori del neuropeptide Y (Y1, Y2, Y4,Y5, Y6) e tutti sono del tipo accoppiato alla proteina G [61]. La conoscenza del ruolo che i recettori del neuropeptide Y svolgono è stata molto migliorata tramite lo studio su modelli di topi transgenici e knockout [61]. Il primo studio in vitro che ha indicato un ruolo dell'NPY nella regolazione del metabolismo osseo si è basato sull'osservazione che nella linea germinale di topi knockout per il recettore Y2 ($Y2^{-/-}$)era presente un volume di tessuto osseo spongioso raddoppiato [64] e che questa aumentata attività di mineralizzazione si manteneva nelle colture in vitro di cellule stromali di tessuto osseo ($BMSC_s$) isolate dai topi suddetti anche dopo la perdita dell'input neuronale [64]. Il recettore Y4 sembra avere un

ruolo di regolazione di concerto con il recettore Y2 , infatti topi mancanti sia del recettore Y2 che del recettore Y4 mostrano un aumento del volume dell'osso spongioso e dell'attività delle cellule osteoblastiche ancora maggiore di quello osservato nei topi knockout solo per il recettore Y2 [60; 65]. In particolare nei topi $Y2^{-/-}$ $Y4^{-/-}$ l'incremento del volume osseo va di pari passo con una riduzione della massa grassa e dei livelli sierici di leptina [60; 65]. Uno studio condotto su una linea germinale di topi knockout per il recettore Y1 ($Y1^{-/-}$) ha rivelato un fenotipo caratterizzato da aumentata massa ossea simile a quello osservato nei topi kockout per il recettore Y2 ($Y2^{-/-}$) e che tale incremento riguardava sia il tessuto osseo spongioso che quello corticale [62; 66]. Questi studi dimostrano quindi che il neuropeptide Y agisce sulla regolazione della massa ossea principalmente attraverso i recettori Y2 e Y1, ma mentre la delezione del primo determina un aumento della formazione di nuovo tessuto osseo tramite effetti ipotalamici, la delezione del secondo determina risultati simili ma senza il coinvolgimento dell'ipotalamo [60]. Per quanto riguarda i recettori Y5 ed Y6, possiamo affermare che ad oggi si conosce ben poco del loro coinvolgimento nella regolazione del metabolismo osseo; Y1 ed Y5 si trovano nell'uomo nello stesso cromosoma (4q31) e questo suggerisce una regolazione trascrizionale coordinata [66], mentre Y6 risulta nell'uomo non funzionale. La famiglia dei neuropeptidi Y include, oltre quello in questione, alcuni ormoni endocrini quali il peptide YY (PYY) ed il polipeptide pancreatico (PP), ognuno dei quali agisce tramite l'attivazione di specifici recettori accoppiati a proteina G detti recettori Y [66]. Il peptide YY (PYY) è uno dei principali ormoni gastrointestinali ed è stata recentemente dimostrata la sua influenza sul metabolismo osseo [67; 68]. Alcuni studi infatti hanno rivelato che in adolescenti o donne affette da anoressia nervosa, ad elevati livelli di peptide Y corrispondevano bassi livelli di BMD soprattutto a livello della colonna vertebrale [69; 70]. Uno studio condotto su una linea di topi knockout per il peptide YY ($PPY^{-/-}$) ha invece apportato risultati contrastanti evidenziando in questo caso un fenotipo osteopenico caratterizzato da riduzione della massa ossea spongiosa vertebrale e della resistenza ossea allo stesso livello [66; 71].

3.5. Sistema dei recettori dei Cannabinoidi

Secondo recenti studi condotti in vivo anche i recettori dei cannabinoidi sarebbero coinvolti nella regolazione della massa ossea. Si conoscono due di tali recettori: il recettore CB1, codificato dal gene CNR1 ed espresso principalmente a livello del sistema nervoso centrale e simpatico oltre che in alcuni tessuti periferici ed il recettore CB2 codificato dal

gene CNR2 il quale è più specifico per i tessuti periferici, in particolare si ritrova nelle cellule del sistema immunitario, negli osteoblasti e negli osteoclasti [20; 55]. E' stato osservato che la stimolazione dei recettori CB1 rallenta lo sviluppo della massa ossea ma determina un aumento del volume osseo nei soggetti anziani; al contrario il deficit degli stessi recettori CB1 è associato ad un aumentata attività di formazione di nuovo tessuto osseo e ad un'accelerazione della perdita di massa ossea nell'età avanzata [47]. Per quanto riguarda il recettore CB2, questo determina inibizione del riassorbimento osseo, rallentando la perdita di massa ossea nell'anziano, ma sembra non avere effetto sul raggiungimento del picco di massa ossea in età giovanile [47; 72]. Il sistema dei cannabinoidi che è coinvolto nella regolazione dei processi psicotropici, analgesici e legati alla regolazione dell'appetito sembra inoltre rivestire importanza nella biologia del tessuto osseo a seguito di lesioni cerebrali di origine traumatica (TBI) determinando un miglioramento dell'osteogenesi e stimolando la produzione centrale di endocannabinoidi. Alcuni autori hanno riportato come in studi condotti su topi con TBI e con deficit del gene CNR1 ($CNR1^{-/-}$), ma con gene CNR2 funzionante non fosse presente l'aumento di formazione di nuovo tessuto osseo TBI-indotto e questo ha suggerito che è il segnale prodotto da CB1 a determinare l'effetto pro-osteogenico che segue un trauma cerebrale [20; 73]. Sono necessari studi sull'uomo per verificare l' eventuale esistenza di tali segnali a seguito di accidenti cerebrali di origine traumatica [20].

3.6. CART (Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript) e Recettore 4 della Melanocortina

Il CART (Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript) è un altro peptide, la cui espressione è positivamente controllata dalla leptina [20], che ha un ruolo nella regolazione della fase riassorbitiva del rimodellamento osseo [74]. Topi con deficit del neuropeptide CART hanno mostrato un fenotipo caratterizzato da bassa massa ossea dovuto ad un aumentata attività di riassorbimento [20; 74]. Il neuropeptide CART è ampiamente espresso sia nel sistema nervoso centrale che in diversi organi periferici tra cui il pancreas, le ghiandole surrenali e le cellule ossee [20; 55]; l'osservazione di queste ultime ha permesso di chiarire come il CART favorisca il riassorbimento osseo non agendo direttamente sugli osteoclasti ma modulando l'espressione del recettore Rankl sugli osteoblasti [74]. La melanocortina è un ormone ipofisario di natura peptidica implicato nella regolazione dell'assunzione di cibo e del dispendio energetico attraverso la sua

azione sui recettori MC3 ed MC4 [75]. Studi condotti su topi caratterizzati da deficit dei recettori MC4 hanno mostrato che tali topi presentavano anche un fenotipo con elevata densità di massa ossea in modo inverso a quello che succedeva nei topi con deficit di CART [55; 74]; l'aumentata espressione del neuropeptide CART sembra comunque essere la sola causa dell'elevata densità di massa ossea in questi topi [55; 76]. Gli stessi processi di regolazione del riassorbimento osseo così come gli aumentati livelli sierici di CART in soggetti mancanti dei recettori MC4 della melanocortina che determinano fenotipi ad elevata massa ossea potrebbero essere ritrovati anche nell'essere umano [20; 76], ma ulteriori studi sono necessari in questo ambito.

4. Acido Glutammico

L-Glutammato è conosciuto come uno dei principali neurotrasmettitori eccitatori del sistema nervoso centrale ma sembra avere un ruolo anche in alcuni organi come il pancreas, la pelle ed il tessuto osseo [15]; recettori funzionali per il glutammato sono infatti stati identificati anche nelle ghiandole surrenali, nel polmone, nelle β cellule pancreatiche, nei megacariociti, nel cuore e nelle cellule ossee [77; 78]. La prima descrizione di segnali glutammatergici nell'osso si deve allo studio di Mason et al. nel 1997 [78; 79]. Tutte le cellule ossee inclusi osteoblasti, osteoclasti ed osteociti sono equipaggiate dell'apparato molecolare necessario per il rilascio, il recupero extracellulare e la risposta al glutammato. Tutte le cellule osteoblastiche rilasciano spontaneamente glutammato a concentrazioni di circa 2-7 nmol/mg di proteina che sono quantità uguali o maggiori a quelle rilasciate dai neuroni depolarizzati e dagli astrociti [80; 81; 82]. La quantità di glutammato rilasciato dagli osteoblasti è sufficiente per determinare l'attivazione di recettori specifici espressi sulla superficie di altre cellule ossee [21; 82]. I segnali del glutammato negli osteoblasti sono regolati da due citochine il TNF-α e l'INF-γ, le quali sono implicate nell'induzione dell'apoptosi degli osteoblasti stessi anche tramite una riduzione del rilascio di glutammato [21; 82]. Il ruolo funzionale dei segnali glutammatergici nella biologia dell'osso è stato studiato principalmente attraverso analisi cellulari in vitro. E' stato dimostrato che anche gli osteoclasti, come gli osteoblasti, esprimono recettori funzionali per il glutammato (iGluR e mGlur) oltre che sistemi di trasporto del tutto simili a quelli delle cellule nervose [15; 83; 84]. Alcuni studi condotti in vitro hanno mostrato come l'inibizione dei recettori per il glutammato, in particolare del tipo NMDAR attraverso specifiche molecole antagoniste o anticorpi determinasse

l'inibizione della differenzazione degli osteoclasti e del riassorbimento osseo [15; 83; 84; 85]. Alcune evidenze hanno inoltre suggerito il coinvolgimento in questi processi di regolazione da parte del glutammato [15], dell'NF-κB un fattore essenziale nella differenzazione osteoclastica [84]. Il glutammato sembra inoltre avere una funzione paracrina sulle cellule ossee che infatti si attiva a seguito di una downregulation dei trasportatori del glutammato stesso in risposta a stimoli meccanici sugli osteociti [21; 79].

5. Neuropeptidi

5.1. CGRP (Calcitonin Gene-Related Protein)

Il CGRP è un neuropeptide composto da 37 aminoacidi prodotto dallo splicing alternativo del gene della calcitonina ed è espresso principalmente nelle fibre di tipo A-delta e C del sistema nervoso periferico. Tramite tecniche di colorazione immunoistochimicha sono state trovate fibre nervose rispondenti al CGRP anche nel tessuto osseo ed in particolare nel periostio, nel midollo osseo e nell'osso trabecolare delle epifisi [20; 86]. Sulle cellule osteoblastiche si trovano recettori per il CGRP che se stimolati ne determinano cambiamenti morfologici e funzionali attraverso un incremento dell'AMP ciclico (cAMP) intracellulare e dell'efflusso di calcio e potassio con iperpolarizzazione [15; 87]. Il neuropeptide CGRP stimola infatti la proliferazione degli osteoblasti [88], la sintesi del fattore di crescita IGF-1 (fattore che favorisce la proliferazione osteoblastica), la formazione di nuovo collagene e di nuova massa ossea [15; 88], mentre determina la riduzione dell'espressione del TNF-α [20; 21]. E' stato dimostrato inoltre che il processo di riparazione che segue gli eventi fratturativi si accompagna sempre ad una rapida proliferazione delle terminazioni nervose che esprimono CGRP e questo suggerisce l'esistenza di un ruolo basilare di questo neuropeptide in tali eventi [15; 89]. Secondo alcuni studi il CGRP può essere considerato un fattore autocrino che agisce nella modulazione osteoblastica in modo diretto [15; 86; 90]. Ci sono due trials in particolare a supporto di questa ipotesi: topi transgenici con cellule osteoblastiche che super esprimono il CGRP, presentano un aumentato volume di massa ossea [91]; allo stesso modo topi trattati con iniezioni di CGRP risultano parzialmente protetti dalla perdita di massa ossea indotta dalla gonadectomia [15; 92], mentre topi con deficit per il CGRP presentano osteopenia moderata [15; 93]. In studi condotti in vitro inoltre il CGRP ha determinato una riduzione del riassorbimento osseo inibendo in modo diretto l'attività osteoclastica [20],

non ci sono stati però risultati simili nelle prove condotte in vivo su topi di laboratorio carenti di CGRP [15; 93].

5.2. VIP (Vasoactive Intestinal Peptide)

Il peptide intestinale vasoattivo è un prodotto del clivaggio del pre-pro-VIP che si ritrova come potente attivatore dell'adenilato-ciclasi in molti organi ed apparati [21; 94]. Dopo la sua iniziale scoperta come vasodilatatore infatti, la sua presenza è stata dimostrata nel sistema nervoso centrale e periferico [86; 94] oltre che in molti altri apparati come neurotrasmettitore e neuromodulatore [86], tra questi l'apparato gastrointestinale, il respiratorio, il cardiovascolare, il riproduttivo, l'endocrino ed il sistema immunitario [86; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102]. La prima dimostrazione della presenza di fibre nervose immunoreattive per il VIP nel tessuto osseo si deve allo studio di Hohmann et al. che risale al 1986 [86; 103], solo più tardi tali fibre sono state meglio localizzate a livello del periostio e delle epifisi [20]. Il VIP è ligando per tre specifici recettori: VIP-1R, VIP-2R ed il recettore PACAP (receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) [20]. E' stato dimostrato che i recettori del VIP sono presenti sia negli osteoblasti che negli osteoclasti [20; 104; 105]. Diversi studi hanno rivelato un'attività inibitoria del VIP sull'osteoclastogenesi che si attua sia attraverso la riduzione dell'espressione del RANK e del RANKL (rispettivamente sugli osteoclasti e sugli osteoblasti), sia attraverso l'incremento dell'espressione osteoblastica di osteoprotegerina [20; 106]. Sembra inoltre che il VIP stimoli a livello delle cellule osteoblastiche sia l'attività che l'espressione dell' mRNA dell'enzima ALP associato alla mineralizzazione ossea [86; 107]. Oltre agli effetti esercitati sulla funzione delle cellule ossee, è stato dimostrato in modelli sperimentali in laboratorio che il peptide intestinale vasoattivo svolge anche un'azione protettiva dalla distruzione ossea indotta dall'artrite. Il trattamento con VIP in laboratorio di topi affetti da artrite risulta infatti in una ridotta incidenza, ridotta severità e ritardo d'inizio della patologia oltre che in una eccezionale riduzione del danneggiamento cartilagineo e dell'erosione ossea delle articolazioni artritiche [86; 108].

5.3. Sostanza P

La sostanza P è un peptide aminoacidico appartenente alla famiglia delle tachichinine largamente distribuito nel sistema nervoso centrale e periferico [86; 109; 110]. Le fibre

nervose immunoreattive per la sostanza P si trovano nel midollo osseo associate a vasi sanguigni solo in entrata, ma sono state dimostrate anche in altre localizzazioni scheletriche fra le quali il periostio, il piatto di accrescimento epifisario, i legamenti ossei subcondrali e la membrana sinoviale [84; 86; 111]. La dimostrazione di recettori per la sostanza P sugli osteoblasti è controversa, mentre nelle cellule osteoclastiche multinucleate di ratto tali recettori sono stati trovati sia a livello della membrana che del citoplasma [86; 112; 113]; la sostanza P migliora l'attività di riassorbimento osseo di questi osteoclasti isolati [86]. Quale sia il ruolo dell'SP nella genesi osteoclastica attraverso l'azione a livello del rapporto RANKL/OPG nelle cellule stromali del midollo osseo o negli osteoblasti del periostio non è ancora ben chiaro, ma non è improbabile un suo coinvolgimento in tale rapporto, dal momento che essa determina un'aumentata espressione del RANKL e una ridotta espressione dell'OPG nelle cellule della membrana sinoviale di topo [86; 114].

6. Semaforine

Le semaforine (Sema) sono una eterogenea famiglia di proteine inizialmente identificate nel sistema nervoso dell'adulto e nell'embrione dove erano associate a funzioni di guida degli assoni, migrazione e polarizzazione dei neuroni e formazione delle sinapsi [115]. Sono state scoperte più di 20 tipi di semaforine [116] con ruoli diversi in numerosi processi biologici tra i quali la cardiogenesi [117,118], l'angiogenesi [119], l'oncogenesi [120] e la regolazione delle risposte immuni [121; 122]. In particolare, ad oggi molti studi suggeriscono che le semaforine sono anche coinvolte nei processi di omeostasi e patogenesi ossea [123; 124]. Sulla base di similitudini a livello della struttura C-terminale e della sequenza aminoacidica le semaforine sono state suddivise in otto classi [116]: le prime due comprendono molecole identificate negli invertebrati; tra la terza e la settima classe sono raggruppate quelle presenti nei vertebrati; l'ultima classe comprende molecole codificate da geni di origine virale.

La semaforina 4D (Sema4D) è stata recentemente indicata come un fattore importante nella regolazione della formazione di nuovo tessuto osseo [125; 126]; espressa esclusivamente negli osteoclasti, incrementa durante l'osteoclastogenesi RANKL indotta [125]. Topi con deficit di Sema4D o di Plexina-B1 che risulta essere il suo recettore funzionale, presentano infatti un fenotipo caratterizzato da elevata densità di massa ossea con aumentata superficie osteoblastica a livello del femore [125; 126]. Anche gli studi in

vitro confermano tali evidenze mostrando come la Semaforina 4D agisca inibendo la mineralizzazione indotta dagli osteoblasti [125] e inducendo la genesi degli osteoclasti [125; 126]. Di particolare interesse sono le ricerche effettuate sulle implicazioni terapeutiche di tale Semaforina. Negishi-Koga et al. hanno scoperto per esempio come anticorpi specifici per la Sema4D possano prevenire la perdita di massa ossea ovariectomia indotta [125]. Ci sono inoltre delle evidenze sul possibile utilizzo della Semaforina 4D nel trattamento del cancro e delle patologie infiammatorie [127].

La Semaforina 3A (Sema3A) esercita la sua attività biologica interagendo con la Neuropilina 1 (Nrp1) e la Plexina-A1. Secondo lo studio di Hayashi et al. tale semaforina esercita un doppio controllo sul rimodellamaento osseo riducendo il riassorbimento ed incrementando la sintesi di nuovo tessuto osseo simultaneamente, fatto questo che suggerisce un suo possibile utilizzo nella terapia dell'osteoporosi [123]. Topi di laboratorio caratterizzati da deficit della Sema3A presentano importanti anormalità scheletriche [128]; così come i precedenti, anche i topi con deficit di Neuropilina 1 (Nrp1 $^{sema-}$) mostrano un fenotipo con ridotto numero di osteoblasti, ridotta attività di nuova formazione ossea ed alterata espressione di alcuni geni degli osteoblasti tra cui Runx2 e Alpl [129]. Il trattamento con Sema3A migliora inoltre la rigenerazione ossea a livello corticale di topi di laboratorio dopo l'induzione di alterazioni provocate a questo livello con un trapano [130]. Tutti questi dati suggeriscono pertanto che la Semaforina 3A svolga un ruolo cruciale nei processi osteoprotettivi [127].

La Semaforina 7A chiamata anche CD108 o SemaK1 è stata inizialmente identificata nel sistema immunitario [131; 132], alcuni studi in vitro ne hanno dimostrato poi una funzione anche a livello del tessuto osseo. L'espressione di Sema7A è presente infatti durante tutte le fasi di differenzazione sia degli osteoblasti che degli osteoclasti [133]. Sarebbero comunque necessari studi in vivo su topi con deficit di tale semaforina per chiarirne i meccanismi d'azione. Un altro gruppo di studio ha comunque dimostrato come una popolazione di donne coreane in postmenopausa e con poilimorfismi della Sema3A abbiano presentato un'importante riduzione della densità minerale ossea associata ad un aumentato rischio di frattura [134].

Ci sono altri membri della famiglia delle Semaforine implicati nel controllo dell'omeostasi ossea, tra questi la Semaforina 3B la cui espressione negli osteoblasti è indotta dalla vitamina D3 e la cui deficienza è associata ad osteopenia ed aumentata osteoclastogenesi [135].

7. Fattore Neurotrofico cerebrale (BDNF)

Il Fattore Neurotrofico Cerebrale (BDNF) è una neurotrofina e fa parte della famiglia dei fattori neurotrofici alla quale appartengono anche il Fattore di Crescita Neuronale (NFG), la Neurotrofina 3 (NT-3), la Neurotrofina 4/5 (NT4/5) e la Neurotrofina 6 (NT-6). Il BDNF è implicato nella sopravvivenza, nella differenzazione e plasticità neuronale sia a livello del sistema nervoso centrale che periferico [136; 137]. L'attività biologica del BDNF è mediata da un sistema di recettori trans-membrana ad elevata affinità che appartengono alla famiglia dei trkB e da recettori a più bassa affinità del tipo p-75 [138]. Al di fuori del sistema nervoso il Fattore Neurotrofico Cerebrale ed il suo recettore TrkB vengono espressi da molti altri tipi cellulari tra i quali i leucociti, i condrociti, i fibroblasti, gli adipociti e gli osteoblasti [139]. Diversi studi hanno dimostrato come le neurotrofine ed i loro recettori siano infatti implicati nella fisiologia ossea ma si ritrovano anche durante lo sviluppo di processi patologici. Asaumi et al. hanno condotto uno studio in vivo su topi fratturati evidenziando l'espressione delle neurotrofine nelle cellule coinvolte e suggerendone un ruolo importante nella regolazione dei processi di nuova formazione ossea [140]. Lo stesso gruppo di ricerca aveva precedentemente mostrato l'espressione di neurotrofine da parte di una linea cellulare di osteoblasti murini [141]. Lo studio di Mogi et al. ha mostrato come in una linea cellulare osteoblastica la neurotrofina NGF si comporti come un fattore autocrino con funzione antiapoptotica [142]. Gli mRNA del BDNF e del TrkB sono inoltre stati rilevati negli osteoblasti dei siti di ossificazione endocondrale ed intramembranosa e nei condrociti del condilo mandibolare e del femore del topo confermando l'azione autocrina ed il ruolo regolatorio di tali fattori nel rimodellamento osseo (siti di ossificazione ed osso trabecolare) [136]; ancora non ben conosciuta è comunque l'azione del BDNF a livello del tessuto cartilagineo [136]. Un altro studio ha investigato l'importanza dei segnali centrali del BDNF sulla regolazione della massa ossea utilizzando un modello di topi nei quali il BDNF veniva selettivamente soppresso dopo la nascita tramite la ricombinazione del cre-LoxP e rilevando che ciò comportava un fenotipo caratterizzato da iperfagia, obesità con elevati livelli di leptina ed elevata densità di massa ossea [143; 144; 137]. Gli mRNA del Fattore Neurotrofico Cerebrale e del suo specifico recettore TrkB sono stati inoltre ricercati in campioni di tessuto osseo diafisario umano dopo una frattura in differenti fasi del processo di guarigione, rivelandone la presenza nelle cellule ematopoietiche vicine all'ematoma della frattura, nei fibroblasti del tessuto di granulazione e negli osteoblasti attivi nelle fasi più avanzate del processo (ossificazione endocondrale, formazione osteoide e del tessuto osseo lamellare) [145]; questo studio ha

quindi dimostrato la presenza anche nell'uomo, del BDNF e del suo recettore nei tessuti attivi durante i meccanismi di guarigione da una frattura [145].

8. Sistema β-Adrenergico

I recettori adrenergici sono un sistema di recettori di membrana del tipo accoppiati a proteina G che interagiscono con l'adrenalina ed altre catecolamine. Esistono più recettori del tipo β adrenergico, di questi quello principalmente espresso nelle cellule osteoblastiche è il β2AR, ma sono stati ritrovati anche il β1AR ed il β3AR anche se in misura minore [15; 29; 146]. Il recettore β2AR conosciuto soprattutto per il suo ruolo nella regolazione delle funzioni della muscolatura liscia cardiovascolare, respiratoria ed uterina, presenta infatti secondo recenti studi anche un'azione nella biologia del tessuto osseo [15]; tutto questo è stato dimostrato dal fatto che la stimolazione farmacologica (con isoproterenolo o norepinefrina) dei recettori β adrenergici sugli osteoblasti determinava un incremento del cAMP intracellulare [15; 29; 74]. Il coinvolgimento del sistema nervoso simpatico nella regolazione della densità di massa ossea è stato confermato da prove farmacologiche e genetiche che hanno evidenziato in topi caratterizzati da basso tono simpatico o trattati con un β bloccante (propanololo), così come in quelli con deficit di dopamina-idrossilasi o di leptina (*ob/ob* mice), un incremento del numero e dell'attività degli osteoblasti e di conseguenza della densità di massa ossea; al contrario è stato messo in evidenza che il trattamento con un β agonista (isoproterenolo) causava un'importante riduzione del numero, dell'attività degli osteoblasti e della massa ossea [15; 24; 29]. Gli agonisti adrenergici potrebbero anche stimolare indirettamente la differenziazione osteoclastica aumentando l'espressione di RANKL negli osteoblasti [74; 147]. Il RANKL secreto dagli osteoblasti ed antagonizzato dal recettore osteoprotegerina (OPG) è un fattore cruciale dell'induzione del processo di differenzazione osteoclastica [15; 148; 149]. I topi con deficit di espressione del RANKL risultavano severamente osteopetrotici e questo era dovuto all'assenza degli osteoclasti e del processo di riassorbimento osseo [15; 150]. Oltre a quella del RANKL, l'espressione di altri fattori osteoclastogenici tra cui l'interleuchina 6 (IL6), l'interleuchina 11 (IL11), la prostaglandina PGE_2 viene stimolata dagli agonisti β adrenergici sia nelle cellule osteoblastiche dell' uomo che del topo [147; 151]. Dopo la sommministrazione di agonisti β adrenergici nei ratti è stato osservato infatti un significativo incremento del valore dei marker di riassorbimento osseo [147; 152; 153]. Alcuni studi hanno inoltre evidenziato che

gli agonisti β adrenergici determinavano una riduzione significativa dei livelli di leptina e i bassi livelli di leptina avrebbero potuto contribuire all'inibizione della formazione di nuovo tessuto osseo corticale [147; 154; 155; 156].

9. Ossido Nitrico

L'ossido nitrico e gli enzimi che lo producono (sintasi endoteliale, neuronale e inducibile) svolgono importanti funzioni regolatorie in molti tipi di cellule tra cui gli osteoblasti. In particolare, la sintasi endoteliale (eNOS) sembra avere un ruolo di stimolazione nella proliferazione e differenzazione osteoblastica [20; 157; 158]. L'attività della sintasi inducibile (iNOS) media il processo di riassorbimento osseo IL-1 indotto e regola gli effetti delle citochine proinfiammatorie nel tessuto osseo stesso [20; 159; 160; 161]. Più controverso è il ruolo svolto in questo ambito dalla forma neuronale della sintasi dell'ossido nitrico (nNOS), la sua espressione infatti è minima nelle cellule ossee, ma gli studi in vivo e in vitro ne hanno suggerito un ruolo di regolazione [20; 162]. Tutte le forme di sintasi dell'osso nitrico, eNOS, iNOS e nNOS sono espresse nel sistema nervoso centrale e possono agire a livello del tessuto osseo attraverso un relay centrale [20]; al momento comunque non ci sono evidenze che escludano un'azione dell'nNOS anche nel sistema nervoso periferico [20].

10. Ormoni Ipofisari

Alcuni studi hanno recentemente mostrato come ormoni dell'adenoipofisi quali la tireotropina (TSH), l'ormone follicolo stimolante (FSH) e l'adenocorticotropina (ACTH) presentino un'azione nella modulazione dei processi di formazione e riassorbimento osseo [163; 164; 165]. L'ipotesi di un'associazione diretta tra TSH e scheletro è stata confermata da studi prospettici controllati nei quali donne tiroidectomizzate per carcinoma papillare ed in postmenopausa trattate con dosi soppressive di tiroxina subivano una forte riduzione della densità minerale ossea [47; 166]; il TSH ed alcuni agonisti del suo recettore (TSHR) hanno infatti dimostrato effetti osteoprotettivi [47; 167; 168; 169; 170].

Allo stesso modo anche per l'adrenocorticotropina (ACTH) è stato osservato un ruolo di osteo-protezione; questo peptide ad alte concentrazioni è infatti in grado di attivare l'mRNK del collagene I e attraverso i recettori della melanocortina (MC2R) stimolare la

proliferazione osteoblastica e la formazione di nuovo tessuto osseo [47; 171]. Al contrario, l'ormone follicolo stimolante (FSH) attiva l'interleuchina 1 (IL-1 beta) e stimola il riassorbimento e quindi la riduzione della massa ossea [47; 172]. Sono necessari comunque ulteriori studi per confermare l'azione del TSH e dell'FSH sul metabolismo osseo.

L'ormone della crescita (GH) e l'insulin-like growth factor (IGF) sono essenziali per un corretto sviluppo e mantenimento dell'osso [173; 174]. La presenza di osteopenia è stata descritta sia nei bambini [175; 176], che negli adulti [177]con deficit di GH e con resistenza all'ormone della crescita [178]. L'osteopenia riscontrata nei pazienti affetti da deficit di GH sembrerebbe imputabile ad un inadeguato accrescimento minerale osseo piuttosto che ad un incremento di perdita della densità minerale ossea [179].

La prolattina (PRL), ormone coinvolto nella lattazione presenta anche effetti diretti sulla massa ossea; gli osteoblasti infatti, ma non gli osteoclasti esprimono recettori per tale ormone (PRLR) [180; 181]. Tutto questo è stato dimostrato da studi condotti su topi deficienti di PRLR e con basso grado di attività di nuova formazione ossea [181]. Numerosi studi in vivo e in vitro hanno dimostrato comunque che gli effetti della prolattina sul tessuto osseo sono età dipendenti e l'azione di stimolo sull'osteoblastogenesi e sulla formazione di nuovo tessuto osseo riguarda le età più giovanili mentre in età più avanzate prevale l'effetto opposto [180].

Recentemente è stato scoperto inoltre che anche l'ossitocina è coinvolta nei processi metabolici dell'osso [47; 164]; l'assenza di recettori per l'ossitocina inibisce infatti la differenzazione estrogeno-dipendente degli osteoblasti, cioè è l'ossitocina a mediare l'azione osteo-anabolica degli estrogeni [47; 182]. Donne in età post menopausale ed affette da osteoporosi presentano livelli di ossitocina più bassi rispetto a quelli di donne che non ne sono affette [47; 183]; allo stesso modo bassi livelli di ossitocina si riscontrano negli atleti e nelle giovani donne affette da anoressia nervosa [47; 184]. Anche in questo caso sono necessari maggiori approfondimenti ed ulteriori studi [47].

Studi genetici condotti sull'uomo e su modelli animali hanno suggerito un ruolo dei peptidi derivati dalla pro-opiomelanocortina (POMC) e del recettore 4 della melanocortina (MC4R) sulla formazione di nuovo tessuto osseo [185]. Secondo numerose evidenze, diversi tipi cellulari di tessuto sinoviale e di tessuto osseo possono produrre tali peptidi ed esprimono questi recettori (MC1R, MC2R, MC3R e soprattutto MC4R) [186]. Gli effetti che il sistema POMC esercita sull'osso includono la mineralizzazione ossea, la crescita longitudinale, la

proliferazione e differenzazione di vari tipi cellulari, la sintesi di matrice extracellulare, l'osteoprotezione e l'immunomodulazione [186]. Il sistema della melanocortina regola comunque il metabolismo osseo anche attraverso meccanismi centrali mediante una complessa interazione ormonale con altri organi e tessuti che coinvolge il metabolismo energetico. Il ruolo preciso che i peptidi POMC derivati ed i loro recettori svolgono sul tessuto osseo non è comunque ancora ben chiaro, ma ci sono delle aspettative che riguardano un possibile loro utilizzo nel trattamento di patologie infiammatorie e degenerative delle articolazioni [186].

Parte 2

1. Correlazione con alcune patologie umane

Numerosi studi ed osservazioni cliniche suggeriscono l'esistenza nell'uomo di un controllo neuronale centrale dell'omeostasi del tessuto osseo [56] o più precisamente di una regolazione neuroendocrina del mantenimento dell'integrità e dei processi di riparazione ossea [26]; si tratta comunque di un sistema a doppio senso che evidenzia il rapporto neuro-fisio-patologico fra osso e cervello [8]. Una delle prime prove che hanno confermato l'esistenza di una correlazione fra il sistema nervoso centrale ed rimodellamento osseo ma anche la regolazione del peso corporeo e la riproduzione si basava sull'osservazione di un più basso rischio di frattura ed un'aumentata densità minerale ossea nei pazienti obesi e sul riscontro di una perdita di massa ossea a seguito di deficit gonadici [56]. L'attivazione del Sistema Nervoso Simpatico indotta da elevati livelli di stress è associata ad una ridotta densità di massa ossea tanto nell'uomo quanto in modelli animali [187; 188]. Molte patologie rappresentano inoltre importanti punti d'interazione tra osso e cervello e costituiscono un vasto ed affascinante campo di studio, quello della biologia neuro-scheletrica [8].

2. Neuro-osteoartropatia di Charcot

La neuro-osteoartropatia di Charcot (o "piede di Charcot") è una malattia degenerativa su base infiammatoria che può insorgere in pazienti affetti da neuropatia ed è caratterizzata da un progressivo riassorbimento osseo delle articolazioni del piede (più raro l'interessamento di altre articolazioni), associato talvolta a crolli strutturali e a marcate

deformità, tali da richiedere nei casi più gravi il ricorso ad interventi di chirurgia correttiva o ad amputazione. La patogenesi è legata a qualsiasi condizione da cui derivi la diminuzione della sensibilità dolorifica periferica, propriocettiva e del fine controllo motorio. Nei paesi sviluppati, la causa più comune nell'età adulta è rappresentata dal diabete mellito [20]. La patogenesi non è ben chiara, lo stesso Charcot affermava che in assenza di storia di trauma, doveva esistere qualche sottostante alterazione neurologica [20]. Ad oggi comunque sono due le principali teorie accettate: la teoria del neurotrauma e quella neurovascolare. Nel primo caso la perdita della sensibilità dolorifica e propriocettiva periferica porterebbe a ripetuti microtraumi dell'articolazione, il danno, passando inosservato da parte del paziente neuropatico, progredirebbe ed il conseguente riassorbimento infiammatorio dell'osso traumatizzato renderebbe tale regione ancora più suscettibile ad ulteriori traumi; la diminuzione del fine controllo motorio inoltre tenderebbe a generare posture che esercitano pressioni innaturali sulle articolazioni con conseguenti microtraumatismi supplementari. Secondo la teoria neurovascolare invece, sarebbero le alterazioni dei riflessi del sistema nervoso autonomo a determinare un significativo aumento del flusso di sangue verso l'articolazione desensibilizzata, l'iperemia conseguente porterebbe ad un aumento del riassorbimento osseo mediato dagli osteoclasti, e questo, insieme alle sollecitazioni meccaniche, provocherebbe la distruzione ossea. E' stato comunque dimostrato che in molti pazienti con malattia di Charcot sono presenti importanti alterazioni del metabolismo osseo [20; 189; 190; 191]. Secondo le conoscenze attuali é il Sistema Nervoso Autonomo ad avere un ruolo nell'abnorme formazione di tessuto osseo che è alla base di diverse patologie inclusa l'osteoartropatia di Charcot. Ulteriori studi sono comunque necessari per comprendere esattamente i meccanismi che interagiscono in questa patologia.

3. Sindrome Complessa da Dolore Regionale (Algodistrofia)

La Sindrome Complessa da Dolore Regionale (Reflex Sypathetic Dystrophy Syndrome-RSDS o Reflex Sypathetic Dystrophy-RSD) è una malattia rara che esordisce, nella sua principale manifestazione, con un dolore spesso regionalizzato a livello degli arti (mano, spalla oppure piedi) e resistente ai comuni antidolorifici. Il dolore è in genere associato ad edemi, disabilità, aumentato riassorbimento osseo ed osteoporosi localizzata [26; 192]. In alcuni casi, ma non sempre, l'esordio è conseguente ad un evento traumatico, ma la gravità del

dolore e l'andamento della malattia non sono correlati alla gravità del trauma originario. Il meccanismo patologico esatto alla base della perdita di massa ossea non è ancora stato ben chiarito, ma l'iperattività del Sistema Nervoso Simpatico [192; 193; 194; 195] e l'ipersensibilità dei recettori adrenergici [26; 196] sembrano svolgere un ruolo importante. A conferma di tali affermazioni alcuni lavori hanno riportato come la stimolazione centrale del Sistema Simpatico nei pazienti affetti da RSDS determinava dolore, aumento della vasocostrizione ed alterazione della sensibilità cutanea [195]; allo stesso modo la stimolazione dei recettori adrenergici con iniezioni intradermiche di norepinefrina nei pazienti affetti da RSDS provocava un aumento dell'intensità del dolore accusato, mentre ciò non accadeva nei controlli [196]. Un'altra possibile componente nella patogenesi della RSDS è la riduzione del numero delle ghiandole sudoripare e della vascolarizzazione [197]. I bloccanti adrenergici hanno mostrato una buona efficacia nel trattamento della Sindrome Complessa da Dolore Regionale dove sono spesso utilizzati per ridurre la vasocostrizione indotta dall'iperattività del Sistema Simpatico [26; 198]. I risultati di tutti gli esperimenti e gli studi clinici condotti confermano comunque il coinvolgimento del Sistema Nervoso Simpatico nell'insorgenza dell' aumento del riassorbimento osseo e dell'osteoporosi localizzata dei pazienti affetti da tale sindrome [199].

4. Osteoporosi

L'Osteoporosi postmenopausale è una patologia eterogenea caratterizzata da perdita progressiva di tessuto osseo con aumentato rischio di frattura. La perdita di massa ossea è principalmente legata al cambiamento del livello di estrogeni e citochine [26; 200; 201], ma anche all'azione del Sistema Nervoso Simpatico. Recenti studi hanno infatti mostrato che topi con deficit dei recettori β2-adrenergici erano caratterizzati da un fenotipo ad elevata densità di massa ossea e da un'inibizione del riassorbimento osseo persino dopo aver subito un'ovariectomia [26; 74]; l'ovariectomia comportava inoltre un'importante riduzione di innervazione nel tessuto osseo [26; 202]. Molte ricerche sono state eseguite utilizzando gli antagonisti adrenergici (come il propanololo) per studiare l'influenza del SNS sull'omeostasi ossea tanto in modelli animali (topi ovariectomizzati) quanto in donne in età post menopausale [26; 203; 204; 205]; i risultati hanno riportato un'azione parzialmente protettiva con riduzione della perdita di massa ossea [203]. L'interpretazione di tali risultati deve essere comunque fatta con cautela in quanto altri studi hanno evidenziato un'azione dose-dipendente del propanololo sul tessuto osseo

[204]. In accordo con i dati ottenuti dai modelli animali, le osservazioni cliniche e i trials condotti su donne in postmenopausa hanno prodotto risultati simili. Pasco et al. hanno analizzato i dati di 1344 donne in post menopausa trattate con β-bloccanti scoprendo che l'utilizzo di tali farmaci era positivamente correlato con una più elevata densità di massa ossea nel femore totale e avambraccio distale [26; 206]. Bonnet et al. hanno ottenuto lo stesso risultato analizzando 158 donne in età postmenopausale e che utilizzavano β-bloccanti [26; 207]. Altri studi hanno comunque ottenuto risultati contrastanti [26; 203; 208; 209; 210; 211; 212; 213] evidenziando la necessità di ulteriore chiarezza sul ruolo farmacologico che i β-bloccanti potrebbero giocare sulla salute dell'osso [8].

L'Osteoporosi può inoltre svilupparsi secondariamente a numerose condizioni morbose tra cui le lesioni del midollo spinale (SCI), fatto questo facilmente rilevabile dalle analisi dei livelli sierici ed urinari del telepopeptide C del collagene 1 [20; 214] e dalle misure della densità minerale ossea [20; 215] eseguiti rispettivamente nei primi 3 e 6 mesi dopo la lesione. La patogenesi dell'osteoporosi che si sviluppa a seguito di una lesione del midollo spinale è tradizionalmente considerata simile a quella dell'osteoporosi da immobilizzazione [26; 216; 217]; è chiaro che l'immobilizzazione e la mancanza di carico a livello muscolo-scheletrico giochino un ruolo importante, ma la perdita di massa ossea che si verifica anche negli arti superiori dei paraplegici indica, nel caso della lesione midollare, l'esistenza di differenti meccanismi coinvolti [26; 218; 219]. Lo studio di Liu et al. ha analizzato, a questo proposito, la perdita di massa ossea nei topi che avevano subito lesioni del midollo spinale e nei topi che invece erano stati sottoposti ad un'immobilizzazione forzata tramite gessazione degli arti posteriori scoprendo che alcuni fattori neuronali erano coinvolti nella patogenesi dell'osteoporosi post-lesione midollare e che la perdita di massa ossea nel primo gruppo era differente da quella che si presentava nel secondo gruppo [26; 220]. Fattori importanti nella perdita di massa ossea che si verifica a seguito della lesione midollare sono infatti la riduzione/perdita delle terminazioni nervose con parziale o completa distruzione delle vie neuronali che collegano il Sistema Nervoso Centrale al Periferico e conseguente compromissione della vasoregolazione locale [26; 221; 222; 223]; in questo tessuto osseo si verifica inoltre l'apertura di shunts intravenosi che inducono alterazioni emodinamiche [26]. E' stato dimostrato che il rimodellamento osseo è alterato anche dopo un intervento di simpatectomia o denervazione e che a seguito di una neurectomia del nervo sciatico si verifica una importante riduzione della densità di innervazione ossea [202]; conformemente, anche nel tessuto osseo lesionato si riduce la densità di innervazione e la

produzione di neuropeptidi e questo si traduce a sua volta nello squilibrio tra produzione e riassorbimento osseo [224].

L'Osteoporosi può insorgere anche per l'assenza prolungata di stimoli meccanici sul sistema muscolo-scheletrico (unloading osteoporosis). Molti studi cross-sezionali sugli atleti rivelano infatti l'effetto anabolico degli stress meccanici sul tessuto osseo [225; 226]. Nell'ambito della risposta meccanico-adattativa del tessuto osseo, molte ricerche si sono concentrate nell'analisi del ruolo svolto dal Sistema Nervoso Simpatico scoprendo in particolare l'azione dei percorsi β-adrenergici e la loro possibile utilità terapeutica [26; 210; 227; 228]. Kondo et al. hanno adottato come modello di studio in assenza di carico, topi sospesi per la coda ed hanno concluso che la soppressione dell'attività osteoblastica e la stimolazione dell'attività osteoclastica osservate erano mediate dal Sistema Nervoso Simpatico. A supporto di questa affermazione infatti c'erano alcune evidenze: la mancanza di carico sugli arti posteriori dei topi aveva determinato la riduzione del volume osseo; il trattamento con propanololo, un β-bloccante, aveva attenuato la perdita di massa ossea indotta dall'assenza di carico [228]. Altri studi sono giunti alle stesse conclusioni anche utilizzando agonisti dei recettori β-adrenergici [229]. Tali risultati confermano il coinvolgimento del Sistema Nervoso Simpatico nella perdita di massa ossea indotta dalla mancanza di carico (unloading-induced bone loss), l'azione protettiva dei β-bloccanti e l'esistenza di zone ossee più o meno sensibili a tali azioni [26; 230; 231]. Lo studio della risposta adattativa del tessuto osseo agli stimoli meccanici attraverso i segnali del Sistema Nervoso Simpatico non manca comunque di dati e risultati controversi e non perfettamente in accordo con quelli suddetti [26; 209; 232], sono perciò necessari ulteriori studi per mettere chiarezza sul ruolo che certi mediatori neuronali esercitano; anche l'acido glutammico è stato chiamato in causa da alcuni autori come uno di tali possibili mediatori [20].

5. Depressione

La prevalenza del disturbo depressivo maggiore nei Paesi occidentali risulta tra il 3,0% ed il 10,3% in 12 mesi e tra il 4,6% ed il 17% nell'arco della vita (lifetime), con un rapporto donne uomini di 2:1 [233]. La correlazione tra la depressione e la riduzione di densità minerale ossea e osteoporosi è stata estensivamente analizzata, ma fin'ora gli studi hanno riportato risultati contrastanti. Il primo studio che ha esaminato il legame fra osteoporosi e depressione è stato quello di Schweiger e colleghi nel 1994; essi misurarono il BMD di 70 pazienti affetti da depressione maggiore e di 88 controlli tramite la Single Energy

Quantitative Computerized Tomography (SEQCT), trovando nel gruppo dei depressi un valore di BMD in media del 15% più basso rispetto ai controlli [187]. Molti lavori scientifici hanno mostrato che la densità minerale ossea era ridotta nei soggetti affetti da disturbo depressivo maggiore [26; 234; 235; 236; 237; 238], mentre altri non hanno confermato questa correlazione [26; 239; 240; 241]. Diverse recenti meta-analisi di studi clinici prospettici hanno comunque confermato che la depressione rappresenta un fattore di rischio per la riduzione della densità minerale ossea [26; 242; 243; 244; 245]. Molti fattori interagiscono nella relazione fra depressione, basso livello di densità minerale ossea ed aumentato rischio di frattura, tra questi importanti sono: l'attivazione del Sistema Nervoso Simpatico [29; 74; 245]; la disregolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene [246; 247]; l'iposecrezione di estrogeni e testosterone; il deficit di GH; l'incremento di interleuchine quali IL-1 ed IL-6 [248; 249; 250; 251; 252]. Molti di questi fattori sono peraltro gli stessi già indagati nella più generale relazione fra osso e cervello. Infine, anche alcune abitudini e stili di vita possono influire nel rapporto di bidirezionalità che lega la patologia osteoporotica e le fratture ad essa conseguenti ai disturbi depressivi, tra questi: il fumo; l'alcool; la mancata attività fisica; la malnutrizione; l'uso di specifici farmaci psicotropi [26; 253; 254; 255; 256; 257].

6. Malattia di Parkinson

Una recente review di Invernizzi et al. [258] ha mostrato che i pazienti affetti da malattia di Parkinson presentano un più alto rischio di fratture soprattutto a livello del femore e che queste fratture sono dovute all'alterazione dell'equilibrio, al disordine neurologico e al basso valore di densità minerale ossea. La ridotta attività motoria, numerosi fattori endocrini tra cui i livelli di GH, ACTH, cortisolo, prolattina e vitamina D oltre il tipo di terapia sono stati valutati come possibili meccanismi di collegamento tra le due patologie. Nello specifico l'immobilizzazione comporterebbe osteopenia sia attraverso un'azione non chiarita sul sistema nervoso centrale con riduzione dell'IGF-1 che comporta riduzione della proliferazione degli osteoblasti [259], sia attraverso l'induzione del riassorbimento osseo che determinando ipercalcemia causa inibizione dell'uno alfa idrossilazione della vitamina D a livello renale [260; 261]. I fattori endocrinologici quali la riduzione del GH, dell'ACTH e del cortisolo, confermerebbero la presenza di alterazioni ipotalamiche che potrebbero spiegare l'ipotensione ortostatica e post-prandiale molto frequenti nei soggetti affetti da malattia di Parkinson e responsabili di cadute e fratture [262]. Alcuni autori hanno

osservato anche una correlazione diretta tra l'aumento dei livelli sierici di osteocalcina (proteina della matrice ossea e indicatore di deficit organico di vitamina K) e ridotta densità minerale ossea a livello del femore, in donne anziane altrimenti sane e che la somministrazione di vitamina K2 a pazienti con malattia di Parkinson determinava un aumento della loro densità minerale ossea [263]. Come già elencato inoltre anche il deficit di vitamina D sembra giocare un ruolo fondamentale non solo nella patogenesi dell'osteoporosi ma anche in quella della malattia di Parkinson e di altre malattie che interessano il sistema nervoso centrale come la demenza di Alzheimer [260; 264; 265; 266; 267]. Un'ipotesi interessante riguardo ai meccanismi fisiopatologici che collegherebbero la perdita di massa ossea e la malattia di Parkinson (ed altre patologie neuropsichiatriche) è quella formulata da Newmark and Newmark [268]; secondo tale ipotesi il normale funzionamento delle cellule nervose dipenderebbe in parte dall'absorbimento di vitamina D dalla circolazione sanguigna e dalla sua attivazione locale ad opera di una specifica 1-alfa idrossilasi (citocromo P-450-27B-1). La vitamina D così attivata (calcitriolo) contribuirebbe poi al normale funzionamento cellulare, attraverso il legame con il suo recettore specifico VDR (vitamin D receptor) largamente presente in diverse zone del sistema nervoso centrale quali corteccia prefrontale, ippocampo, giro cingolato, talamo, ipotalamo e sostanza nigra [269]; anche la sostanza nigra quindi è influenzata da questi meccanismi strettamente connessi all'azione della vitamina D [268]. A confermare queste ipotesi, ci sono i risultati di alcuni studi condotti su topi che hanno dimostrato l'importanza della vitamina D e dei recettori VDR nei processi di sviluppo cerebrale, induzione della sintesi del fattore neurotropico delle cellule di glia, prevenzione dell'invecchiamento e crescita delle cellule nervose [270]. Non è comunque stato ancora spiegato se il deficit di vitamina D sia un fattore influenzante la genesi della malattia di Parkinson o sia piuttosto una sua conseguenza che contribuisce poi al mantenimento dei meccanismi fisiopatologici [265; 267]. In questo ambito risultano di grande interesse anche i fattori nutrizionali. La malnutrizione e il basso indice di massa corporea, frequenti nel Parkinson anche a causa della presenza di disfagia e ritardato svuotamento gastrico [271; 272] possono in parte spiegare la presenza di ipovitaminosi D, ma sono responsabili anche di altri deficit vitaminici quali quelli di folati e vitamina B12 che a loro volta determinano un aumento dei livelli sierici di omocisteina. L'iperomocisteinemia è ritenuta oggi un fattore di rischio per patologie cardio e cerebrovascolari ma alcuni studi la ritengono collegata anche ad un aumentato rischio di osteoporosi e fratture (per alterata formazione dei legami crociati tra le fibrille di collagene), oltre che ad una maggiore severità della malattia di Parkinson [273]. Un altro importante problema collegato all'aumentato rischio di fratture nei pazienti

con Parkinson è quello legato alle terapie farmacologiche utilizzate. Il trattamento con levodopa ad esempio è stato associato ad un aumentato rischio totale di fratture comprese quelle di femore se effettuato ad alte dosi. Una possibile spiegazione di questa correlazione è l'aumento aggiuntivo (oltre a quelli già provocati dalla malnutrizione) dei livelli sierici di omocisteina determinato da questo farmaco [274].

7. Demenza di Alzheimer

La malattia di Alzheimer ed altre forme di demenza sembrano essere collegate in qualche modo alla patologia osteoporotica come dimostrano numerosi studi sulle interessanti comorbilità fra tali patologie [275; 276; 277; 278; 279; 280]. La patogenesi multifattoriale di queste patologie comprende infatti meccanismi endocrinologici, genetici, ambientali, nutrizionali ma sembrano giocare un ruolo rilevante anche i processi infiammatori cronici e alcuni deficit ormonali [281; 282; 283]. Un recente lavoro [284], ha cercato di individuare la presenza di osteoporosi a livello subclinico nei pazienti affetti da demenza di Alzheimer o deterioramento cognitivo rispetto a controlli affetti da osteoporosi primaria non trattata ed altrimenti sani, attraverso lo studio delle concentrazioni plasmatiche di alcuni markers di rimodellamento osseo. Nello specifico sono stati analizzati l'osteocalcina come marker di sintesi e i frammenti C-terminali del collagene come marcatori di riassorbimento osseo; entrambi sono risultati aumentati tanto nei pazienti affetti da Alzheimer quanto in quelli affetti da osteoporosi. Questi risultati sono in accordo con quelli di precedenti studi che hanno dimostrato un'associazione tra la malattia di Alzheimer e la presenza di una ridotta densità di massa ossea dimostrata radiologicamente [275; 278; 285]. Un possibile collegamento fra le due patologie potrebbe essere indagato attraverso lo studio dei livelli plasmatici di osteoprotegerina; questa glicoproteina infatti non viene prodotta soltanto dagli osteoblasti, ma anche da cellule stromali e dentritiche e si ritrova in grandi quantità nel liquido cerebrospinale [286]. L'osteoprotegerina agisce come antagonista del recettore RANKL, prodotto principalmente dagli osteoblasti ma espresso anche a livello cerebrale [287] e di TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) espresso nel tessuto cerebrale di pazienti affetti da malattia di Alzheimer [288]. Oltre quindi la funzione antiriassorbitiva svolta a livello del tessuto osseo, l'osteoprotegerina potrebbe svolgere anche un'azione antiapoptotica a livello neurologico. Sono necessari comunque ulteriori studi e ricerche per chiarire il ruolo dell'osteoprotegerina nei processi patogenetici che determinerebbero comorbidità fra tali patologie.

Parte 3

1. Lo studio C.O.D.E.: i perchè dello studio

Il rimodellamento osseo è un processo complesso, regolato da numerosi fattori locali e sistemici; oltre a quelli già ben conosciuti (genetici, ormonali , legati allo stile di vita), negli ultimi decenni la ricerca scientifica si è orientata anche verso lo studio della regolazione nervosa dell'omeostasi ossea, scoprendo un vasto campo di correlazioni che collegano bidirezionalmente il tessuto osseo al Sistema Nervoso in un continuo dialogo tra i due organi, il cosidetto "bone-brain crosstalk" [8; 21]. Numerosi studi su modelli animali e trials clinici sull'uomo hanno permesso di identificare sistemi neuronali, neuropeptidi e neurotrasmettitori come componenti fondamentali della biologia neuroscheletrica. Di notevole interesse e sempre più analizzate sono inoltre le interazioni farmacologiche e le numerose patologie che rappresentano importanti punti di connessione fra osso e cervello e provvedono un vasto e affascinante campo di studio. In questo ambito, molta della letteratura scientifica si concentra nello studio dei meccanismi che collegano l'osteoporosi, una delle patologie degenerative più comuni nei paesi sviluppati, le fratture che ne rappresentano le principali e più temibili conseguenze ed alcuni disturbi neuropsichiatrici quali il delirium, le demenze e la depressione. Queste tre condizioni neuropsichiatriche in particolare, possono infatti essere presenti sia prima che a seguito dell'evento fratturativo e rappresentano una sfida importante in termini di mortalità e recupero funzionale dei pazienti con frattura di femore [289; 290]. Secondo le più recenti teorie quindi si possono annoverare tra i fattori di rischio di frattura correlati all'osteoporosi anche la depressione ed il decadimento cognitivo [291; 292]. Molti studi si concentrano sull'influenza del deficit cognitivo sull'out-come funzionale di pazienti anziani in seguito a frattura di femore, altri indagano l'impatto della combinazione di deterioramento cognitivo e sintomi depressivi o solo di quest'ultimi, ambito d'indagine che comunque resta ancora poco esplorato. Pochi autori si sono focalizzati invece, sulle variazioni dello status neuropsichico conseguente a frattura di femore nell'anziano [293; 294; 295]. L'esperienza clinica stessa suggerisce comunque che soprattutto nel soggetto anziano, in seguito a frattura femorale, insorge

uno stato neuropsichico caratterizzato da decadimento cognitivo e depressione, anche in assenza di disturbi preesistenti e che tale stato aumenta sempre la probabilità di un outcome avverso (declino dell'autonomia nelle attività di vita quotidiane, deficit di deambulazione permanente, necessità di assistenza continuativa, istituzionalizzazione, decesso). Nel soggetto anziano in particolare quindi, la correlazione fra osteoporosi, fratture e patologie neuropsichiatriche si presenta quanto mai chiara. Il soggetto anziano infatti è spesso un soggetto "fragile" e la definizione di "fragilità" comprende sia la maggior incidenza di patologia osteoporotica [296] e di tendenza alle cadute e fratture [297], sia la frequente presenza di declino cognitivo e disturbi depressivi, sia l'alto rischio di "dipendenza", istituzionalizzazione e/o morte; la "fragilità" nel senso geriatrico del termine rappresenta essa stessa quindi un esempio caratteristico di associazione fra patologie della sfera neuropsichiatrica e patologie ossee (Figura 1).

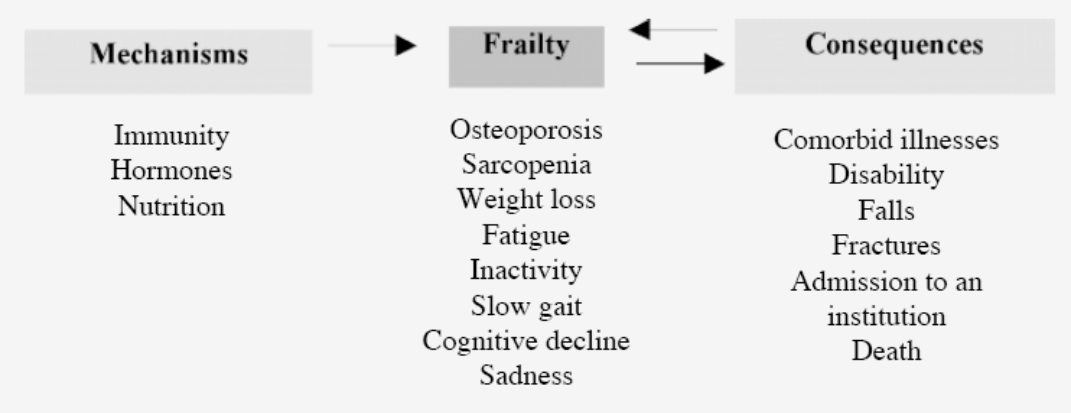

Figura 1 Caratteristiche cliniche della sindrome da fragilità.

Le correlazione fra osteoporosi, fratture e disturbi neuropsichiatrici ha quindi nel soggetto anziano fragile una particolare ragione d'essere che determina peraltro una maggiore frequenza del problema e rappresenta un esempio interessante di correlazione osso-cervello. Lo studio dei disturbi neuropsichiatrici nei soggetti anziani con frattura di femore e delle correlazioni fra osteoporosi, fratture, depressione, delirium e demenze ha costituito il background dal quale siamo partiti per creare la struttura ed il razionale dello studio C.O.D.E. (Connections between Outcome of Osteoporotic fractures, Depression, Delirium & Dementia in the Elderly).

2. C.O.D.E. STUDY (Connections between outcome of osteoporotic fractures, Depression, Delirium & Dementia in the Elderly): presentazione.

Lo studio C.O.D.E. è uno studio Epidemiologico Osservazionale Multicentrico per la valutazione dell'associazione tra depressione, deterioramento cognitivo, delirium e demenza, le fratture osteoporotiche del femore e gli esiti finali (in termini di outcomes funzionali, tasso di rifratture e mortalità) in soggetti ultrasessantacinquenni. La ricerca iniziata nel Gennaio 2012 presso il D.A.I. di Ortopedia, CTO, SOD Malattie del Metabolismo Minerale ed Osseo (Centro Coordinatore), si è estesa nell'Aprile 2012 all'Azienda Sanitaria di Firenze (Struttura Complessa di Ortogeriatria dell'Ospedale Santa Maria Annunziata e Struttura Operativa Semplice Salute Mentale Adulti, Firenze 1-4), diventando perciò studio bicentrico. Nel Luglio 2012 l'approvazione del Comitato Etico dell'Università degli Studi di Perugia ne ha permesso l'avvio anche presso il Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Istituto di Gerontologia e Geriatria dell'Azienda Ospedaliera di Perugia. Complessivamente quindi i centri coinvolti nello studio sono stati i seguenti: Azienda Ospedaliero-Universitaria di Careggi (Struttura Organizzativa Dipartimentale Malattie del Metabolismo Minerale ed Osseo; Centro Traumatologico Ortopedico); Azienda Sanitaria di Firenze (S.C. Ortogeriatria dell'Ospedale Santa Maria Annunziata; Struttura Operativa semplice Salute Mentale Adulti, Firenze 1-4); Azienda Ospedaliera di Perugia (Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Istituto di Gerontologia e Geriatria). Nel mese di Aprile 2013 è stato raggiunto il primo importante obiettivo enunciato nel progetto scientifico dello studio, cioè il raggiungimento di un numero di pazienti arruolati pari a 500 (precisamente sono stati arruolati 514 pazienti) entro il diciottesimo mese dall'inizio dello studio. Nel mese di maggio 2014 si è concluso anche il percorso di follow-up dei pazienti reclutati.

2.1. Obiettivi dello studio

1.Accertamento degli outcome funzionali nei pazienti con frattura femorale in presenza (esposti) o in assenza (non esposti) di sintomatologia depressiva, impoverimento cognitivo e delirium insorti dopo la frattura.

2.Valutazione della correlazione tra diagnosi di depressione maggiore, malattia di Parkinson e demenza precedenti la frattura e tendenza ad eventi di instabilità e cadute.

3.Contribuire con le informazioni ottenute, riguardo al collegamento osso-cervello, al miglioramento dei percorsi diagnostici e terapeutici dei pazienti fratturati di femore.

2.2. Arruolamento

In circa 16 mesi (Gennaio 2012-Aprile 2013) sono stati arruolati 514 pazienti consecutivi di età superiore ai 65 anni con frattura femorale (assimilabile a frattura da fragilità) afferenti ai reparti di Ortopedia/Ortogeriatria coinvolti nello studio. I pazienti sono stati tutti reclutati durante il ricovero (Tempo T0) nella fase post-chirurgica e nello specifico tra la I e la IV giornata dopo l'intervento di riduzione della frattura. In seguito i pazienti sono stati rivalutati con un programma di follow-up a 3, 6 e 12 mesi (Tempi T1, T2, T3) dall'evento fratturativo.

2.3. Materiali e Metodi

2.3.1. Criteri di inclusione

Sono stati inclusi nello studio tutti i soggetti con età superiore a 65 anni e con frattura femorale da fragilità che hanno firmato il consenso informato.

2.3.2. Criteri di esclusione

Sono stati esclusi i pazienti con pregressa diagnosi (rilievo anamnestico) di demenza grave (corrispondente a Mini Mental State Examination con score < 10) associata a grave deficit funzionale (grave difficoltà di deambulazione con paziente in poltrona per la maggior parte della giornata o paziente allettato). Sono stati esclusi inoltre i pazienti con: fratture patologiche di eziologia neoplastica; revisioni di protesi femorali; fratture incorse per incidenti stradali o incidenti sul lavoro (presunto trauma ad alta energia) o violenza o autolesionismo; diagnosi di SLA, distrofia muscolare, corea di Huntington, Sclerosi Multipla; neoplasia con aspettativa di vita inferiore a 6 mesi; trauma cranico concomitante alla frattura; dipendenza da alcool ed etilismo cronico; problemi di udito e/o vista gravi. Infine sono stati anche esclusi i pazienti poco collaboranti in assenza di care-giver ed i

pazienti con rifrattura di femore al momento dell'arruolamento o occorsa durante il follow-up.

2.3.3. Procedura dello studio e breve descrizione degli strumenti di valutazione

Durante il ricovero ospedaliero (T0) è stata effettuata una valutazione anamnestica, clinica e funzionale utilizzando i seguenti strumenti:

1) Form Anamnestico per la raccolta di: dati socio-abitativi (condizione abitativa), dati clinici (data della caduta, tempo intercorso tra caduta e arrivo dei primi soccorsi, tempo intercorso tra caduta ed intervento chirurgico, tipo di frattura, diagnosi clinica di patologie neurodegenerative, comorbilità, incontinenza urinaria, farmaci assunti con regolarità a domicilio), terapia antidolorifica assunta durante la degenza, questionari sulla capacità di camminare prima della frattura, sulla paura di cadere, sulle eventuali cadute precedenti ed intervista WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index) sul dolore di anca e ginocchia e l'impedimento funzionale e motorio derivante [298].
2) M.I.N.I. Plus (Mini International Neuropsichiatric Interview), per diagnosticare una Depressione Maggiore attuale o in anamnesi insorta precedentemente all'evento fratturativo.
3) GDS (Geriatric Depression Scale-30items), per la valutazione della sintomatologia depressiva attuale. Uno score ≥10, in un range compreso tra 0 e 30, indica la presenza di sintomi depressivi [299].
4) MMSE (Mini Mental Scale Examination), per la valutazione dello stato cognitivo. Uno score ≤24, in un range compreso tra 0 e 30 indica la presenza di sintomi di impoverimento cognitivo. Il punteggio è stato corretto per età e scolarità.
5) CAM (Confusion Assessment Method), per l'individuazione dello stato di delirium durante la degenza.
6) Personal Mastery, singolo item per valutare la personale aspettativa di recupero del paziente come indicatore di personalità.
7) VAS (Visual Analogic Scale), per la misurazione del dolore percepito; uno score >3, in un range compreso tra 0 e 10, è indice di un dolore da trattare farmacologicamente [300].

8) Barthel Index, per la valutazione della capacità di svolgere le attività di vita quotidiana; in un range compreso tra 0 e 100, uno score >80 indica un paziente con un grado sufficiente di autonomia personale di base [301].
9) CAS (Cumulated Ambulation Score), per la valutazione del recupero funzionale precoce in 1^a-2^a-3^a giornata post-operatoria; uno score ≥6 in un range compreso tra 0 e 18, indica un grado sufficiente di recupero funzionale [302].
10) Indice di Comorbilità di Charlson, per valutare la gravità della concomitante presenza di più patologie; un indice ≥ 4 indica una comorbilità importante [303].

I pazienti arruolati sono stati poi rivalutati a livello clinico e funzionale nel follow-up che si è strutturato in tre appuntamenti a distanza di 3 (T1), 6 (T2) e 12 (T3) mesi dall'evento fratturativo. Durante gli incontri che si sono svolti presso le strutture adibite dei centri partecipanti o presso il domicilio dei pazienti (previo appuntamento a seguito di colloquio telefonico) sono stati somministrati di nuovo questi strumenti:

1) MMSE; GDS; Barthel Index; Charlson Index (già utilizzati durante l'arruolamento al tempo T0);
2) Form Anamnestico per la raccolta dei dati sulle variazioni socio-abitative, cliniche funzionali occorse nei mesi successivi al ricovero ospedaliero. In particolare è stato valutato se il paziente stava effettuando terapia con Vitamina D e/o con farmaci antifratturativi, se stava svolgendo terapia riabilitativa, se aveva avuto altri ricoveri e/o se erano sopraggiunte ulteriori nuove patologie. Sono stati inoltre valutati: dati socio-abitativi (condizioni abitative), eventuali variazioni dei dati clinici (diagnosi di patologie neurodegenerative, comorbilità, incontinenza urinaria, farmaci assunti a domicilio), questionari sulla capacità di camminare, sulla paura di cadere, sulle cadute intercorse e di nuovo l'intervista WOMAC sul dolore di anca e ginocchia e sull'impedimento funzionale e motorio che ne derivano [298];
3) SPPB (Short Physical Performance Battery) per la valutazione del recupero funzionale non precoce, dalla frattura. La SPPB si articola in tre piccole prove: Walking test four meters; five folds repeated chair stands; FICSIT test. Un punteggio globale > 6, in un range compreso tra 0 e 12 indica un livello sufficiente di recupero funzionale [304].

Una descrizione più accurata dei test utilizzati è riportata in Appendice.

2.3.4. Analisi statistiche

Le analisi statistiche dei dati raccolti sono state effettuate utilizzando SPSS Statistics 17.0. Sono state eseguite analisi descrittive di frequenza, medie e DS, Crosstabs con Pearson Chi-Square e t di Student.

3. Risultati

Il totale del campione in studio è di 514 pazienti ultrassessantacinquenni ricoverati per prima frattura femorale nei reparti di ortopedia e ortogeriatria coinvolti. L'arruolamento avvenuto consecutivamente in circa 16 mesi (Gennaio 2012- Aprile 2013) si è svolto nella fase post-chirurgica della degenza e nello specifico in un periodo compreso fra la I e la IV giornata (tempo T0). I pazienti che al momento della valutazione presentavano Delirium sono stati esaminati dopo la scomparsa dei sintomi dello stato confusionale acuto per motivi etici e per non alterare le valutazioni clinico-anamnestiche e i test che sarebbero stati effettuati.

Per quanto riguarda il tipo di frattura riportato, 264 (51,4%) hanno riportato frattura di femore pertrocanterica, 238 pazienti (46,3%) frattura del collo femorale e 12 pazienti (2,3%) frattura diafisaria. L'intervento chirurgico è stato eseguito entro 48 ore dalla caduta su 289 pazienti (56,2%) ed oltre le 48 ore su 225 pazienti (43,8%).

La fase di follow-up articolata in un programma di tre appuntamenti a 3 (T1), 6(T2) e 12 (T3) mesi dall'evento fratturativo è stata completata su 209 pazienti (40,7%), mentre 328 pazienti (63,8%) sono stati rivalutati almeno una volta su tre. Nello specifico, a 3 mesi dall'evento fratturativo (tempo T1) sono stati rivalutati 258 pazienti (50,2%); a 6 mesi (tempo T2) sono stati rivalutati 289 pazienti (56,2%); a 12 mesi (tempo T3) sono stati rivalutati 266 pazienti (51,8%).

A 12 mesi dall'evento fratturativo, sul totale dei pazienti reclutati, 154 soggetti (29,9%) sono risultati non disponibili per la valutazione; tra questi 104 (20,2%) sono risultati non reperibili, 41 (7,9%) hanno rifiutato la valutazione e 9 (1,7%) sono risultati non disponibili per l'occorrenza di alcune complicanze mediche. Tutti questi pazienti sono stati pertanto ricercati telefonicamente e sottoposti direttamente o indirettamente (tramite contatto con caregiver/familiare o tramite contatto con medico di medicina generale) ad un questionario telefonico per accertarne la sopravvivenza, l'eventuale rifrattura, la situazione sociale ed il grado di autonomia. In questo modo è stato possibile valutare

l'entità vera dei decessi a 12 mesi ed avere alcune informazioni sul recupero funzionale e sul livello di autonomia dei pazienti precedentemente non disponibili.

3.1. Caratteristiche pre-frattura del campione in studio

3.1.1. Caratteristiche socio-demografiche

Lo studio C.O.D.E. ha coinvolto 514 pazienti con prima frattura di femore di cui 398 (77,4%) sono risultati di sesso femminile e 116 (22,6%) di sesso maschile. L'età media rilevata è stata di 83,1±7,26 anni. Dividendo il campione per fasce di età, è stato osservato che 138 soggetti (26,8%) avevano un'età compresa tra 65 e 79 anni, 227 soggetti (53,9%) un'età compresa tra 80 e 89 anni e 99 soggetti (19,3%) un'età uguale o superiore a 90 anni. La grande maggioranza dei soggetti in studio, cioè 427 pazienti (83,1%) hanno avuto un basso livello di istruzione (inferiore a 8 anni). Nello specifico, 341 soggetti (66,3%) avevano conseguito la licenza elementare, 86 soggetti (16,7%) il diploma di scuola media inferiore, 57 soggetti (11,1%) il diploma di scuola media superiore e solo 30 soggetti (5,8%) la laurea. I dati relativi alla scolarità sono chiaramente compatibili con l'età del campione studiato in quanto costituito prevalentemente da "grandi" anziani. Per quanto riguarda la situazione socio-familiare prima dell'evento fratturativo, queste sono state le distribuzioni per categoria della popolazione studiata: 174 pazienti (33,9%) vivevano da soli; 250 pazienti (48,6%) vivevano con familiari; 63 pazienti (12,3%) avevano l'assistenza domiciliare continua della badante; 27 pazienti (5,3%) vivevano in RSA.

3.1.2. Caratteristiche cliniche e funzionali

Prima dell'evento fratturativo, 84 pazienti (16,2%) presentavano già un decadimento cognitivo, 120 pazienti (23,3%) soffrivano già di depressione maggiore ricorrente e 38 pazienti (7,3%) avevano un Parkinsonismo. Riguardo al livello di autonomia precedente il trauma indagato tramite l'Indice di Barthel, è stato rilevato che: 314 soggetti (61,1%) avevano un livello ottimale di autonomia (Barthel Index>80); 170 pazienti (33,1%) presentavano una disabilità da lieve a moderata; 30 pazienti (5,8%) presentavano disabilità grave con scarso livello di autonomia. Con riferimento al totale del campione in studio la media (+DS) dell'Indice di Barthel pre-frattura è risultata uguale a 82,61±18,88. Prima

dell'evento fratturativo in 54 pazienti (10,5%) è stata riscontrata una comorbilità elevata (Indice di Comorbilità di Charlson ≥ 4), indice di rilevante impegno clinico. La media (+DS) dell'Indice di Comorbilità pre-frattura riferita a tutto il campione in studio è risultata uguale a 18,3±1,35. Ben 81 soggetti (15,8%) soffrivano di incontinenza urinaria prima della frattura e 135 pazienti (26,3%) lamentavano episodi di incontinenza (incontinenza occasionale). Per quanto riguarda la capacità di camminare prima della caduta è stato rilevato che: 296 pazienti (57,6%) deambulavano senza difficoltà; 212 pazienti (41,2%) deambulavano con l'utilizzo di ausili (nella maggior parte dei casi con il bastone); 6 pazienti (1,2%) non erano in grado di camminare. Il 40,7% dei soggetti (209 pz.) aveva paura di cadere mentre camminava, il 44,7% (230 pz.) era già caduto nei 12 mesi precedenti l'evento in studio e l'8,8% (44 pz.) aveva anche riportato fratture in altri distretti corporei. L'indagine sull'evento fratturativo non ha inoltre trascurato lo studio della dinamica con cui quest'ultimo si è determinato ed è pertanto stato osservato che: nel 45,6% dei casi (in 185 pazienti) la caduta era avvenuta al mattino; nel 39,7% dei casi (in 161 pazienti) la caduta era avvenuta nel pomeriggio; nel 40,3% dei casi la caduta era avvenuta durante la deambulazione del paziente; nel 19,2% dei casi mentre il paziente era fermo; nel 16,5% mentre il paziente si stava alzando dalla sedia; nel 16,5%era avvenuta inciampando in qualcosa. Interessante è stata anche l'indagine sulla sensazione provata durante la caduta. Nel 32,5% dei casi i pazienti hanno descritto una sensazione di instabilità; nel 18,8% hanno ricordato di aver urtato un oggetto; nel 14,4% hanno ricordato di essere scivolati; solo il 4,9% ha lamentato capogiro o lipotimia. Di rilievo è il dato in base al quale ben il 29,3% dei pazienti non ricorda o non sa spiegare l'accaduto; potremmo presupporre una perdita di coscienza o uno stato confusionale. E' stato inoltre osservato che i pazienti assumevano già prima del ricovero per frattura femorale diversi farmaci; ben 6 o più farmaci nel 24,7% dei casi (127 pz.). Pochi pazienti erano già in trattamento preventivo con Calcio + Vitamina D (43 pz; 8,6%) o con farmaci antifratturativi (31 pz; 6%). Infine è stato rilevato che il valore medio (+DS) ottenuto relativamente ai punteggi WOMAC (scala che indaga il dolore artrosico di anca e ginocchio, la rigidità e l'impedimento funzionale che ne conseguono) era uguale a 22,14±18,80 con un range di riferimento compreso tra 0 e 98 (0 è riferibile all'assenza di dolore/assenza di impedimento e 100 è riferibile al massimo dolore/totale impedimento). Di grande interesse perché in linea con i dati di letteratura è inoltre il dato relativo all'insorgenza di Delirium durante il ricovero nel campione di studio; secondo i nostri risultati il 27,1% pari a 140 pazienti ha sperimentato uno stato confusionale acuto durante la degenza; la letteratura scientifica sull'argomento descrive una prevalenza di Delirium a seguito di eventi fratturativi compresa tra il 16% ed il 62% [305]. Secondo le più

recenti linee guida il trattamento precoce del dolore nella fase post-chirurgica rappresenta un determinante importante dell'iter clinico e del recupero psicofisico dei pazienti. Nel nostro studio il livello del dolore percepito è stato indagato con la scala VAS e l'indagine ha mostrato come nel 62,8% dei casi (323 pz.) sia stato ottenuto in tale scala, un punteggio superiore a 3 che indica un livello di dolore da trattare con farmaci antalgici. Infine, nonostante la percentuale rilevante di pazienti con umore deflesso, il singolo item che indagava l'atteggiamento dei pazienti verso la possibilità personale di recupero (Personal Mastery) ha evidenziato risultati positivi nel 70,2% dei casi (361 pz.).

3.2. Insorgenza di disturbi neuropsichiatrici a seguito della frattura di femore

L'analisi del campione in studio ha permesso di osservare l'insorgenza di impoverimento cognitivo nel 41% (211 pz.) dei pazienti e l'insorgenza di sintomatologia depressiva nel 21,4% (110 pz.) dei pazienti. Mettendo a confronto le percentuali suddette con quelle relative rispettivamente alla presenza di una diagnosi di demenza (16,2%) e depressione maggiore (23,3%) antecedenti all'evento fratturativo, possiamo notare come l'insorgenza di questi disturbi neuropsichiatrici sia rilevante a seguito della frattura e del ricovero ospedaliero. Questi dati risultano particolarmente interessanti perchè le percentuali relative alla nuova insorgenza di disturbi neuropsichiatrici post-frattura sono state calcolate sul campione in studio dopo aver escluso i pazienti con precedente diagnosi di demenza e depressione (Figura 2).

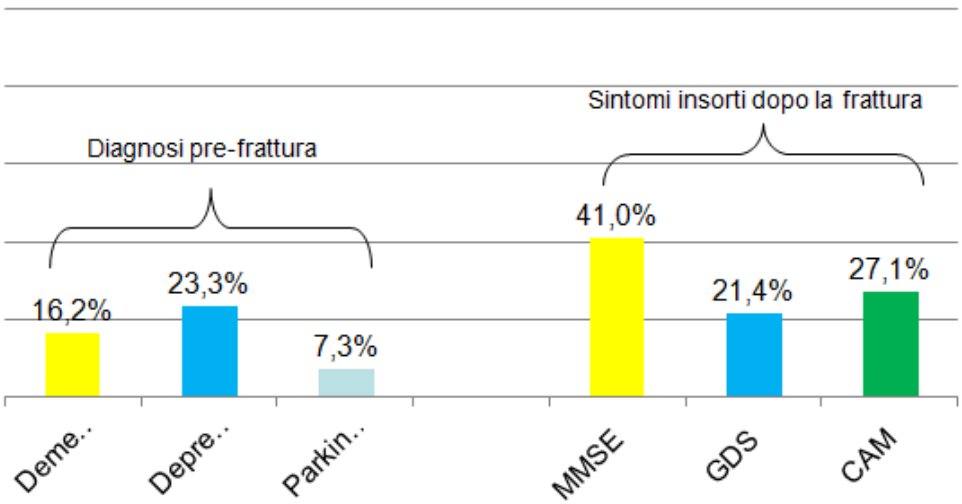

Figura 2 Disturbi Neuropsichiatrici in pazienti con Frattura di Femore. MMSE: Impoverimento Cognitivo misurato con Mini Mental State Examination; GDS: Sintomi Depressivi misurati con Geriatric Depression Scale; CAM: Delirium valutato con Confusion Assessment Method

I risultati ottenuti sono in linea con la recente letteratura che descrive l'insorgenza e l'aumento di sintomi depressivi e disturbi della sfera cognitiva a seguito della frattura di femore [290; 306]. La prevalenza di una sindrome depressiva nei pazienti anziani dopo aver riportato una frattura del femore e a seguito della degenza ospedaliera oscilla infatti tra il 9% ed il 47% [290]. Nei soggetti anziani fratturati inoltre la demenza e la depressione sono spesso correlate e di difficile distinzione l'una dall'altra. Molti sintomi della depressione coincidono infatti con quelli dei disturbi demenziali e spesso l'insorgenza di una condizione anticipa l'altra. Nei casi in cui vengano contemporaneamente soddisfatti i criteri diagnostici del DSM-IV-TR per depressione e demenza si può addirittura porre diagnosi di pseudodemenza depressiva [307]. Alcuni autori inoltre hanno recentemente individuato delle peculiarità nel quadro depressivo che insorge nell'anziano a seguito della frattura di femore, tanto da poter delineare una specifica condizione morbosa. Questa particolare tipologia di disturbo neuropsicologico avrebbe la caratteristica di insorgere entro la 10ª settimana dall'evento fratturativo, più facilmente nelle prime due settimane, e si manifesterebbe con sintomi quali: apatia; ansia; dolore; diminuzione di iniziativa, di interessi e della motivazione [290; 293]. Di particolare interesse inoltre è il dato relativo all'insorgenza di delirium; nel nostro campione di studio infatti il 27,1% (140 pz.) dei pazienti ha presentato uno stato confusionale acuto durante il ricovero ospedaliero. La percentuale risulta anche in questo caso all'interno del range medio riportato in letteratura che si attesta fra il 16% ed il 62% [305]. Il delirium rappresenta il più studiato disordine neuropsichiatrico nei pazienti che hanno subito una frattura di femore ed è stato

associato all'aumento di morbilità e mortalità, oltre che alla maggiore lunghezza del tempo di degenza ospedaliera e all'aumento del rischio di istituzionalizzazione [295].

3.3. Andamento osservato dei disturbi neuropsichiatrici

Lo studio C.O.D.E. ha previsto dopo la fase di arruolamento (tempo T0), una fase di follow-up articolata in 3 incontri a distanza di 3 (T1), 6(T2) e 12 (T3) mesi di distanza dall'evento fratturativo. Dei 514 pazienti in studio, 258 hanno effettuato il follow-up a 3 mesi (T1), 289 il follow-up a 6 mesi (T2) e 266 il follow-up a 12 mesi (T3). I numerosi dati raccolti mettono in luce una popolazione caratterizzata da "fragilità" in quanto già caratterizzata da un non sufficiente livello di autonomia (40% dei casi), con un'elevata tendenza alle cadute (precedenti cadute nel 44,7% dei casi), incontinenza urinaria (15,8% dei casi) e difficoltà di deambulazione (cammino con ausilio nel 41,2% dei casi). In questo particolare contesto si inserisce inoltre l'aumento di insorgenza dei disturbi neuropsichiatrici ed il loro andamento clinico nel tempo.

Prendendo in considerazione le scale utilizzate per la valutazione dello stato cognitivo e di quello psicologico e nello specifico MMSE e GDS e mettendone a confronto le medie dei punteggi ottenuti dai pazienti nei vari tempi di osservazione e cioè al tempo T0, T1, T2, T3, possiamo osservare come nel primo caso (scala MMSE) tali punteggi tendano ad elevarsi successivamente in modo statisticamente significativo (T0 24,56; T1 25,75; T2 26,6; T3 26,8; $p<0,01$) indicando un graduale miglioramento nella sintomatologia cognitiva del campione, mentre nel secondo caso (scala GDS) dopo un peggioramento netto della gravità dei sintomi depressivi nei primi 3 mesi (T0 6,22; T1 8,5), vi sia una tendenza ad un "relativo" miglioramento osservato a 6 (T2 7,23) e 12 mesi (T3 7,38; $p<0.01$). Si può parlare di miglioramento "relativo" perchè le medie dei punteggi ottenuti nella scala GDS al tempo T2 e T3 pur migliorando rispetto a quelle del tempo T1 rimangono comunque sempre più elevate di quelle inizialmente rilevate al tempo T0 (Figura 3).

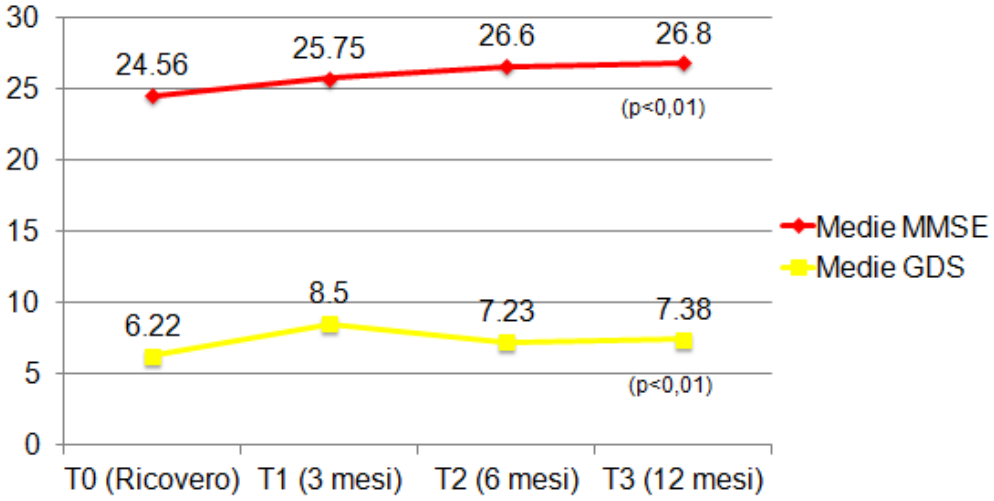

Figura 3 Sintomi neuropsichiatrici follow-up a 3, 6, 12 mesi. MMSE: Mini Mental State Examination; GDS: Geriatric Depression Scale

Questo interessante trend si può forse meglio comprendere mettendo a confronto le percentuali relative alla positività ai test suddetti (MMSE e GDS), ad ogni tempo di osservazione (T0, T1, T2, T3) e calcolate sul campione dopo aver escluso i pazienti con precedenti diagnosi di demenza e depressione; possiamo notare infatti come nel caso della scala MMSE ci sia un graduale miglioramento nel tempo (T0 41%; T1 25,2%; T2 17,3%; T3 12,5%) mentre nel caso della scala GDS dopo il picco di crescita riscontrato a livello del primo follow-up ci sia un trend di riduzione che si attesta però sempre su valori maggiori rispetto a quelli iniziali relativi al tempo T0 (T0 21,4%; T1 36,6%; T2 28,2%; T3 31,3%). La figura di seguito (Figura 4) rappresenta schematicamente l'andamento descritto.

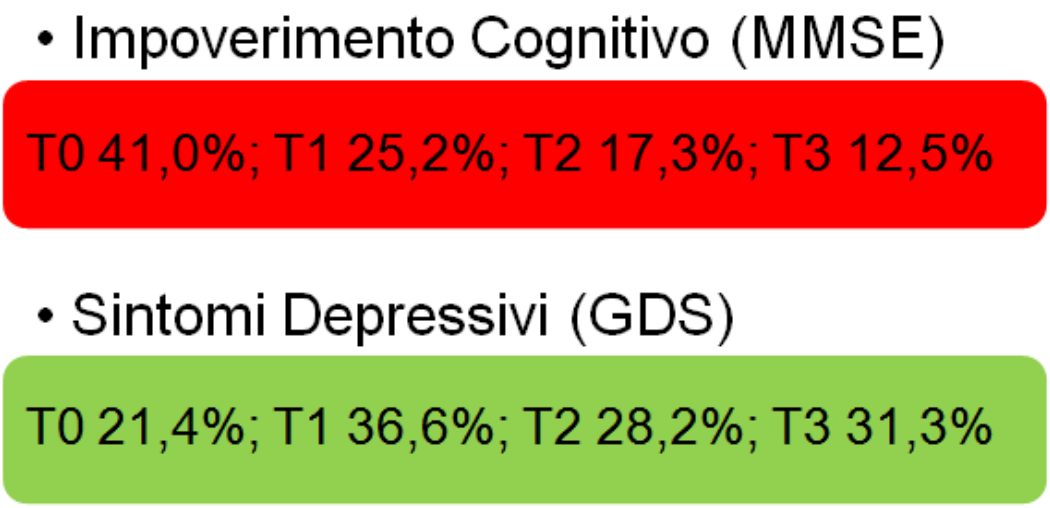

Figura 4 Follow-up 3 mesi (T1), 6 mesi (T2) e 12 mesi (T3)

In un'analisi collaterale di verifica dei dati, abbiamo suddiviso il campione in studio in 4 gruppi: nel primo gruppo sono stati inseriti i pazienti che non presentavano nessun tipo di disturbo psichiatrico, nel secondo gruppo i pazienti affetti solo da impoverimento cognitivo, nel terzo gruppo i pazienti che presentavano solo sintomi depressivi e nel quarto gruppo i pazienti che presentavano entrambe le sintomatologie; anche in questo caso l'impoverimento cognitivo mostra un trend di miglioramento nel periodo di osservazione (12 mesi), mentre la sintomatologia depressiva presenta al contempo un trend in peggioramento. I dati riscontrati suggeriscono quindi che, mentre la prevalenza della sintomatologia depressiva aumenta dopo l'evento fratturativo ed il ricovero ospedaliero, assestandosi su percentuali abbastanza elevate, la prevalenza di impoverimento cognitivo è maggiore durante il ricovero rispetto a quelle riscontrate nei 12 mesi successivi.

I risultati ottenuti sono di nuovo concordi con la recente letteratura che mette in evidenza l'incremento dei sintomi depressivi e dei disturbi cognitivi a seguito della frattura di femore [290; 306]. Il dato relativo al decremento nel tempo delle prevalenze di impoverimento cognitivo, non trova invece riscontro nella letteratura di riferimento. Interessante sarebbe capire il motivo che ha determinato tali andamenti; secondo le nostre osservazioni l'evento Delirium potrebbe avere un ruolo importante. Il delirium inteso infatti come evento acuto transitorio e scompenso reversibile dell'equilibrio omeostatico cerebrale potrebbe aver influenzato l'assetto neuro-psicologico dei pazienti anche nei 12 mesi successivi alla frattura.

3.4. Influenza dei disturbi neuropsichiatrici sul recupero funzionale

I pazienti che sono stati arruolati nello studio ed inseriti nel programma di follow-up, sono stati valutati a livello clinico-funzionale come già descritto, a 3 (T1), 6(T2) e 12 (T3) mesi di distanza dall'evento fratturativo. Il livello di autonomia funzionale riacquistato dai pazienti e la capacità di svolgimento delle attività di vita quotidiana sono stati misurati utilizzando l'Indice di Barthel (BI). Il Barthel Index è infatti un test costituito da 10 item che indagano l'autonomia del soggetto nello svolgimento di attività quali alimentarsi, fare il bagno, curare la propria igiene personale, controllare gli sfinteri, trasferirsi nel bagno, trasferirsi dalla sedia al letto e viceversa, deambulare e salire le scale. Il cut-off stabilito per considerare un livello di autonomia buono è uguale a 80 all'interno di un range di punteggio compreso fra 0 e 100 [301]. Per valutare se la presenza di sintomatologia depressiva, di impoverimento cognitivo o l'insorgenza di delirium durante la degenza potesse in qualche modo influenzare il recupero dell'autonomia funzionale, abbiamo calcolato le medie dei punteggi ottenuti nell'Indice di Barthel dai pazienti che presentavano tali disturbi (ovviamente prendendo in considerazione un disturbo alla volta) e le abbiamo confrontate con quelle ottenute dai pazienti che invece non li avevano sviluppati. Questo confronto fra medie è stato eseguito per ogni tempo di Follow-up e cioè al tempo T1, T2 e T3.

Nel primo grafico di Figura 5 sono state inserite le medie dei punteggi ottenute al Barthel Index dal gruppo dei pazienti "depressi" e dal gruppo dei non depressi rispettivamente al tempo T1, T2 e T3. I pazienti inseriti nel gruppo depressi sono quelli che avevano ottenuto un punteggio nella scala GDS superiore a 10, quelli inseriti nel gruppo "non depressi" sono quelli che avevano invece ottenuto punteggio inferiore o uguale a 10. Possiamo pertanto osservare come le medie dei punteggi ottenuti dal primo gruppo (depressi) siano inferiori a quelle ottenute dal secondo gruppo (non depressi) e che le differenze fra tali medie siano statisticamente significative ad ogni tempo di osservazione (T1,$t=5,45$; T2, $t=3,38$; T3, $t=3,41$; $p<0,01$).

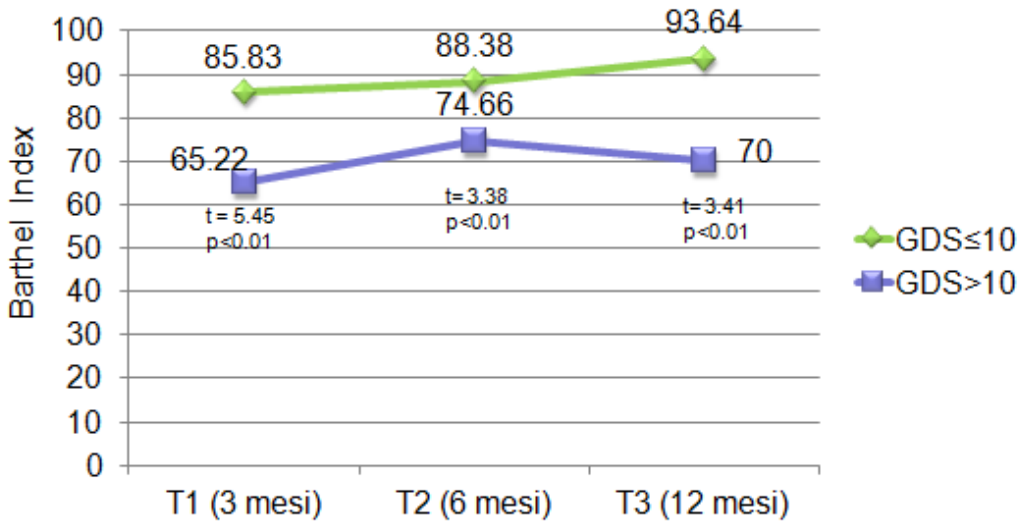

Figura 5 Grado di autonomia e sintomi depressivi. GDS: Presenza di sintomi depressivi per punteggio > di 10; Barthel Index: valuta il grado di autonomia nello svolgimento di attività quotidiane, valore = 0 completamente dipendente; valore = 100 totalmente autonomo.

Allo stesso modo abbiamo calcolato le medie dei punteggi ottenuti nell'Indice di Barthel dai pazienti che avevano presentato impoverimento cognitivo e le abbiamo di nuovo confrontate con quelle dei pazienti che non lo avevano presentato. I pazienti con impoverimento cognitivo sono coloro che valutati con la scala MMSE avevano ottenuto un punteggio inferiore a 25, mentre quelli che avevano ottenuto un punteggio superiore o uguale a 25 sono pazienti con un sufficiente o buon livello cognitivo (Figura 6).

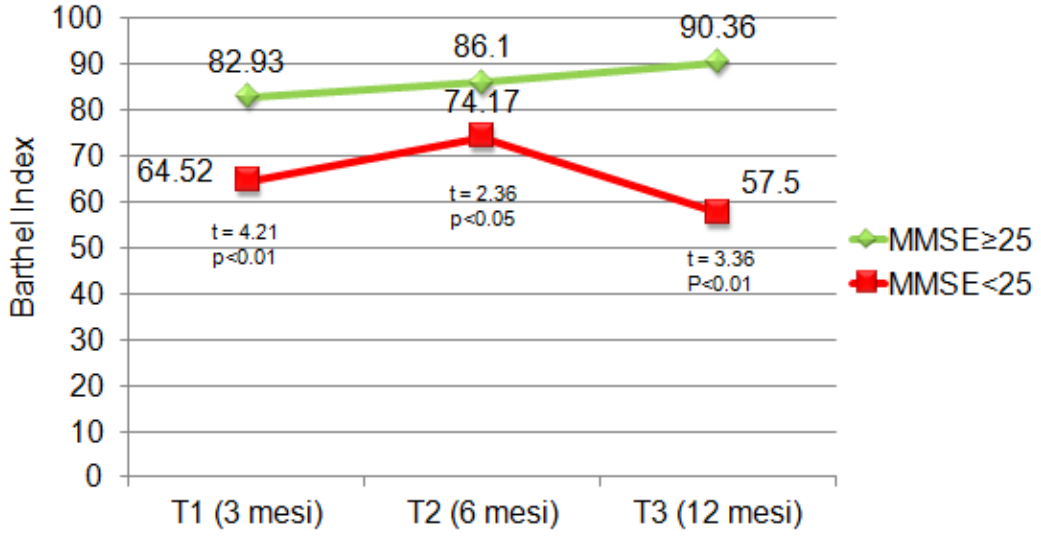

Figura 6 Grado di autonomia e impoverimento cognitivo. MMSE: Presenza di impoverimento cognitivo per punteggio < 25; Barthel Index: valuta il grado di autonomia nello svolgimento di attività quotidiane, valore = 0 completamente dipendente; valore = 100 totalmente autonomo.

Anche in questo caso l'osservazione del grafico che riporta il confronto fra tali medie ad ogni punto di osservazione e cioè a 3 (T1), 6 (T2) e 12 (T3) mesi di distanza dalla frattura, ci permette di affermare che i pazienti che hanno presentato sintomi di impoverimento cognitivo a seguito della frattura, mostrano un livello di autonomia nel tempo sempre inferiore a quello dei pazienti che non hanno sviluppato tali sintomi. Le medie dei punteggi Barthel ottenuti dai soggetti con sintomi di decadimento cognitivo si presentano infatti inferiori a quelle dei punteggi dei pazienti senza sintomi di decadimento cognitivo e questo risulta vero e con differenza fra medie statisticamente significativa sia al tempo T1 (t=4,21; p<0,01), che al tempo T2 (t=2,36; p<0,05), che al tempo T3 (t=3,36; p<0,01).

Lo stesso trend si rileva anche mettendo a confronto le medie dei punteggi Barthel ottenuti dai pazienti che avevano sviluppato uno stato confusionale acuto durante la degenza con quelle dei punteggi ottenuti dai pazienti negativi per tale evento. Lo stato confusionale acuto è stato valutato tramite il Confusion Assessment Method (CAM), test per la valutazione della presenza di stati di Delirium. Il grafico che descrive il confronto ai tempi T1, T2 e T3, fra le medie dei punteggi Barthel dei soggetti con CAM positiva e soggetti con CAM negativa, indica valori inferiori per i primi rispetto ai secondi, ma in questo caso la differenza fra medie risulta statisticamente significativa solo al tempo T1

(t=4,37; p<0,01) e al tempo T2 (t=3,05; p<0,01) e cioè a 3 e 6 mesi di distanza dall'evento frattura (Figura 7).

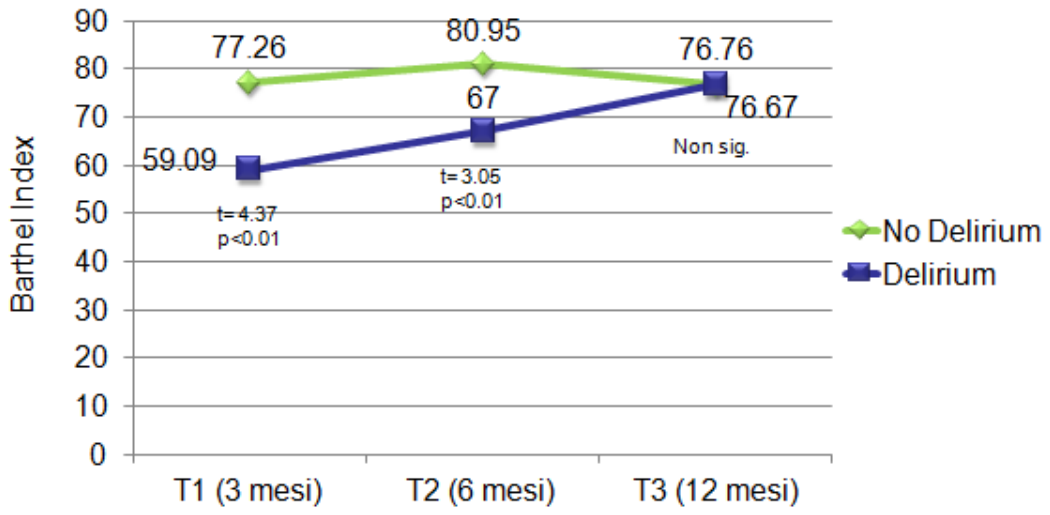

Figura 7 Grado di autonomia e delirium post-frattura. Il Delirium è stato valutato con Confusion Assessment Method, test per la valutazione della presenza di stato confusionale acuto. Barthel Index: valuta il grado di autonomia nello svolgimento di attività quotidiane, valore = 0 completamente dipendente; valore = 100 totalmente autonomo.

Possiamo osservare quindi come anche il Delirium interferisca sul recupero del grado di autonomia a seguito di una frattura del femore e che i pazienti che hanno sviluppato uno stato di confusione mentale presentino poi un livello di recupero funzionale significativamente peggiore fino a 6 mesi dopo la frattura.

I risultati sono ancora conformi alla letteratura scientifica che suggerisce come i disturbi cognitivi ed i sintomi depressivi giochino un ruolo importante sul recupero del livello di autonomia dei pazienti fratturati [293; 306].

3.5. Influenza dei disturbi neuropsichiatrici sul recupero motorio precoce

Il recupero motorio precoce dei pazienti a seguito dell'intervento di riduzione di frattura femorale e cioè il recupero in I, II e III giornata post-operatoria è stato valutato tramite il Cumulated Ambulation Score (CAS). Durante la degenza infatti il personale fisioterapico ha seguito il paziente fratturato lavorando sulla mobilità passiva ed attiva e stimolando

l'abilità nello svolgimento di tre specifiche funzioni: entrare ed uscire dal letto; sedersi e rialzarsi da una sedia; camminare con adeguato sostegno. Queste tre funzioni base sono quelle indagate specificatamente dal Cumulated Ambulation Score e rappresentano ciò che si intende per recupero motorio precoce e risposta alla mobilizzazione post-operatoria. Il Cumulated Ambulation Score è d'altronde lo strumento più validato per lo studio del processo di recupero precoce ed in letteratura è stato individuato un cut-off uguale a 6 come indicatore di scarso o sufficiente recupero.

L'influenza dei disturbi neuropsichiatrici studiati e nello specifico di sintomi depressivi, impoverimento cognitivo e delirium sul recupero motorio precoce è stata analizzata mettendo di nuovo a confronto le medie dei punteggi ottenuti nel Cumulated Ambulation Score (CAS) dai soggetti rispettivamente con e senza sintomi depressivi, con e senza sintomi di impoverimento cognitivo e che avevano o meno sviluppato uno stato di delirium. Anche nei casi suddetti i valori ottenuti dai soggetti con disturbi della sfera neuropsichiatrica sono risultati inferiori a quelli dei pazienti che non presentavano tali disturbi, ma le differenze fra medie sono risultate statisticamente significative solo nel caso del confronto fra soggetti depressi (GDS>10) e soggetti non depressi (GDS≤10) (t=2,33; p<0,02) (Figura 8).

	GDS≤10	GDS>10	t	Sig.
CAS (media+DS)	6.63±3.37	5.39±3.57	2.33	**0.020**

	MMSE≥25	MMSE<25	t	Sig.
CAS (media+DS)	6.60±3.46	5.97±3.41	1.38	0.16

	CAM -	CAM +	t	Sig.
CAS (media+DS)	6.19±3,41	5.55±2.78	-1.68	0.09

Figura 8 Recupero funzionale precoce (CAS) e sintomi neuropsichiatrici. CAS: Cumulated Ambulation Score. Valuta il recupero funzionale nei giorni seguenti l'intervento chirurgico di riduzione di frattura femorale. Il punteggio va da 0 = nessun recupero a 18 = massimo recupero.

In questa analisi quindi i disturbi dell'umore sembrano incidere maggiormente sul recupero motorio precoce rispetto ai disturbi cognitivi. In letteratura viene riportata l'importanza clinica sia dei sintomi neuro-cognitivi che di quelli dell'umore sull'outcome a breve termine dei pazienti anziani fratturati e viene anche sottolineata l'influenza del dolore [308; 309].

3.6. Influenza dei disturbi neuropsichiatrici sul recupero motorio a T1-T2-T3

Il recupero motorio dei pazienti anziani fratturati arruolati nello studio è stato valutato anche durante il follow-up e per questo scopo è stato utilizzato la Short Physical Performance Battery (SPPB). Si tratta di una breve batteria di test utili per la valutazione di tre ambiti inerenti al recupero delle funzioni dell'apparato locomotore e nello specifico: l'equilibrio; il cammino; la capacità di alzarsi da una sedia senza l'aiuto degli arti superiori. Il valore indicato come cut-off di misura del recupero motorio è uguale a 6 all'interno di uno score compreso fra 0 e 12. Anche secondo la letteratura scientifica relativa, è considerata sufficiente una performance "motoria" che ottiene punteggio superiore a 6 [304].

Ancora una volta per valutare l'influenza dei disturbi neuropsichiatrici insorti a seguito della frattura di femore sul recupero motorio a distanza di 3 (T1), 6 (T2) e 12 (T3) mesi dall'evento fratturativo (fasi del follow-up) sono state messe a confronto le medie dei punteggi ottenuti alla Short Physical Performance Battery dai soggetti affetti o meno da depressione (GDS≥10; GDS<10), affetti o meno da impoverimento cognitivo (MMSE<25; MMSE≥25) e che avevano o meno sviluppato uno stato confusionale acuto (CAM+; CAM-). Il primo grafico che prende in considerazione il confronto fra medie dei punteggi SPPB fra soggetti depressi e non depressi al tempo T1, T2 e T3 mostra come il primo gruppo abbia ottenuto nel recupero motorio a distanza risultati sempre inferiori a quelli ottenuti dal secondo gruppo e che le differenze osservate sono risultate statisticamente significative solo a livello di T1 ($t=3,33$; $p<0,01$) e T3 ($t=2,40$; $p<0,05$) e cioè a 3 e 12 mesi di distanza dalla frattura (Figura 9).

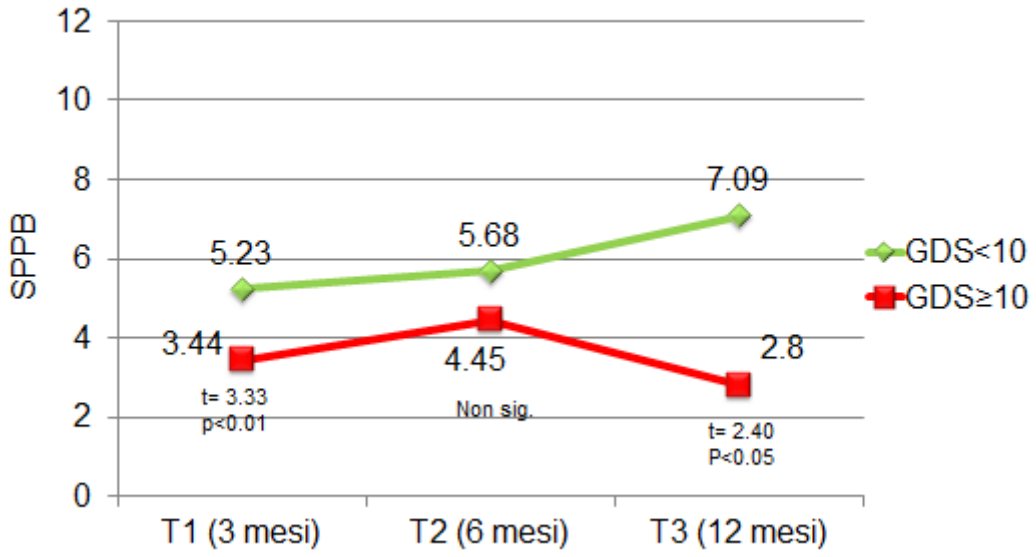

Figura 9 Recupero funzionale e sintomi depressivi. SPPB: batteria di test che valuta il recupero funzionale motorio (equilibrio, cammino, alzata dalla sedia). Il punteggio va da 0 = nessun recupero a 12 = massimo recupero; GDS: Presenza di sintomi depressivi per punteggio > di 10.

Il grafico che confronta le medie dei punteggi SPPB ottenuti dai soggetti con impoverimento cognitivo e da quelli invece senza sintomi di impoverimento cognitivo, indica ancora una volta che le medie relative al primo gruppo (MMSE<25) risultano sempre inferiori a quelle relative al secondo gruppo (MMSE≥25); in questo caso inoltre la differenza tra medie è risultata statisticamente significativa ad ogni punto di osservazione di follow-up e cioè a T1 (t=3,57; p<0,01), T2 (t=3,69; p<0,01) e T3 (t=3,02; p<0,05) (Figura 10).

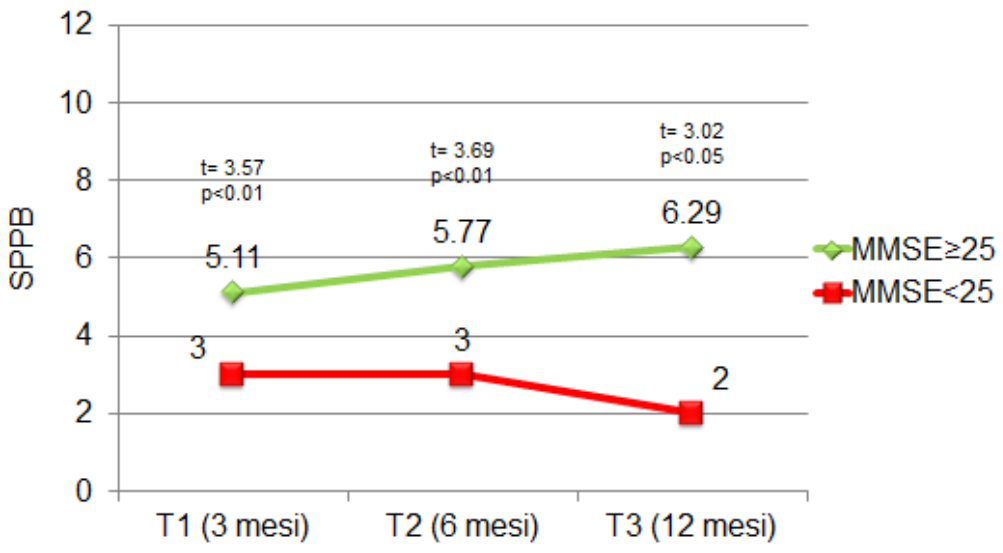

Figura 10 Recupero funzionale e impoverimento cognitivo. SPPB: batteria di test che valuta il recupero funzionale motorio (equilibrio, cammino, alzata dalla sedia). Il punteggio va da 0 = nessun recupero a 12 = massimo recupero; MMSE: Presenza di impoverimento cognitivo per punteggio <25.

Infine il grafico che confronta le medie dei punteggi SPPB ottenuti dai soggetti che avevano sviluppato uno stato confusionale acuto (CAM+) e da quelli che al contrario non lo avevano sviluppato (CAM-), mostra lo stesso trend visto in precedenza. Le medie dei punteggi SPPB dei pazienti con CAM positiva (sviluppo di Delirium durante la degenza), risultano sempre più basse di quelle dei pazienti con CAM negativa (no sviluppo di Delirium durante la degenza) e la significatività relativa alle differenze fra tali medie si ritrova al tempo T1 ($t=-3,29$; $p<0,01$) e T2 ($t=-2,78$; $p<0,01$) cioè a 3 e 6 mesi di distanza dall'evento fratturativo (Figura 11).

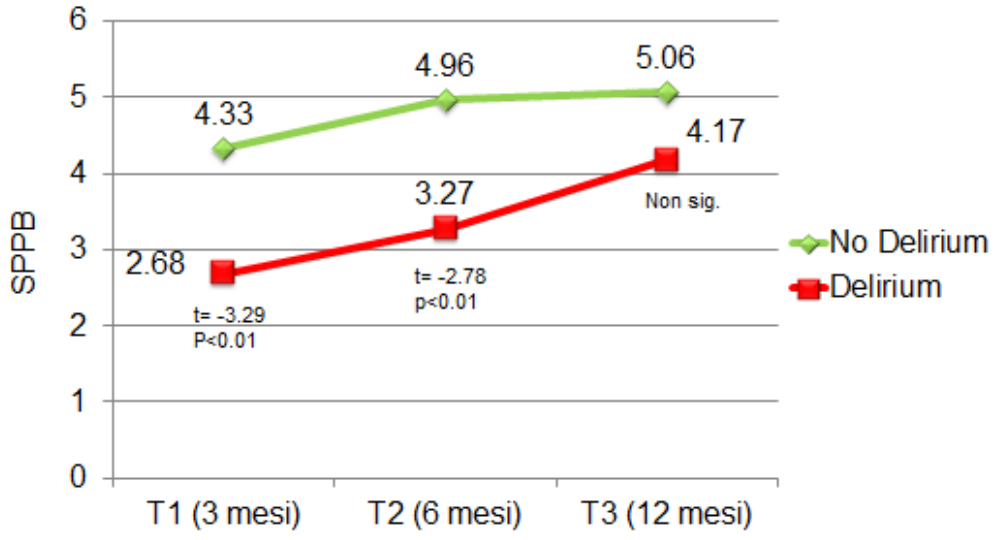

Figura 11 Recupero funzionale e delirium post-frattura. SPPB: batteria di test che valuta il recupero funzionale motorio (equilibrio, cammino, alzata dalla sedia). Il punteggio va da 0 = nessun recupero a 12 = massimo recupero.

Relativamente a questa analisi possiamo quindi affermare che l'insorgenza di eventi di Delirium durante la degenza ospedaliera ed il decadimento cognitivo pesano sull'outcome motorio dei pazienti fratturati a distanza di 3, 6 mesi e 3, 6 e 12 mesi rispettivamente. In particolare l'insorgenza di delirium sembra influire allo stesso modo sul recupero motorio a distanza e sul già studiato recupero delle abilità funzionali. Tutti i risultati sopra descritti, suggeriscono comunque che sia i disturbi cognitivi che i sintomi depressivi influenzano significativamente il recupero dei livelli di autonomia e della funzionalità motoria fino ad un anno dall'evento fratturativo, ponendo l'accento su un loro eventuale valore predittivo. I risultati ottenuti sono inoltre concordi con la gran parte della letteratura inerente tale argomento [293; 306; 310; 311; 312].

3.7. Influenza delle patologie neuropsichiatriche pre-frattura su disabilità e cadute

Lo studio C.O.D.E. ha inoltre preso in considerazione le diagnosi di demenza, depressione maggiore e malattia di Parkinson antecedenti l'evento fratturativo studiando se tali diagnosi fossero o meno correlate con alcune disabilità dei pazienti e con alcune caratteristiche riguardanti le cadute in un periodo di 12 mesi prima dell'evento in studio. In particolare sono state osservate le correlazioni delle diagnosi suddette con: la capacità di

camminare; l'esperienza di caduta durante l'ultimo anno; il numero di cadute avvenute; la paura di cadere; la capacità di riprendersi ed evitare la caduta. L'analisi eseguita ed i risultati mostrati nella tabella di Figura 12 ci hanno permesso di osservare come nel nostro campione, la diagnosi di demenza antecedente la frattura correli in modo statisticamente significativo (χ^2=8,89; p<0,05) con la capacità di camminare e con la paura di cadere (χ^2=6,88; p<0,05), la diagnosi di malattia di Parkinson correli in modo statisticamente significativo (χ^2=8,29; p<0,01) con l'esperienza di altre cadute nei 12 mesi precedenti l'evento frattura in studio e la diagnosi di depressione maggiore correli in modo statisticamente significativo con la capacità di camminare (χ^2=10,51; p<0,05), con l'esperienza di caduta nei 12 mesi precedenti (χ^2=4,73; p<0,05) e con la paura di cadere (χ^2=71,12; p<0,01).

	Capacità di camminare	Cadute 12 mesi	Numero Cadute	Paura di cadere	Quasi caduta
Demenza	(χ2=8,89 p<0,05)	Non Sig.	Non Sig.	(χ2=6,88 p<0,05)	Non Sig.
Parkinson (campione basso)	Non sig.	(χ2=8.92 p<0,01)	Non Sig.	Non Sig.	Non Sig.
Depressione Maggiore	(χ2=10,51 p<0,05)	(χ2=4,73 P<0,05)	Non Sig.	(χ2=17,12 P<0,01)	Non Sig.

Figura 12 Patologie neuropsichiatriche, disabilità e cadute.

Anche in letteratura vengono riportate evidenze relative all'influenza dei disturbi neuro-psichiatrici sugli eventi di disabilità, disequilibrio e cadute [237; 313; 314; 315; 316; 317; 318; 319].

3.8. Influenza delle patologie neuropsichiatriche pre-frattura sul recupero funzionale e motorio

Infine, le diagnosi di demenza, malattia di Parkinson e depressione maggiore sempre antecedenti all'evento fratturativo in studio, sono state studiate anche in relazione agli indici di recupero funzionale e motorio utilizzati; nello specifico in relazione all'Indice di Barthel (grado di autonomia nelle funzioni di vita quotidiana), al Cumulated Ambulation Score (CAS, recupero motorio precoce misurato in I-II e III giornata post-chirurgica) e alla Short Physical Performance Battery (SPPB, recupero motorio nel follow-up). I risultati ottenuti hanno evidenziato come la demenza pre-frattura correli naturalmente con il livello di autonomia sempre antecedente a tale evento (χ^2=78,56; p<0,01) e con i punteggi ottenuti nella scala SPPB a 3 (t=4,21; p<0,01) e 6 (t=4,56; p<0,01) mesi di distanza. Allo stesso modo è stato trovata una correlazione statisticamente significativa fra la diagnosi di malattia di Parkinson pre-frattura e l'Indice di Barthel (χ^2= 7,97; p<0,05), i punteggi SPPB a 3 (t=2,71; p<0,01), 6 (t=2,76; p<0,01) e 12 (t=2,44; p<0,05) mesi di distanza dall'evento fratturativo. E' stata inoltre rilevata una correlazione statisticamente significativa fra diagnosi positiva pre-frattura per depressione maggiore e Indice di Barthel (χ^2=18,30; p<0,01), punteggio ottenuto al Cumulated Ambulation Score (t=3,17; p<0,01) e punteggi ottenuti alla scala SPPB a 3 (t= 2,24; p< 0,05) e 6 (t=2,26; p<0,05) mesi di distanza dalla frattura (Figura 13).

	Grado di Autonomia (B.I.)	Recupero precoce (CAS)	SPPB1	SPPB2	SPPB3
Demenza	(χ2=78,56 p<0,01)	Non Sig.	(t=4,21 p<0,01)	(t=4.56 p<0,01)	Ai limiti della sig.
Parkinson (campione basso!)	(χ2=7,97 p<0,05)	Non Sig.	(t=2,71 p<0,01	(t=2,76 p<0,01)	(t=2,44 p<0,05)
Depressione Maggiore	(χ2=18,30 p<0,01)	(t=-3,17 P<0,01)	(t=2,24 P<0,05)	(t=2,26 P<0,05)	Non Sig.

Figura 13 Patologie neuropsichiatriche e recupero funzionale. SPPB = Short Phisical Performance Battery; B.I.= Barthel Index.

L'osservazione dei risultati ottenuti ci permette di affermare che i pazienti affetti da depressione maggiore o da demenza prima dell'evento fratturativo avevano già, com'è naturale, un livello di autonomia peggiore rispetto al resto della popolazione in studio e che entrambe le patologie sembrano predittive di un recupero funzionale e motorio più scadente. La depressione maggiore pare inoltre essere predittiva anche di un peggior recupero motorio precoce. Già molti importanti studi sull'argomento hanno riportato come i disturbi cognitivi e le patologie dell'umore, inclusa la depressione, giochino un ruolo di primo ordine nel determinare un basso outcome funzionale e motorio dei pazienti con frattura di femore a seguito dell'intervento chirurgico di riduzione della frattura [306; 310; 311; 312].

4. Discussione

Il rimodellamento osseo è un processo alla cui regolazione concorrono una grande varietà di fattori locali e sistemici. Oltre a quelli già ben conosciuti, negli ultimi decenni la ricerca si è orientata anche verso lo studio dell'influenza esercitata da vari sistemi neuronali, scoprendo l'esistenza di un rapporto bidirezionale che si esprime in un continuo dialogo fra il sistema nervoso ed il tessuto osseo, il così detto "bone-brain crosstalk". Oltre gli studi di laboratorio effettuati su modelli animali e i trials clinici sull'uomo, anche lo studio di alcuni difetti genetici e soprattutto dei processi fisiopatologici e delle correlazioni esistenti fra numerose patologie hanno determinato il raggiungimento di una maggiore comprensione dei processi alla base del "dialogo" fra i due organi. In questo ambito si inseriscono anche i numerosi studi che hanno evidenziato la correlazione fra l'osteoporosi, la più diffusa patologia degenerativa del tessuto osseo, e la tendenza alle cadute e fratture che ne rappresentano le conseguenze più comuni e temibili e numerosi disturbi della sfera neuropsichiatrica [234; 235; 236; 237; 239; 240; 241; 258; 259; 260; 261; 264; 265; 266; 267; 275; 276; 277; 278; 279; 280; 314; 315; 316; 317; 318; 319; 320; 321; 322; 323; 324; 325; 326; 327; 328; 329; 330; 331; 332; 333; 334; 335; 336; 337; 338;]. Questi studi sono per la maggior parte eseguiti su popolazioni di soggetti anziani fragili; la sindrome da "fragilità" che comprende infatti nella sua definizione l'occorrenza di una serie di deficienze psicofisiche, tra cui i disturbi neuropsichiatrici e le alterazioni a vari livelli dell'apparato muscolo-scheletrico [296; 297; 339; 340] che interagendo fra loro determinano la riduzione delle risposte fisiologiche [16; 17], è di per se un esempio

importante di correlazione osso-cervello. Dopo quindi aver eseguito nella prima parte della tesi una revisione di tutte le maggiori evidenze fin'ora rilevate sui meccanismi alla base della correlazione osso-cervello, nella seconda parte sono riportati i primi risultati (non completi) dello studio C.O.D.E. (Connections Between Outcome of Osteoporotic fractures, Depression, Delirium & Dementia in the Elderly) che ha analizzato proprio una popolazione di soggetti anziani fragili che avevano subito frattura di femore. La metodologia di studio utilizzata si ispira al sistema multidimensionale della medicina geriatrica ed ha permesso un approccio diretto alla popolazione anziana che presenta il problema della comorbidità e della fragilità. Sono stati pertanto valutati, al momento dell'ospedalizzazione e durante i 12 mesi successivi, 514 pazienti ultrasessantacinquenni che avevano subito una prima frattura di femore. Per la numerosità del campione osservato e per la quantità e qualità dei dati raccolti, lo studio potrebbe, una volta eseguite tutte le analisi prospettivate, diventare un unicum a livello internazionale. Sono stati, al momento, presi in considerazione questi obiettivi:

Accertamento degli outcome funzionali nei pazienti con frattura femorale in presenza (esposti) o in assenza (non esposti) di sintomatologia depressiva, impoverimento cognitivo e delirium insorti dopo la frattura.

Valutazione della correlazione tra diagnosi di Depressione Maggiore, malattia di Parkinson e demenza precedenti la frattura e tendenza ad eventi di instabilità e cadute.

Contribuire con le informazioni ottenute, riguardo al collegamento osso-cervello, al miglioramento dei percorsi diagnostici e terapeutici dei pazienti fratturati di femore.

Oltre a questi suddetti, lo studio offrirebbe anche la possibilità di analizzare altri importanti ambiti inerenti lo stato di salute dei soggetti ultrasessantacinquenni con frattura femorale fra cui: l'influenza dei sintomi depressivi, dell'impoverimento cognitivo e del delirium sulla mortalità dei pazienti arruolati; il ruolo del dolore e del suo trattamento sul recupero motorio e sul livello di autonomia; il ruolo della riabilitazione sugli outcomes funzionali; uno studio più approfondito della relazione causa-effetto tra frattura da fragilità e patologie neuropsichiatriche. Sono inoltre stati raccolti anche dati abbastanza attendibili sulle terapie farmacologiche dei pazienti arruolati con la possibilità di verificare l'influenza di esse sui vari outcomes. Si tratta quindi di un grandissimo apparato di dati clinici e funzionali relativi a pazienti anziani fragili con frattura di femore, che potrebbero, una volta analizzati e sviluppati per intero, contribuire in maniera importante al miglioramento dei percorsi diagnostici e terapeutici dei pazienti anziani con frattura di

femore. Vanno annoverati comunque anche i limiti della presente ricerca. Innanzitutto i risultati ottenuti, anche in base alla struttura dello studio, non permettono di chiarire i processi fisiologici e patologici alla base della relazione osso-cervello; lo studio nasce infatti con l'obiettivo di dimostrare nell'ambito specifico osservato, la presenza della correlazione osso-cervello. Per quanto riguarda poi l'analisi dei dati, bisogna ricordare che i risultati ottenuti sul follow-up si basano su un campione parziale con numerosi missing dovuti al rifiuto o all'irreperibilità dei pazienti; è stato possibile comunque raccogliere attraverso un colloquio telefonico, ad un anno di distanza dal reclutamento, alcuni dati fondamentali dei pazienti non valutati (sopravvivenza, eventi di rifratture, informazioni sulla nuova situazione sociale, sul recupero funzionale e sul livello di autonomia). E' inoltre doveroso considerare che le analisi effettuate non sono complete e mancano in alcuni casi della valutazione di alcuni fattori influenzanti e di confondimento quali: il dolore; il basso livello di autonomia pre-frattura; il time to surgery maggiore di 48 h; la comorbilità specie se impegnativa.

I risultati ottenuti suggeriscono innanzitutto che la popolazione in studio è chiaramente una popolazione fragile già in partenza perchè caratterizzata da un livello di autonomia pre-frattura non sufficiente nel 40% dei casi, con un'elevata frequenza di cadute (nel 44,7%), con incontinenza urinaria (nel 15,8% dei casi), con deambulazione difficoltosa (ausilio al cammino nel 41,2% dei casi) e diagnosi di demenza (16,2% dei casi). Secondo i criteri e le scale diagnostiche utilizzate è stato possibile osservare un netto aumento dei sintomi depressivi e di quelli di deterioramento cognitivo a seguito della frattura femorale; a fronte infatti di una percentuale pari al 16,2% di pazienti con diagnosi di depressione e di una percentuale pari a 23,3% di pazienti con diagnosi di demenza antecedenti l'evento fratturativo, a seguito di tale evento si riscontrano rispettivamente percentuali del 41% e 21,4%. Nel periodo di osservazione di 12 mesi dopo il ricovero ospedaliero inoltre i disturbi dell'umore tendono a non recedere attestandosi su un valore uguale al 31,3% a distanza di un anno, mentre i sintomi di decadimento cognitivo tendono ad un netto miglioramento (T3=12,5%). Possiamo quindi osservare un'alta prevalenza di disturbi neuropsichiatrici a seguito della frattura femorale da fragilità e questo in accordo con numerosi altri studi in letteratura [234; 235; 237; 314; 315; 316; 318; 319; 321; 322; 323; 325; 327]. I dati suddetti sulla prevalenza dei disturbi neuropsichiatrici ottenuti dopo aver escluso dal campione i soggetti affetti da demenza e depressione maggiore già prima della frattura, hanno quindi un discreto interesse scientifico che incoraggia a studiare più a fondo la loro eziopatogenesi post-frattura e soprattutto la loro influenza sugli outcomes funzionali. Riguardo a quest'ultimo argomento i disturbi neuropsichiatrici studiati sono stati analizzati

in relazione al recupero funzionale e motorio valutati nei tre tempi del follow-up a 3 (T1), 6 (T2) e 12 (T3) mesi di distanza dall'evento fratturativo. I soggetti che avevano sviluppato sintomi depressivi (punteggio >10 nella scala GDS) hanno ottenuto un peggior recupero funzionale (Indice di Barthel) ad ogni momento di follow-up, rispetto ai soggetti che non avevano sviluppato tali sintomi; allo stesso modo i soggetti che avevano sviluppato decadimento cognitivo (punteggio <25 nella scala MMSE) rispetto a quelli che non avevano sperimentato tali sintomi. L'impoverimento cognitivo ed i sintomi depressivi insorti dopo la frattura e misurati durante il ricovero ospedaliero potrebbero quindi essere considerati predittori di un peggior recupero funzionale. Il delirium insorto a seguito della frattura determina invece un peggior recupero funzionale al tempo T1 (3 mesi) e T2 (6 mesi). I risultati osservati sembrano in linea con gli studi scientifici che riportano tra i predittori di insufficiente recupero funzionale, nel corso dell'anno successivo alla frattura di femore, l'impoverimento cognitivo e la depressione post-frattura [306; 341]. L'influenza dei disturbi neuropsichiatrici post-frattura è stata studiata anche in relazione al recupero motorio precoce (Cumulated Ambulation Score) e a distanza di tempo dalla frattura, cioè durante il follow-up (Short Physical Performance Battery). I risultati mostrano come: il recupero motorio valutato in I-II e III giornata dopo l'intervento chirurgico sia peggiore nei soggetti depressi (GDS>10), mentre nel follow-up il recupero motorio sia peggiore nei pazienti depressi rispetto ai non depressi a 3 e 12 mesi di distanza dalla frattura; nei soggetti con impoverimento cognitivo sia peggiore rispetto ai soggetti integri in questo ambito a 3, 6 e 12 mesi di distanza dalla frattura; per i pazienti che hanno sviluppato uno stato confusionale acuto (CAM+) sia peggiore rispetto a quelli con CAM- a 3 e 6 mesi di distanza dall'evento fratturativo. In sostanza nella nostra analisi quindi, i sintomi depressivi post-frattura sembrano predittivi anche di un peggior recupero motorio precoce e durante il follow-up, mentre il decadimento cognitivo ed il delirium sembrano influenzare solo il recupero motorio valutato nel follow-up. Diversi studi in letteratura hanno già mostrato come i disturbi cognitivi e le patologie dell'umore, in primis la depressione, giochino un ruolo importante nel determinare un basso outcome funzionale e motorio nei soggetti fratturati a seguito dell'intervento chirurgico di riduzione della frattura [306; 310; 311; 312]. Lo studio inoltre ha permesso di valutare anche l'influenza di alcune patologie neuropsichiatriche diagnosticate prima dell'evento fratturativo sugli stessi outcome funzionali e motori. Le analisi eseguite hanno indicato come: la diagnosi di demenza pre-frattura correlasse in modo statisticamente significativo con il livello di autonomia valutato al momento dell'arruolamento (T0) e con il recupero motorio a distanza di 3 e 6 mesi dalla frattura; la diagnosi di malattia di Parkinson pre-frattura correlasse con il livello di

autonomia sempre al tempo T0 e con il recupero motorio valutato durante tutto il periodo di follow-up (T1, T2,T3); la diagnosi di depressione maggiore pre-frattura correlasse con il livello di autonomia funzionale a T0, con il recupero motorio precoce e con quello a T1 e T2. I soggetti affetti da depressione maggiore sperimentano inoltre, in base alle correlazione ottenute, un maggior numero di cadute nei 12 mesi precedenti la valutazione e questo dato risulta concorde con gli studi di letteratura sull'argomento [237; 314; 315; 316; 317; 318; 319]. In conclusione quindi anche se le evidenze ottenute non permettono di chiarire i processi fisiopatologici alla base della correlazione fra la fragilità e la frattura ossea e i disturbi neuropsichiatrici insorti prima e dopo l'evento fratturativo, possiamo comunque aggiungere un'ulteriore prova dell'esistenza di tale correlazione e dell'influenza che essa esercita sullo stato clinico e sulla ripresa funzionale e motoria dei pazienti fratturati. Sarebbe dunque auspicabile tramite lo sviluppo ulteriore di questo studio, e tramite lo svolgimento di altri studi sull'argomento, giungere alla comprensione del rapporto bidirezionale osso-cervello e alla produzione di un rapporto finale utile al miglioramento dei percorsi diagnostico-terapeutici dei pazienti fratturati con concomitanti disturbi neuropsichiatrici.

5. Conclusioni

Sempre più numerosi studi dimostrano l'esistenza di un complesso "dialogo" fra osso e cervello. Il campo della ricerca neuro-scheletrica è infatti ricco di elementi e fattori di diversa natura che interagendo fra loro contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi del tessuto osseo. Oltre alle evidenze su modelli animali e trials clinici sull'uomo, molte patologie rappresentando importanti punti di connessione tra il sistema nervoso e quello scheletrico, hanno contribuito a migliorare la conoscenza del così detto "bone-brain crosstalk". Molta parte della letteratura scientifica si è concentrata sulle evidenze dimostranti le relazioni fra osteoporosi, la più diffusa patologia degenerativa ossea, e fratture e alcuni disturbi neuropsichiatrici che si presentano in un'unità particolarmente frequente in pazienti anziani fragili fratturati.

Lo studio C.O.D.E. nasce con l'obiettivo principale di valutare la presenza di correlazioni tra l'osteoporosi e la frattura e l'insorgenza di disturbi della sfera neuropsichiatrica ma anche di valutare come disturbi neuropsichiatrici già presenti prima della frattura possano influire sulla tendenza alla fragilità ossea e alle cadute. I risultati hanno al momento dimostrato:

1. Aumento dell'insorgenza di disturbi neuropsichiatrici (sintomatologia depressiva ed impoverimento cognitivo) a seguito dell'evento fratturativo;

2. nel follow-up è stato rilevato un trend in diminuzione dell'incidenza di sintomi cognitivi ed un trend in aumento dell'incidenza dei sintomi depressivi;

3. l'impoverimento cognitivo e la depressione insorti dopo l'evento fratturativo influiscono negativamente sul recupero del grado di autonomia e sul recupero motorio;

4. il delirium insorto durante il ricovero (sia pre che post-chirurgico) sembra influire negativamente sul recupero motorio e sul recupero del grado di autonomia;

5. la sintomatologia depressiva insorta durante il ricovero influisce negativamente anche sul recupero motorio precoce (in 1ª, 2ª e 3ª giornata dall'intervento chirurgico);

6. i pazienti con diagnosi pre-frattura di demenza o depressione, hanno già in partenza una maggiore difficoltà nella deambulazione e una maggior paura di cadere, rispetto al resto della popolazione in studio;

7. i pazienti affetti da depressione maggiore o demenza prima dell'evento fratturativo, presentano anche un grado di autonomia pre-frattura più basso rispetto al resto della popolazione in studio; entrambe le patologie sembrano inoltre predittive di un recupero funzionale più scadente. La depressione maggiore sembra essere predittiva anche di un peggior recupero motorio precoce.

6. Appendice

6.1. Descrizione delle scale di valutazione

6.1.1. Mini Mental State Examination (MMSE - Folstein MF et al., 1975)

Il MMSE è uno strumento per la valutazione dello stato cognitivo ed è sicuramente uno dei test più utilizzati nella pratica clinica data la semplicità di utilizzo, la breve durata di somministrazione, la riproducibilità e l'elevata sensibilità. E' costituito di 11 item che includono prove verbali e non verbali e che sono finalizzate alla valutazione di varie aree cognitive: orientamento nel tempo e nello spazio, memoria a breve termine, capacità di concentrazione, memoria a lungo termine, linguaggio e prassia costruttiva. A ciascuna prova, se correttamente eseguita, viene assegnato un punteggio per un totale massimo di 30 punti; un punteggio uguale o inferiore a 18 è indice di una grave compromissione delle abilità cognitive; un punteggio compreso tra 18 e 24 è indice di una compromissione da moderata a lieve, un punteggio pari a 25 è considerato borderline, da 26 a 30 è indice di normalità cognitiva. Il test non può essere effettuato in soggetti con gravi disturbi della vista e dell'udito e devono essere applicati dei correttivi per la normalizzazione dei risultati in base all'età e alla scolarità del paziente.

6.1.2. Mini International Neuropsichiatric Interview Plus (M.I.N.I. PLUS - Sheehan D et al., versione italina 5.0.0 1998)

E' una scala di valutazione diagnostica semistrutturata per la diagnosi dei disturbi psichiatrici di più frequente riscontro, altamente sensibile e specifica, compatibile con i principali sistemi internazionali di classificazione diagnostica dei disturbi mentali (ICD-10 e DSM IV-TR). E' in grado di cogliere le più importanti varianti subsindromiche ed è utilizzabile sia in ambito clinico che di ricerca. La M.I.N.I Plus consente la diagnosi di 24 disturbi psichici di Asse I e consente diagnosi attuali e lifetime. Oltre alla rilevazione dei sintomi, indaga la disabilità associata al disturbo, evidenzia l'eventuale concomitanza tra i sintomi ed una eventuale patologia fisica, l'uso di sostanze psicotrope o la presenza di un lutto recente. Permette di stabilire l'età in cui si sono manifestati per la prima volta i sintomi di quel disturbo, di indicare quante volte nella vita tali sintomi si sono presentati e di precisare, quando indicato, l'eventuale classificazione in sottotipi. Per gli scopi della

presente ricerca è stata sufficiente la somministrazione della sezione inerente la diagnosi di Depressione Maggiore.

6.1.3. Geriatric Depression Scale (GDS - Brink TL et al., 1982)

Si tratta di una scala per la rilevazione dei sintomi depressivi, costituita da 30 item che prevedono una risposta alternativa (sì/no). Le dimensioni valutate includono: sintomi cognitivi, motivazione, orientamento al passato e al futuro, immagine di sé, perdita, agitazione, tratti ossessivi, umore. Si assegna un punto per ogni risposta in direzione patologica. In linea generale, si considerano normali valori fino a 9, valori da 10 a 17 sono ritenuti indicativi di depressione lieve e superiori a 18 di depressione grave.

6.1.4. Confusion Assessment Method (CAM - Sharon K et al., 1990)

Si tratta di un test per la valutazione della presenza di stato confusionale acuto (delirium). E' costituito da un questionario e da un algoritmo di trattamento e tiene in considerazione 9 criteri di valutazione: modificazioni improvvise dello stato mentale; ridotta capacità di attenzione; pensiero disorganizzato; alterato livello di coscienza; disorientamento; diminuzione della memoria; percezione alterata; agitazione psicomotoria; rallentamento psicomotorio; alterazione del ritmo sonno veglia. Una volta compilato il questionario, per arrivare alla diagnosi di delirium basta la presenza dei primi 4 segni/criteri; questo strumento, in ambito ospedaliero, può essere utilizzato in modo molto semplice anche dal personale infermieristico, dopo una breve formazione.

6.1.5. Personal Mastery (Berry JM et al., 1993)

E' un singolo item sull'aspettativa di recupero come indicatore di personalità. Si chiede direttamente al paziente se pensa di recuperare dopo l'evento fratturativo.

6.1.6. Barthel Index (Mahoney FI et Barthel DW, 1960)

Test ampiamente utilizzato nella valutazione della disabilità e caratterizzato da eccellente validità e affidabilità. Si compone di 10 item che valutano l'autonomia del soggetto nello

svolgimento di attività quali: alimentarsi; fare il bagno; curare la propria igiene personale; controllare gli sfinteri; trasferirsi nel bagno; trasferirsi dalla sedia al letto e viceversa; deambulare e salire le scale. Il punteggio totale può variare da 0 (totalmente dipendente) a 100 (totalmente indipendente).

6.1.7. Cumulated Ambulation Score (CAS - Foss NB et al., 2006)

Il Cumulated Ambulation Score (CAS) è uno strumento di valutazione di recupero fisico utilizzato dai fisioterapisti nelle sessioni di esercizio nei giorni seguenti l'intervento chirurgico di riduzione di frattura femorale. Il CAS descrive l'abilità del paziente nello svolgimento di tre specifiche funzioni: entrare e uscire dal letto; sedersi e rialzarsi da una sedia; camminare con adeguato sostegno umano. Ad ogni funzione è assegnato un punteggio che sarà 2 per pazienti capaci di svolgere la funzione da soli, 1 per pazienti bisognosi di aiuto e 0 per quelli non abili alle funzioni nonostante l'aiuto dell'operatore. Il test viene eseguito per tre giorni ed ogni giorno il punteggio ottenuto risulta costituito dai singoli punteggi relativi alle tre diverse funzioni potendo variare così tra 0 e 6. Il punteggio totale che varia tra 0 e 18 è invece la somma dei singoli punteggi di ogni giorno; maggiore è il punteggio finale, migliore è la ripresa post-chirurgica del paziente. L'affidabilità [342] e validità predittiva sull'outcome riabilitativo [343] del CAS è stata stabilita proprio in studi riguardanti pazienti con frattura femorale.

6.1.8. Visual Analogic Scale (VAS - Turk DC, 2001)

E' una scala analogica per la misurazione soggettiva dell'intensità del dolore percepito dal paziente. E' disponibile in una versione numerica (Numerical Rating Scale – NRS) oppure verbale (verbal Rating Scale – VRS). Nella versione visiva, la segnalazione del grado di dolore viene fatta indicando un punto di una linea di 10 cm i cui estremi rappresentano gli stessi valori indicati nella forma numerica dello stesso strumento, cioè, all'estremità sinistra, intensità = 0 (nessun dolore), all'estremità destra della linea, intensità = 10 (massimo dolore).

6.1.9. Short Physical Performance Battery (SPPB - Guralnik JM et al., 1994)

La scala SPPB è una breve batteria di test nata per valutare la funzionalità degli arti inferiori ed è costituita da tre sezioni diverse. Nella prima sezione si valuta l'equilibrio in tre prove: il mantenimento della posizione in piedi con i piedi uniti per 10 secondi; il mantenimento della posizione di semi-tandem che consiste nel porre i piedi con l'alluce di uno di lato al calcagno dell'altro per 10 secondi; il mantenimento della posizione di tandem e cioè con l'alluce di un piede dietro al tallone dell'altro, sempre per lo stesso tempo. Il punteggio per questa prima sezione varia da un minimo di 0 se il paziente non è riuscito a mantenere la posizione a piedi uniti per il tempo richiesto, ad un massimo di 4 se è riuscito a svolgere tutte e tre le prove. La seconda sezione è invece diretta a valutare il cammino del paziente su 4 metri lineari ed a seconda del tempo impiegato il punteggio assegnato può variare da 0 se il paziente non è stato in grado di svolgere la prova, ad 1 se la performance ha avuto durata maggiore di 8,7 secondi, ad un massimo di 4 con durata inferiore a 4,8 secondi. Nella terza ed ultima sezione della batteria è invece valutata la capacità del paziente di eseguire, per 5 volte consecutive, il movimento di sedersi e alzarsi da una sedia senza utilizzare gli arti superiori che per questo motivo devono essere incrociati davanti al petto. Anche in questo caso il punteggio può variare da 0 se il paziente non è riuscito a svolgere la prova o se questa ha avuto durata superiore a 60 secondi, ad un massimo di 4 se la durata è stata inferiore a 11,2 secondi. Il punteggio totale ha quindi un range da 0 a 12.

6.1.10. Indice di Charlson (Charlson ME et al., 1987)

Si dà ad ogni patologia individuata nell'anamnesi patologica remota o prossima il punteggio corrispondente al riquadro in cui si trova la patologia. Un punteggio ≥4, è indice di grave comorbilità.

6.1.11. Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index (WOMAC - Bellamy N, 2002)

E' un intervista strutturata sul dolore artrosico di anca e ginocchia e sull'impedimento funzionale e motorio che ne deriva. Si compone di 24 domande, suddivise in 3 sottoscale:

Dolore (5 domande): durante la deambulazione, durante il salire e scendere le scale, a letto, seduto o sdraiato e fermo in piedi;

Rigidità (2 domande): al risveglio e nel corso della giornata;

Funzioni fisiche (17 domande): scendere e salire le scale; alzarsi da seduto; stare in piedi; piegarsi verso il pavimento; camminare in piano; entrare e uscire dall'auto; andare a fare compere; mettersi le calze; alzarsi dal letto; togliersi le calze; sdraiarsi a letto; entrare e uscire dalla vasca; sedersi; sedersi e alzarsi dal WC; eseguire lavori domestici pesanti; eseguire lavori domestici leggeri.

Ogni risposta fornisce una scala analogica numerata da 0 a 4 dove 0 sta per nessun dolore/nessun impedimento, 5 per dolore fortissimo/totale impedimento. Lo score range va da 0 (nessun dolore/nessun impedimento) a 98 (dolore fortissimo/totale impedimento).

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzitutto il mio tutor la Prof.ssa Maria Luisa Brandi per avermi offerto tante occasioni di crescita personale e professionale.

Ringrazio tutti i colleghi ed il personale della SOD Malattie del Metabolismo Minerale ed Osseo, in particolare il Dott. Lorenzo Bonamassa per la sua preziosa collaborazione nello studio C.O.D.E. ed in tutte le esperienze professionali di questi tre anni.

Ringrazio infine la mia famiglia per la sua insostituibile presenza.

Bibliografia

[1] Cooper, C., Atkinson, E. J., Jacobsen, S. J., O'Fallon, W. M., & Melton, L. J. (1993). Population-based study of survival after osteoporotic fractures.*American journal of epidemiology*, *137*(9), 1001-1005

[2] Kanis, J. A., Oden, A., Johnell, O., et al. (2003). The components of excess mortality after hip fracture. *Bone*, *32*(5), 468-473.

[3] Johnell, O., Kanis, J. A., Oden, A., et al. (2004). Mortality after osteoporotic fractures.*Osteoporosis International*, *15*(1), 38-42.

[4] Johnell, O., & Kanis, J. A. (2004). An estimate of the worldwide prevalence, mortality and disability associated with hip fracture. *Osteoporosis International*,*15*(11), 897-902.

[5] Voshaar, R. C. O., Banerjee, S., Horan, M., et al. (2007). Predictors of incident depression after hip fracture surgery. *The American journal of geriatric psychiatry*, *15*(9), 807-814.

[6] Iolascon, G., Cervone, M., Gimigliano, R., et al. (2011). Neuropsychiatric disorders in hip fracture. *Clinical cases in mineral and bone metabolism*, *8*(3), 49.

[7] Schwan, S., & Hallberg, P. (2009). SSRIs, bone mineral density, and risk of fractures—a review. *European neuropsychopharmacology*, *19*(10), 683-692.

[8] Metozzi, A., Bonamassa, L., Brandi, G., & Brandi, M. L. (2015). Endocrinology of bone/brain crosstalk. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, *10*(2), 153-167.

[9] Aro, H. (1985). Effect of nerve injury on fracture healing: Callus formation studied in the rat. *Acta Orthopaedica*, *56*(3), 233-237.

[10] Dauty, M., Verbe, B. P., Maugars, Y., et al.(2000). Supralesional and sublesional bone mineral density in spinal cord-injured patients. *Bone*, *27*(2), 305-309.

[11]Freehafer, A. A., & MAST, W. A. (1965). Lower extremity fractures in patients with spinal-cord injury. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, *47*(4), 683-694.

[12]Pearson, J., Dancis, J., Axelrod, F., & Grover, N. (1975). The sural nerve in familial dysautonomia. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *34*(5), 413-424.

[13]Poole, K. E., Reeve, J., & Warburton, E. A. (2002). Falls, fractures, and osteoporosis after stroke time to think about protection?. *Stroke*, *33*(5), 1432-1436.

[14]Ramnemark, A., Nyberg, L., Lorentzon, R.,et al. (1999). Progressive hemiosteoporosis on the paretic side and increased bone mineral density in the nonparetic arm the first year after severe stroke.*Osteoporosis international*, *9*(3), 269-275.

[15]Elefteriou, F. (2005). Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling.*Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *62*(19-20), 2339-2349.

[16] Lipsitz, L. A., & Goldberger, A. L. (1992). Loss of'complexity'and aging: potential applications of fractals and chaos theory to senescence. *Jama*,*267*(13), 1806-1809.

[17]Fried, L. P., Tangen, C. M., Walston, J., et al.(2001). Frailty in older adults evidence for a phenotype. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *56*(3), M146-M157.

[18]Karsenty, G. (1999). The genetic transformation of bone biology. *Genes & development*, *13*(23), 3037-3051.

[19]Mundy, G. R., Boyce, B., Yoneda, T., et al. (1996). Cytokines and bone remodeling. In: Osteoporosis, vol. 1, 302313.

[20]Jones, K. B., Mollano, A. V., Morcuende, J. A., et al. (2004). Bone and brain: a review of neural, hormonal, and musculoskeletal connections. *The Iowa orthopaedic journal*, *24*, 123.

[21]Masi, L. (2012). Crosstalk between the brain and bone. *Clinical cases in mineral and bone metabolism*, *9*(1), 13.

[22]Driessler, F., & Baldock, P. A. (2010). Hypothalamic regulation of bone.*Journal of molecular endocrinology*, *45*(4), 175-181.

[23]Patel, M. S., & Elefteriou, F. (2007). The new field of neuroskeletal biology.*Calcified tissue international*, *80*(5), 337-347.

[24]Ducy, P., Amling, M., Takeda, S.,et al. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, *100*(2), 197-207.

[25]Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M., & Ryan, I. (1996). Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *81*(9), 3419-3423.

[26]He, J. Y., Jiang, L. S., & Dai, L. Y. (2011). The roles of the sympathetic nervous system in osteoporotic diseases: A review of experimental and clinical studies. *Ageing research reviews*, *10*(2), 253-263.

[27]Ahima, R. S., Flier, J. S. (2000). Leptin. Annu Rev Physiol, 62, 413-437.

[28]Jones, K. B., Mollano, A. V., Morcuende, J. A., et al.(2004). Bone and brain: a review of neural, hormonal, and musculoskeletal connections. *The Iowa orthopaedic journal*, *24*, 123.

[29]Takeda, S., Elefteriou, F., Levasseur, R.,et al. (2002). Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, *111*(3), 305-317.

[30]De Marchi, G., & Ferraccioli, G. D. (2002). Leptin: regulatory role in bone metabolism and in flogosis. *Reumatismo*, *54*(3), 217-225.

[31]Steppan, C. M., Crawford, D. T., Chidsey-Frink, K. L.,et al. (2000). Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regulatory peptides*, *92*(1), 73-78.

[32]Burguera, B., Hofbauer, L. C., Thomas, T.,et al. (2001). Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology*, *142*(8), 3546-3553.

[33]Holloway, W. R., Collier, F. M., Aitken, C. J., et al.2002). Leptin inhibits osteoclast generation. *Journal of Bone and Mineral Research*, *17*(2), 200-209.

[34]Thomas, T., Gori, F., Khosla, S., et al.(1999). Leptin Acts on Human Marrow Stromal Cells to Enhance Differentiation to Osteoblasts and to Inhibit Differentiation to Adipocytes 1. *Endocrinology*,*140*(4), 1630-1638.

[35]Ogueh, O., Sooranna, S., Nicolaides, K. H., & Johnson, M. R. (2000). The relationship between leptin concentration and bone metabolism in the human fetus. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, *85*(5), 1997-1999.

[36]Grinspoon, S., Thomas, E., Pitts, S., et al.(2000). Prevalence and predictive factors for regional osteopenia in women with anorexia nervosa. *Annals of internal medicine*, *133*(10), 790-794.

[37]Reid, I. R., Plank, L. D., & Evans, M. C. (1992). Fat mass is an important determinant of whole body bone density in premenopausal women but not in men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *75*(3), 779-782.

[38]Yadav, V. K., Oury, F., Suda, N., et al.(2009). A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell*, *138*(5), 976-989.

[39]Thomas, T., Burguera, B., Melton, L. 3., et al. (2001). Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women. *Bone*, *29*(2), 114-120.

[40]Driessler, F., & Baldock, P. A. (2010). Hypothalamic regulation of bone.*Journal of molecular endocrinology*, *45*(4), 175-181.

[41]Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., et al. (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron*, *42*(6), 983-991.

[42]Bliziotes, M. M., Eshleman, A. J., Zhang, X. W., & Wiren, K. M. (2001). Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. *Bone*, *29*(5), 477-486.

[43]Battaglino, R., Fu, J., Späte, U., et al. (2004). Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *Journal of Bone and Mineral Research*, *19*(9), 1420-1431.

[44]Gustafsson, B. I., Thommesen, L., Stunes, A. K., et al. (2006). Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function in vitro. *Journal of cellular biochemistry*, *98*(1), 139-151.

[45]Yadav, V. K., Ryu, J. H., Suda, N., et al. (2008). Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell*, *135*(5), 825-837.

[46]Steppan, C. M., Crawford, D. T., Chidsey-Frink, K. L., et al. (2000). Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regulatory peptides*, *92*(1), 73-78.

[47]ŽOFKOVÁ, I., & Matucha, P. (2014). New Insights Into the Physiology of Bone Regulation: the Role of Neurohormones. *Physiol. Res*, *63*, 421-427.

[48]Yadav, V. K., & Ducy, P. (2010). Lrp5 and bone formation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1192*(1), 103-109.

[49]Kode, A., Mosialou, I., Silva, B. C., et al. (2012). FOXO1 orchestrates the bone-suppressing function of gut-derived serotonin. *The Journal of clinical investigation*, *122*(10), 3490.

[50]Diem, S. J., Blackwell, T. L., Stone, K. L., et al. (2007). Use of antidepressants and rates of hip bone loss in older women: the study of osteoporotic fractures. *Archives of Internal Medicine*, *167*(12), 1240-1245.

[51]Verdel, B. M., Souverein, P. C., Egberts, T. C., et al. (2010). Use of antidepressant drugs and risk of osteoporotic and non-osteoporotic fractures. *Bone*, *47*(3), 604-609.

[52]Couturier, J., Sy, A., Johnson, N., & Findlay, S. (2013). Bone mineral density in adolescents with eating disorders exposed to selective serotonin reuptake inhibitors. *Eating disorders*, *21*(3), 238-248.

[53]Sansone, R. A., & Sansone, L. A. (2012). SSRIs: bad to the bone?.*Innovations in clinical neuroscience*, *9*(7-8), 42.

[54]Koyama, H., Nakade, O., Takada, Y., et al. (2002). Melatonin at Pharmacologic Doses Increases Bone Mass by Suppressing Resorption Through Down-Regulation of the RANKL-Mediated Osteoclast Formation and Activation. *Journal of Bone and Mineral Research*, *17*(7), 1219-1229.

[55]Takeda, S. (2008). Central control of bone remodelling. *Journal of neuroendocrinology*, *20*(6), 802-807.

[56]Elefteriou, F. (2008). Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system. *Archives of biochemistry and biophysics*, *473*(2), 231-236.

[57]Brighton, P. J., Szekeres, P. G., & Willars, G. B. (2004). Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles. *Pharmacological reviews*, *56*(2), 231-248.

[58]Sato, S., Hanada, R., Kimura, A., et al. (2007). Central control of bone remodeling by neuromedin U. *Nature medicine*, *13*(10), 1234-1240.

[59]Ko, C. H., & Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics*, *15*(suppl 2), R271-R277.

[60]Zengin, A., Zhang, L., Herzog, H., et al. (2010). Neuropeptide Y and sex hormone interactions in humoral and neuronal regulation of bone and fat. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *21*(7), 411-418.

[61]Shi, Y. C., & Baldock, P. A. (2012). Central and peripheral mechanisms of the NPY system in the regulation of bone and adipose tissue. *Bone*, *50*(2), 430-436.

[62]Baldock, P. A., Allison, S. J., Lundberg, P., et al.(2007). Novel role of Y1 receptors in the coordinated regulation of bone and energy homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(26), 19092-19102.

[63]Kuo, L. E., Kitlinska, J. B., Tilan, J. U., et al. (2007). Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nature medicine*, *13*(7), 803-811.

[64]Baldock, P. A., Sainsbury, A., Couzens, M., et al. (2002). Hypothalamic Y2 receptors regulate bone formation. *Journal of Clinical Investigation*, *109*(7), 915-922.

[65]Sainsbury, A., Baldock, P. A., Schwarzer, C., et al. (2003). Synergistic effects of Y2 and Y4 receptors on adiposity and bone mass revealed in double knockout mice.*Molecular and cellular biology*, *23*(15), 5225-5233.

[66]Allison, S. J., Baldock, P., Sainsbury, A., et al.(2006). Conditional deletion of hypothalamic Y2 receptors reverts gonadectomy-induced bone loss in adult mice. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(33), 23436-23444.

[67]Henriksen, D. B., Alexandersen, P., Bjarnason, N. H., et al. (2003). Role of gastrointestinal hormones in postprandial reduction of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, *18*(12), 2180-2189.

[68]van der Velde, M., Delhanty, P., van der Eerden, B., et al. (2007). Ghrelin and bone. *Vitamins & Hormones*, *77*, 239-258.

[69]Misra, M., Miller, K. K., Tsai, P., et al. (2006). Elevated peptide YY levels in adolescent girls with anorexia nervosa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *91*(3), 1027-1033.

[70]Utz, A. L., Lawson, E. A., Misra, M., et al. (2008). Peptide YY (PYY) levels and bone mineral density (BMD) in women with anorexia nervosa. *Bone*, *43*(1), 135-139.

[71]Wortley, K. E., Garcia, K., Okamoto, H., et al. (2007). Peptide YY regulates bone turnover in rodents. *Gastroenterology*, *133*(5), 1534-1543.

[72]Idris, A. I., & Ralston, S. H. (2012). Role of cannabinoids in the regulation of bone remodeling. *Frontiers in endocrinology*, *3*.

[73]Tam, J., Alexandrovich, A., Di Marzo, et al. (2006, September). CB1, but not CB2 cannabinoid receptor mediates stimulation of bone formation induced by traumatic brain injury. In Journal of Bone and Mineral Research (Vol. 21, pp. S10-S10). 2025 M ST, NW, STE 800, Washington, DC 20036-3309 USA: Amer Soc Bone & Mineral Res.

[74]Elefteriou, F., Ahn, J. D., Takeda, S., et al. (2005). Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*, *434*(7032), 514-520.

[75]Cone, R. D. (2013). Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Studies*, *27*(7).

[76]Ahn, J. D., Dubern, B., Lubrano-Berthelier, C., et al. (2006). Cart overexpression is the only identifiable cause of high bone mass in melanocortin 4 receptor deficiency. *Endocrinology*, *147*(7), 3196-3202.

[77]Skerry, T. M., & Genever, P. G. (2001). Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends in pharmacological sciences*, *22*(4), 174-181.

[78]Kalariti, N., & Koutsilieris, M. (2004). Glutamatergic system in bone physiology. *In Vivo*, *18*(5), 621-628.

[79]Mason, D. J., Suva, L. J., Genever, P. G., et al. (1997). Mechanically regulated expression of a neural glutamate transporter in bone: a role for excitatory amino acids as osteotropic agents?. *Bone*, *20*(3), 199-205.

[80]Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., et al. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*, *391*(6664), 281-285.

[81]Breukel, A. I., Besselsen, E., Da Silva, F. H. L., & Ghijsen, W. E. (1998). A presynaptic N-methyl-d-aspartate autoreceptor in rat hippocampus modulating amino acid release from a cytoplasmic pool. *European Journal of Neuroscience*, *10*(1), 106-114.

[82]Genever, P. G., & Skerry, T. M. (2001). Regulation of spontaneous glutamate release activity in osteoblastic cells and its role in differentiation and survival: evidence for intrinsic glutamatergic signaling in bone. *The FASEB Journal*,*15*(9), 1586-1588.

[83]Peet, N. M., Grabowski, P. S., Laketic-Ljubojevic, I. R. A., & Skerry, T. M. (1999). The glutamate receptor antagonist MK801 modulates bone resorption in vitro by a mechanism predominantly involving osteoclast differentiation. *The FASEB Journal*, *13*(15), 2179-2185.

[84]Merle, B., Itzstein, C., Delmas, P. D., & Chenu, C. (2003). NMDA glutamate receptors are expressed by osteoclast precursors and involved in the regulation of osteoclastogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, *90*(2), 424-436.

[85]Itzstein, C., Espinosa, L., Delmas, P. D., & Chenu, C. (2000). Specific antagonists of NMDA receptors prevent osteoclast sealing zone formation required for bone resorption. *Biochemical and biophysical research communications*, *268*(1), 201-209.

[86]Lerner, U. H., & Persson, E. (2008). Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide.*J Musculoskelet Neuronal Interact*, *8*(2), 154-165.

[87]Kawase, T., & Burns, D. M. (1998). Calcitonin Gene-Related Peptide Stimulates Potassium Efflux through Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels and Produces Membrane Hyperpolarization in Osteoblastic UMR106 Cells 1. *Endocrinology*, *139*(8), 3492-3502.

[88]Vignery, A., & McCarthy, T. L. (1996). The neuropeptide calcitonin gene-related peptide stimulates insulin-like growth factor I production by primary fetal rat osteoblasts. *Bone*, *18*(4), 331-335.

[89]Li, J., Ahmad, T., Spetea, M., et al. (2001). Bone reinnervation after fracture: a study in the rat. *Journal of Bone and Mineral Research*, *16*(8), 1505-1510.

[90]Drissi, H., Hott, M., Marie, P. J., & Lasmoles, F. (1997). Expression of the CT/CGRP gene and its regulation by dibutyryl cyclic adenosine monophosphate in human osteoblastic cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, *12*(11), 1805-1814.

[91]Ballica, R., Valentijn, K., Khachatryan, A., et al. (1999). Targeted expression of calcitonin gene-related peptide to osteoblasts increases bone density in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, *14*(7), 1067-1074.

[92]Valentijn, K., Gutow, A. P., Troiano, N., Gundberg, C., Gilligan, J. P., & Vignery, A. (1997). Effects of calcitonin gene-related peptide on bone turnover in ovariectomized rats. *Bone*, *21*(3), 269-274.

[93]Schinke, T., Liese, S., Priemel, M., et al. (2004). Decreased Bone Formation and Osteopenia in Mice Lacking α-Calcitonin Gene-Related Peptide. *Journal of Bone and Mineral Research*, *19*(12), 2049-2056.

[94]Konttinen, Y. T., Imai, S., & Suda, A. (1996). Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling: state of the art. *Acta Orthopaedica*, *67*(6), 632-639.

[95]Groneberg, D. A., Rabe, K. F., & Fischer, A. (2006). Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: vasoactive intestinal polypeptide and its receptors. *European journal of pharmacology*, *533*(1), 182-194.

[96]Henning, R. J., & Sawmiller, D. R. (2001). Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovascular Research*, *49*(1), 27-37.

[97]Cooke, H. J. (2000). Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *915*(1), 77-80.

[98]Geldre, L. A. V., & Lefebvre, R. A. (2004). Interaction of NO and VIP in gastrointestinal smooth muscle relaxation. *Current pharmaceutical design*,*10*(20), 2483-2497.

[99]Fahrenkrug, J. (2001). Gut/brain peptides in the genital tract: VIP and PACAP.*Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, *61*(234), 35-39.

[100] Voice, J. K., Dorsam, G., Chan, R. C., et al. (2002). Immunoeffector and immunoregulatory activities of vasoactive intestinal peptide. *Regulatory peptides*, *109*(1), 199-208.

[101] Delgado, M., Pozo, D., & Ganea, D. (2004). The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacological Reviews*, *56*(2), 249-290.

[102] Gozes, I., & Furman, S. (2004). Potential clinical applications of vasoactive intestinal peptide: a selected update. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *18*(4), 623-640.

[103] Hohmann, E. L., Elde, R. P., Rysavy, J. A., Einzig, S., & Gebhard, R. L. (1986). Innervation of periosteum and bone by sympathetic vasoactive intestinal peptide-containing nerve fibers. *Science*, *232*(4752), 868-871.

[104] Lundberg, P., Lundgren, I., Mukohyama, H., et al. (2001). Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)/Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide Receptor Subtypes in Mouse Calvarial Osteoblasts: Presence of VIP-2 Receptors and Differentiation-Induced Expression of VIP-1 Receptors 1. *Endocrinology*, *142*(1), 339-347.

[105] Ransjö, M., Lie, A., Mukohyama, H., et al. (2000). Microisolated mouse osteoclasts express VIP-1 and PACAP receptors.*Biochemical and biophysical research communications*, *274*(2), 400-404.

[106] Mukohyama, H., Ransjö, M., Taniguchi, H., et al. (2000). The inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on osteoclast formation are associated with upregulation of osteoprotegerin and downregulation of RANKL and RANK. *Biochemical and biophysical research communications*, *271*(1), 158-163.

[107] Lundberg, P., Boström, I., Mukohyama, H., et al. (1999). Neuro-hormonal control of bone metabolism:: vasoactive intestinal peptide stimulates alkaline phosphatase activity and mRNA expression in mouse calvarial osteoblasts as well as calcium accumulation mineralized bone nodules. *Regulatory peptides*, *85*(1), 47-58.

[108] Delgado, M., Abad, C., Martinez, C., et al. (2001). Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nature medicine*, *7*(5), 563-568.

[109] Imai, S., & Matsusue, Y. (2002). Neuronal regulation of bone metabolism and anabolism: Calcitonin gene-related peptide-, substance P-, and tyrosine hydroxylase-containing nerves and the bone. *Microscopy research and technique*, *58*(2), 61-69.

[110] Goto, T., & Tanaka, T. (2002). Tachykinins and tachykinin receptors in bone.*Microscopy research and technique*, *58*(2), 91-97.

[111] Liu, D., Jiang, L. S., & Dai, L. Y. (2007). Substance P and its receptors in bone metabolism. *Neuropeptides*, *41*(5), 271-283.

[112] Shih, C., & Bernard, G. W. (1997). Neurogenic substance P stimulates osteogenesis in vitro. *Peptides*, *18*(2), 323-326.

[113] Goto, T., Yamaza, T., Kido, M. A., & Tanaka, T. (1998). Light-and electron-microscopic study of the distribution of axons containing substance P and the localization of neurokinin-1 receptor in bone. *Cell and tissue research*, *293*(1), 87-93.

[114] Matayoshi, T., Goto, T., Fukuhara, E., et al. (2005). Neuropeptide substance P stimulates the formation of osteoclasts via synovial fibroblastic cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *327*(3), 756-764.

[115] Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., & Goodman, C. S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell*, *75*(7), 1389-1399.

[116] Goodman, C. S., Kolodkin, A. L., Luo, Y., et al. (1999). Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. *Cell*, *97*(5), 551-552.

[117] Toyofuku, T., Yabuki, M., Kamei, J., et al. (2007). Semaphorin-4A, an activator for T-cell-mediated immunity, suppresses angiogenesis via Plexin-D1. *The EMBO journal*, *26*(5), 1373-1384.

[118] Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., et al. (2008). Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. *Developmental biology*, *321*(1), 251-262.

[119] Serini, G., Valdembri, D., Zanivan, S., et al. (2003). Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature*, *424*(6947), 391-397.

[120] Sekido, Y., Bader, S., Latif, F., et al.(1996). Human semaphorins A (V) and IV reside in the 3p21. 3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(9), 4120-4125.

[121] Suzuki, K., Kumanogoh, A., & Kikutani, H. (2008). Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nature immunology*, *9*(1), 17-23.

[122] Takamatsu, H., & Kumanogoh, A. (2012). Diverse roles for semaphorin− plexin signaling in the immune system. *Trends in immunology*, *33*(3), 127-135.

[123] Hayashi, M., Nakashima, T., Taniguchi, M., et al. (2012). Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature*, *485*(7396), 69-74.

[124] Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., et al. (2006). Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nature cell biology*, *8*(6), 615-622.

[125] Negishi-Koga, T., Shinohara, M., Komatsu, N., et al. (2011). Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nature medicine*, *17*(11), 1473-1480.

[126] Dacquin, R., Domenget, C., Kumanogoh, A., et al. (2011). Control of bone resorption by semaphorin 4D is dependent on ovarian function. *PLoS One*, *6*(10), e26627.

[127] Kang, S., & Kumanogoh, A. (2013, March). Semaphorins in bone development, homeostasis, and disease. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 24, No. 3, pp. 163-171). Academic Press.

[128] Behar, O., Golden, J. A., Mashimo, H., et al. (1996). Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature*, 383:525-8.

[129] Cawthorn, W. P., Bree, A. J., Yao, Y., et al. (2012). Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a β-catenin-dependent mechanism. *Bone*, *50*(2), 477-489.

[130] Nagashima, M., Sakai, A., Uchida, S., et al. (2005). Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur. *Bone*, *36*(3), 502-511.

[131] Angelisova, P., Drbal, K., Hilgert, I., & Hořejšf, V. (1999). Characterization of the Human Leukocyte GPI-Anchored Glycoprotein CDwl08 and its Relation to Other Similar Molecules. *Immunobiology*, *200*(2), 234-245.

[132] Xu, X., Ng, S., Wu, Z. L., et al. (1998). Human semaphorin K1 is glycosylphosphatidylinositol-linked and defines a new subfamily of viral-related semaphorins. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(35), 22428-22434.

[133] Delorme, G., Saltel, F., Bonnelye, E., et al. (2005). Expression and function of semaphorin 7A in bone cells. *Biology of the Cell*,*97*(7), 589-597.

[134] Koh, J. M., Oh, B., Lee, J. Y., et al. (2006). Association study of semaphorin 7a (sema7a) polymorphisms with bone mineral density and fracture risk in postmenopausal Korean women.*Journal of human genetics*, *51*(2), 112-117.

[135] Sutton, A. L., Zhang, X., Dowd, D. R., et al. (2008). Semaphorin 3B is a 1, 25-Dihydroxyvitamin D3-induced gene in osteoblasts that promotes osteoclastogenesis and induces osteopenia in mice. *Molecular Endocrinology*, *22*(6), 1370-1381.

[136] Yamashiro, T., Fukunaga, T., Yamashita, K., et al. (2001). Gene and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in bone and cartilage. *Bone*, *28*(4), 404-409.

[137] Camerino, C., Zayzafoon, M., Rymaszewski, M., et al. (2012). Central depletion of brain-derived neurotrophic factor in mice results in high bone mass and metabolic phenotype. *Endocrinology*,*153*(11), 5394-5405.

[138] Barbacid, M. (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *Journal of neurobiology*, *25*(11), 1386-1403.

[139] Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways.*Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *361*(1473), 1545-1564.

[140] Asaumi, K., Nakanishi, T., Asahara, H., et al. (2000). Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing.*Bone*, *26*(6), 625-633.

[141] Nakanishi, T., Takahashi, K., Aoki, C., et al. (1994). Expression of nerve growth factor family neurotrophins in a mouse osteoblastic cell line. *Biochemical and biophysical research communications*,*198*(3), 891-897.

[142] Mogi, M., Kondo, A., Kinpara, K., & Togari, A. (2000). Anti-apoptotic action of nerve growth factor in mouse osteoblastic cell line. *Life sciences*, *67*(10), 1197-1206.

[143] Rios, M., Fan, G., Fekete, C., et al. (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Molecular endocrinology*,*15*(10), 1748-1757.

[144] Unger, T. J., Calderon, G. A., Bradley, L. C., et al. (2007). Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *The Journal of Neuroscience*, *27*(52), 14265-14274.

[145] Kilian, O., Hartmann, S., Dongowski, N., et al. (2014). BDNF and its TrkB receptor in human fracture healing. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, *196*(5), 286-295.

[146] Kellenberger, S., Muller, K., Richener, H., & Bilbe, G. (1998). Formoterol and isoproterenol induce c-fos gene expression in osteoblast-like cells by activating β 2-adrenergic receptors. *Bone*, *22*(5), 471-478.

[147] Bonnet, N., Pierroz, D. D., & Ferrari, S. L. (2008). Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, *8*(2), 94-104.

[148] Chambers, T. J. (2000). Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *The Journal of pathology*, *192*(1), 4-13.

[149] Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., et al. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine reviews*, *20*(3), 345-357.

[150] Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., et al. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *cell*, *93*(2), 165-176.

[151] Takeuchi, T., Tsuboi, T., Arai, M., & Togari, A. (2001). Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochemical pharmacology*, *61*(5), 579-586.

[152] Bonnet, N., Brunet-Imbault, B., Arlettaz, A., et al. (2005). Alteration of trabecular bone under chronic beta2 agonists treatment. *Medicine and science in sports and exercise*, *37*(9), 1493-1501.

[153] Cavalie, H., Lac, G., Lebecque, P., et al. (2002). Influence of clenbuterol on bone metabolism in exercised or sedentary rats. *Journal of Applied Physiology*, *93*(6), 2034-2037.

[154] Bonnet, N., Benhamou, C. L., Brunet-Imbault, B., et al. (2005). Severe bone alterations under β2 agonist treatments: Bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats. *Bone*, *37*(5), 622-633.

[155] Hamrick, M. W., Della-Fera, M. A., Choi, Y. H., et al. (2005). Leptin treatment induces loss of bone marrow adipocytes and increases bone formation in leptin-deficient ob/ob mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, *20*(6), 994-1001.

[156] Hamrick, M. W., Pennington, C., Newton, D., et al. (2004). Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. *Bone*, *34*(3), 376-383.

[157] Aguirre, J., Buttery, L., O'Shaughnessy, M., et al. (2001). Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *The American journal of pathology*, *158*(1), 247-257.

[158] Armour, K. E., Armour, K. J., Gallagher, M. E., et al. (2001). Defective Bone Formation and Anabolic Response to Exogenous Estrogen in Mice with Targeted Disruption of Endothelial Nitric Oxide Synthase 1. *Endocrinology*, *142*(2), 760-766.

[159] Van't Hof, R. J., & Ralston, S. H. (1997). Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *Journal of Bone and Mineral Research*, *12*(11), 1797-1804.

[160] Van't Hof, R. J., Armour, K. J., Smith, L. M., et al. (2000). Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(14), 7993-7998.

[161] Löwik, C. W., Nibbering, P. H., Van de Ruit, M., & Papapoulos, S. E. (1994). Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption.*Journal of Clinical Investigation*, *93*(4), 1465.

[162] van’t Hof, R. J., MacPhee, J., Libouban, H., et al. (2004). Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. *Endocrinology*, *145*(11), 5068-5074.

[163] Karsenty, G. (2006). Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell metabolism*, *4*(5), 341-348.

[164] Takeuchi, Y. (2013). [Possible involvement of pituitary hormones in bone metabolism]. *Clinical calcium*, *23*(2), 195-202.

[165] Imam, A., Iqbal, J., Blair, H. C., et al. (2009). Role of the pituitary-bone axis in skeletal pathophysiology.*Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, *16*(6), 423-429.

[166] Sugitani, I., & Fujimoto, Y. (2011). Effect of postoperative thyrotropin suppressive therapy on bone mineral density in patients with papillary thyroid carcinoma: a prospective controlled study. *Surgery*, *150*(6), 1250-1257.

[167] Ma, R., Morshed, S., Latif, R., et al. (2011). The influence of thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor antibodies on osteoclastogenesis. *Thyroid*, *21*(8), 897-906.

[168] Sampath, T. K., Simic, P., Sendak, R., et al. (2007). Thyroid-Stimulating Hormone Restores Bone Volume, Microarchitecture, and Strength in Aged Ovariectomized Rats*. *Journal of Bone and Mineral Research*, *22*(6), 849-859.

[169] Sendak, R. A., Sampath, T. K., & McPherson, J. M. (2007). Newly reported roles of thyroid-stimulating hormone and follicle-stimulating hormone in bone remodelling. *International orthopaedics*, *31*(6), 753-757.

[170] Zofkova, I., & Hill, M. (2008). Biochemical markers of bone remodeling correlate negatively with circulating TSH in postmenopausal women. *Endocrine regulations*, *42*(4), 121-127.

[171] Isales, C. M., Zaidi, M., & Blair, H. C. (2010). ACTH is a novel regulator of bone mass. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1192*(1), 110-116.

[172] Cannon, J. G., Cortez-Cooper, M., Meaders, E., et al. (2010). Follicle-stimulating hormone (FSH), interleukin-1 (IL-1) and bone density in adult women. *The FASEB Journal*,*24*(1_MeetingAbstracts), 630-2.

[173] Raisz, L. G. (1988). Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *New England journal of medicine (USA)*.

[174] Inzucchi, S. E., & Robbins, R. J. (1994). Clinical review 61: Effects of growth hormone on human bone biology. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *79*(3), 691-694.

[175] Boot, A. M., Engels, M. A., Boerma, G. J., et al. 1997). Changes in Bone Mineral Density, Body Composition, and Lipid Metabolism during Growth Hormone (GH) Treatment in Children with GH Deficiency 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *82*(8), 2423-2428.

[176] Zamboni, G., Antoniazzi, F., Radetti, G.,et al. (1991). Effects of two different regimens of recombinant human growth hormone therapy on the bone mineral density of patients with growth hormone deficiency. *The Journal of pediatrics*, *119*(3), 483-485.

[177] O'Halloran, D. J., Tsatsoulis, A., Whitehouse, R. W., et al. (1993). Increased bone density after recombinant human growth hormone (GH) therapy in adults with

isolated GH deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *76*(5), 1344-134.

[178] Bachrach, L. K., Marcus, R., Ott, S. M., et al. (1998). Bone mineral, histomorphometry, and body composition in adults with growth hormone receptor deficiency. *Journal of Bone and Mineral Research*, *13*(3), 415-421.

[179] Wahner, H. W., Looker, A., Dunn, W. L., et al. (1994). Quality control of bone densitometry in a national health survey (NHANES III) using three mobile examination centers. *Journal of Bone and Mineral Research*, *9*(6), 951-960.

[180] Nicks, K. M., Fowler, T. W., & Gaddy, D. (2010). Reproductive hormones and bone. *Current osteoporosis reports*, *8*(2), 60-67.

[181] Clement-Lacroix, P., Ormandy, C., Lepescheux, L., et al. 1999). Osteoblasts Are a New Target for Prolactin: Analysis of Bone Formation in Prolactin Receptor Knockout Mice 1.*Endocrinology*, *140*(1), 96-105.

[182] Colaianni, G., Sun, L., Di Benedetto, A., et al. (2012). Bone marrow oxytocin mediates the anabolic action of estrogen on the skeleton. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(34), 29159-29167.

[183] Breuil, V., Amri, E. Z., Panaia-Ferrari, P., et al. (2011). Oxytocin and bone remodelling: relationships with neuropituitary hormones, bone status and body composition. *Joint Bone Spine*, *78*(6), 611-615.

[184] Lawson, E. A., Donoho, D. A., Blum, J. I., et al. (2011). Decreased nocturnal oxytocin levels in anorexia nervosa are associated with low bone mineral density and fat mass.*The Journal of clinical psychiatry*, *72*(11), 1546.

[185] Dumont, L. M., Wu, C. S. J., Tatnell, M. A., Cornish, J., & Mountjoy, K. G. (2005). Evidence for direct actions of melanocortin peptides on bone metabolism. *Peptides*, *26*(10), 1929-1935.

[186] Böhm, M., & Grässel, S. (2012). Role of proopiomelanocortin-derived peptides and their receptors in the osteoarticular system: from basic to translational research. *Endocrine reviews*, *33*(4), 623-651.

[187] Schweiger, U., Deuschle, M., Korner, A., et al. (1994). Low lumbar bone mineral density in patients with major depression. *American Journal of Psychiatry*, *151*(11), 1691-1693.

[188] Yirmiya, R., Goshen, I., Bajayo, A., et al. (2006). Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(45), 16876-16881.

[189] Childs, M., Armstrong, D. G., & Edelson, G. W. (1998). Is Charcot arthropathy a late sequela of osteoporosis in patients with diabetes mellitus?. *The Journal of foot and ankle surgery*, *37*(5), 437-439.

[190] Herbst, S. A., Jones, K. B., & Saltzman, C. L. (2004). Pattern of diabetic neuropathic arthropathy associated with the peripheral bone mineral density.*Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, *86*(3), 378-383.

[191] Jirkovska, A., Kasalický, P., Bouček, P., et al. (2001). Calcaneal ultrasonometry in patients with Charcot osteoarthropathy and its relationship with densitometry in the lumbar spine and femoral neck and with markers of bone turnover. *Diabetic medicine*, *18*(6), 495-500.

[192] Adami, S., Fossaluzza, V., Gatti, D., et al. (1997). Bisphosphonate therapy of reflex sympathetic dystrophy syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*, *56*(3), 201-204.

[193] Kurvers, H. A. (1998). Reflex sympathetic dystrophy: facts and hypotheses.*Vascular Medicine*, *3*(3), 207-214.

[194] Laroche, M., Redon-Dumolard, A., Mazieres, B., & Bernard, J. (1997). An X-ray absorptiometry study of reflex sympathetic dystrophy syndrome. *Revue du rhumatisme (English ed.)*, *64*(2), 106-111.

[195] Drummond, P. D., & Finch, P. M. (2004). Persistence of pain induced by startle and forehead cooling after sympathetic blockade in patients with complex regional pain syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *75*(1), 98-102.

[196] Ali, Z., Raja, S. N., Wesselmann, U., et al. (2000). Intradermal injection of norepinephrine evokes pain in patients with sympathetically maintained pain. *Pain*, *88*(2), 161-168.

[197] Albrecht, P. J., Hines, S., Eisenberg, E., et al. (2006). Pathologic alterations of cutaneous innervation and vasculature in affected limbs from patients with complex regional pain syndrome. *Pain*, *120*(3), 244-266.

[198] Breuer, B., Pappagallo, M., Ongseng, F., et al. (2008). An open-label pilot trial of ibandronate for complex regional pain syndrome. *The Clinical journal of pain*, *24*(8), 685-689.

[199] He, J. Y., Jiang, L. S., & Dai, L. Y. (2011). The roles of the sympathetic nervous system in osteoporotic diseases: A review of experimental and clinical studies. *Ageing research reviews*, *10*(2), 253-263.

[200] Kimble, R. B., Srivastava, S., Ross, F. P., et al. (1996). Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production.*Journal of Biological Chemistry*, *271*(46), 28890-28897.

[201] Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., et al. (2002). Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*, *288*(3), 321-333.

[202] Burt-Pichat, B., Lafage-Proust, M. H., Duboeuf, F., et al. (2005). Dramatic decrease of innervation density in bone after ovariectomy. *Endocrinology*, *146*(1), 503-510.

[203] Pierroz, D. D., Bouxsein, M. L., Rizzoli, R., & Ferrari, S. L. (2006). Combined treatment with a β-blocker and intermittent PTH improves bone mass and microarchitecture in ovariectomized mice. *Bone*, *39*(2), 260-267.

[204] Bonnet, N., Laroche, N., Vico, L., et al. (2006). Dose effects of propranolol on cancellous and cortical bone in ovariectomized adult rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *318*(3), 1118-1127.

[205] Zhang, W., Kanehara, M., Zhang, Y., et al. (2007). β-blocker and other analogous treatments that affect bone mass and sympathetic nerve activity in ovariectomized rats. *The American journal of Chinese medicine*,*35*(01), 89-101.

[206] Pasco, J. A., Henry, M. J., Sanders, K. M., et al. (2004). β-Adrenergic Blockers Reduce the Risk of Fracture Partly by Increasing Bone Mineral Density: Geelong Osteoporosis Study.*Journal of bone and mineral research*, *19*(1), 19-24.ù

[207] Bonnet, N., Gadois, C., McCloskey, E., et al. (2007). Protective effect of β blockers in postmenopausal women: influence on fractures, bone density, micro and macroarchitecture. *Bone*, *40*(5), 1209-1216.

[208] Bouxsein, M. L., Devlin, M. J., Glatt, V., et al. (2009). Mice lacking β-adrenergic receptors have increased bone mass but are not protected from deleterious skeletal effects of ovariectomy.*Endocrinology*, *150*(1), 144-152.

[209] Marenzana, M., De Souza, R. L., & Chenu, C. (2007). Blockade of beta-adrenergic signaling does not influence the bone mechano-adaptive response in mice. *Bone*, *41*(2), 206-215.

[210] Levasseur, R., Dargent-Molina, P., Sabatier, J. P., Marcelli, C., & Bréart, G. (2005). Beta-Blocker use, bone mineral density, and fracture risk in older women: results from the epidemiologie de l'osteoporose prospective study. *Journal of the American Geriatrics Society*, *53*(3), 550-552.

[211] Reid, I. R., Gamble, G. D., Grey, A. B.,et al. (2005). β-Blocker Use, BMD, and Fractures in the Study of Osteoporotic Fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*, *20*(4), 613-618.

[212] Rejnmark, L., Vestergaard, P., Kassem, M., et al. (2004). Fracture risk in perimenopausal women treated with beta-blockers. *Calcified tissue international*, *75*(5), 365-372.

[213] Sosa, M., Saavedra, P., de Tejada, M. J. G., et al. (2011). Beta-blocker use is associated with fragility fractures in postmenopausal women with coronary heart disease. *Aging clinical and experimental research*, *23*(2), 112-117.

[214] Ma, L., Couret, I., Micallef, J. P., et al. (2002). Use of bone biochemical markers with dual-energy X-ray absorptiometry for early determination of bone loss in persons with spinal cord injury. *Metabolism*, *51*(8), 958-963.

[215] Warden, S. J., Bennell, K. L., Matthews, B., et al. (2002). Quantitative ultrasound assessment of acute bone loss following spinal cord injury: a longitudinal pilot study. *Osteoporosis International*, *13*(7), 586-592.

[216] Kiratli, B. J., Smith, A. E., Nauenberg, T., et al. (2000). Bone mineral and geometric changes through the femur with immobilization due to spinal cord injury. *Journal of rehabilitation research and development*, *37*(2), 225.

[217] Uebelhart, D., Demiaux-Domenech, B., Roth, M., & Chantraine, A. (1995). Bone metabolism in spinal cord injured individuals and in others who have prolonged immobilisation. A review. *Spinal Cord*, *33*(11), 669-673.

[218] Frey-Rindova, P., De Bruin, E. D., Stussi, E., et al. (2000). Bone mineral density in upper and lower extremities during 12 months after spinal cord injury measured by peripheral quantitative computed tomography. *Spinal cord*, *38*(1), 26-32.

[219] Sabo, D., Blaich, S., Wenz, W., et al. (2001). Osteoporosis in patients with paralysis after spinal cord injury. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, *121*(1-2), 75-78.

[220] Liu, D., Zhao, C. Q., Li, H., et al. (2008). Effects of spinal cord injury and hindlimb immobilization on sublesional and supralesional bones in young growing rats. *Bone*, *43*(1), 119-125.

[221] Munakata, M., Kameyama, J., Kanazawa, M., et al. (1997). Circadian blood pressure rhythm in patients with higher and lower spinal cord injury: simultaneous evaluation of autonomic nervous activity and physical activity. *Journal of hypertension*, *15*(12), 1745-1749.

[222] Schmid, A., Huonker, M., Stahl, F., et al. (1998). Free plasma catecholamines in spinal cord injured persons with different injury levels at rest and during exercise. *Journal of the autonomic nervous system*, *68*(1), 96-100.

[223] Krassioukov, A. V., Bunge, R. P., Pucket, W. R., & Bygrave, M. A. (1999). The changes in human spinal sympathetic preganglionic neurons after spinal cord injury. *Spinal Cord*, *37*(1), 6-13.

[224] Zehnder, Y., Lüthi, M., Michel, D., et al. (2004). Long-term changes in bone metabolism, bone mineral density, quantitative ultrasound parameters, and fracture

incidence after spinal cord injury: a cross-sectional observational study in 100 paraplegic men.*Osteoporosis international*, *15*(3), 180-189.

[225] Elloumi, M., Courteix, D., Sellami, S., et al. (2006). Bone mineral content and density of Tunisian male rugby players: differences between forwards and backs. *International journal of sports medicine*, *27*(5), 351-358.

[226] McClanahan, B. S., Ward, K. D., Vukadinovich, C., et al. (2002). Bone mineral density in triathletes over a competitive season. *Journal of sports sciences*, *20*(6), 463-469.

[227] Baek, K., & Bloomfield, S. A. (2009). β-Adrenergic Blockade and Leptin Replacement Effectively Mitigate Disuse Bone Loss. *Journal of bone and mineral research*, *24*(5), 792-799.

[228] Kondo, H., Nifuji, A., Takeda, S., et al. 2005). Unloading induces osteoblastic cell suppression and osteoclastic cell activation to lead to bone loss via sympathetic nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(34), 30192-30200.

[229] Levasseur, R., Sabatier, J. P., Potrel-Burgot, C., et al. (2003). Sympathetic nervous system as transmitter of mechanical loading in bone. *Joint Bone Spine*, *70*(6), 515-519.

[230] Judex, S., Gupta, S., & Rubin, C. (2009). Regulation of mechanical signals in bone. *Orthodontics & craniofacial research*, *12*(2), 94-104.

[231] de Souza, R. L., Pitsillides, A. A., Lanyon, L. E., et al. (2005). Sympathetic Nervous System Does Not Mediate the Load-Induced Cortical New Bone Formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, *20*(12), 2159-2168.

[232] Sugiyama, T., Price, J. S., & Lanyon, L. E. (2010). Functional adaptation to mechanical loading in both cortical and cancellous bone is controlled locally and is confined to the loaded bones. *Bone*, *46*(2), 314-321.

[233] Rossi A et al. (2006). Psichiatria e Neuroscienze. Masson Ed.

[234] Altindag, O., Altindag, A., Asoglu, M., et al. (2007). Relation of cortisol levels and bone mineral density among premenopausal women with major depression. *International journal of clinical practice*, *61*(3), 416-420.

[235] Jacka, F. N., Pasco, J. A., Henry, M. J., et al. (2005). Depression and bone mineral density in a community sample of perimenopausal women: Geelong Osteoporosis Study.*Menopause*, *12*(1), 88-91.

[236] Kahl, K. G., Greggersen, W., Rudolf, S., et al. (2006). Bone mineral density, bone turnover, and osteoprotegerin in depressed women with and without borderline personality disorder. *Psychosomatic medicine*, *68*(5), 669-674.

[237] Mussolino, M. E. (2005). Depression and hip fracture risk: the NHANES I epidemiologic follow-up study. *Public health reports*, *120*(1), 71.

[238] Petronijević, M., Petronijević, N., Ivković, M., et al. (2008). Low bone mineral density and high bone metabolism turnover in premenopausal women with unipolar depression. *Bone*,*42*(3), 582-590.

[239] Kavuncu, V., Kuloglu, M., Kaya, A., et al.(2002). Bone metabolism and bone mineral density in premenopausal women with mild depression. *Yonsei Medical Journal*, *43*(1), 101-108.

[240] Whooley, M. A., Cauley, J. A., Zmuda, J. M., et al. (2004). Depressive symptoms and bone mineral density in older men. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, *17*(2), 88-92.

[241] Yazıcı, A. E., Bagis, S., Tot, Ş., et al. (2005). Bone mineral density in premenopausal women with major depression. *Joint Bone Spine*, *72*(6), 540-543.

[242] Cizza, G., Primma, S., Coyle, M., et al. (2010). Depression and osteoporosis: a research synthesis with meta-analysis.*Hormone and metabolic research= Hormon- und Stoffwechselforschung= Hormones et metabolisme*, *42*(7), 467.

[243] Wu, Q., Magnus, J. H., Liu, J., et al. (2009). Depression and low bone mineral density: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Osteoporosis international*, *20*(8), 1309-1320.

[244] Yirmiya, R., & Bab, I. (2009). Major depression is a risk factor for low bone mineral density: a meta-analysis. *Biological psychiatry*, *66*(5), 423-432.

[245] Bab, I. A., & Yirmiya, R. (2010). Depression and bone mass. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1192*(1), 170-175.

[246] Carroll, B. J., Cassidy, F., Naftolowitz, D., et al. (2007). Pathophysiology of hypercortisolism in depression. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, *115*(s433), 90-103.

[247] Manelli, F., & Giustina, A. (2000). Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *11*(3), 79-85.

[248] Bajayo, A., Goshen, I., Feldman, S., et al. (2005). Central IL-1 receptor signaling regulates bone growth and mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(36), 12956-12961.

[249] Cizza, G., Ravn, P., Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (2001). Depression: a major, unrecognized risk factor for osteoporosis?. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *12*(5), 198-203.

[250] Franchimont, N., Wertz, S., & Malaise, M. (2005). Interleukin-6: an osteotropic factor influencing bone formation?. *Bone*, *37*(5), 601-606.

[251] Reynolds, R. M., Dennison, E. M., Walker, B. R., et al. (2005). Cortisol secretion and rate of bone loss in a population-based cohort of elderly men and women. *Calcified tissue international*, *77*(3), 134-138.

[252] Alesci, S., Martinez, P. E., Kelkar, S., et al. (2005). Major depression is associated with significant diurnal elevations in plasma interleukin-6 levels, a shift of its circadian rhythm, and loss of physiological complexity in its secretion: clinical implications. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *90*(5), 2522-2530.

[253] Kinjo, M., Setoguchi, S., Schneeweiss, S., & Solomon, D. H. (2005). Bone mineral density in subjects using central nervous system-active medications.*The American journal of medicine*, *118*(12), 1414-e7.

[254] Misra, M., Papakostas, G. I., & Klibanski, A. (2004). Effects of psychiatric disorders and psychotropic medications on prolactin and bone metabolism. *The Journal of clinical psychiatry*, *65*(12), 1607-18.

[255] O'Keane, V., & Meaney, A. M. (2005). Antipsychotic drugs: a new risk factor for osteoporosis in young women with schizophrenia?. *Journal of clinical psychopharmacology*, *25*(1), 26-31.

[256] Richards, J. B., Papaioannou, A., Adachi, J. D., et al. (2007). Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the risk of fracture. *Archives of internal medicine*, *167*(2), 188-194.

[257] Williams, L. J., Henry, M. J., Berk, M., et al. (2008). Selective serotonin reuptake inhibitor use and bone mineral density in women with a history of depression. *International clinical psychopharmacology*, *23*(2), 84-87.

[258] Invernizzi, M., Carda, S., Viscontini, G. S., & Cisari, C. (2009). Osteoporosis in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, *15*(5), 339-346.

[259] Bikle, D. D. (2008). Integrins, insulin like growth factors, and the skeletal response to load. *Osteoporosis International*, *19*(9), 1237-1246.

[260] Sato, Y., Honda, Y., Iwamoto, J., et al. (2005). Abnormal bone and calcium metabolism in immobilized Parkinson's disease patients.*Movement disorders*, *20*(12), 1598-1603.

[261] Sato, Y., Kikuyama, M., & Oizumi, K. (1997). High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in Parkinson's disease. *Neurology*, *49*(5), 1273-1278.

[262] Bellomo, G., Santambrogio, L., Fiacconi, M., et al. (1991). Plasma profiles of adrenocorticotropic hormone, cortisol, growth hormone and prolactin in patients with untreated Parkinson's disease. *Journal of neurology*, *238*(1), 19-22.

[263] Sato, Y., Honda, Y., Kaji, M., et al. (2002). Amelioration of osteoporosis by menatetrenone in elderly female Parkinson’s disease patients with vitamin D deficiency. *Bone*, *31*(1), 114-118.

[264] Sato, Y., Kaji, M., Tsuru, T., & Oizumi, K. (2001). Risk factors for hip fracture among elderly patients with Parkinson’s disease. *Journal of the neurological sciences*, *182*(2), 89-93.

[265] Evatt, M. L., DeLong, M. R., Khazai, N., et al. (2008). Prevalence of vitamin d insufficiency in patients with Parkinson disease and Alzheimer disease. *Archives of neurology*, *65*(10), 1348-1352.

[266] Sato, Y., Kaji, M., Tsuru, T., et al. (2002). Vitamin K deficiency and osteopenia in vitamin D–deficient elderly women with Parkinson's disease. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, *83*(1), 86-91

[267] Dusso, A., Brown, A. J., & Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D and renal failure.*Vitamin D. 2nd ed. San Diego, CA: Elsevier Academic*, 1313-38.

[268] Newmark, H. L., & Newmark, J. (2007). Vitamin D and Parkinson's disease—a hypothesis. *Movement disorders*, *22*(4), 461-468.

[269] Drevets, W. C., Price, J. L., & Furey, M. L. (2008). Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain structure and function*, *213*(1-2), 93-118.

[270] Barsony, J., & Prufer, K. (2002). Vitamin D receptor and retinoid X receptor interactions in motion. *Vitamins & Hormones*, *65*, 345-376.

[271] Lorefält, B., Ganowiak, W., Pålhagen, S., et al. (2004). Factors of importance for weight loss in elderly patients with Parkinson's disease. *Acta neurologica scandinavica*, *110*(3), 180-187.

[272] Waxman, M. J., Durfee, D., Moore, M., et al. (1990). Nutritional aspects and swallowing function of patients with Parkinson's disease. *Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, *5*(5), 196-199.

[273] Sato, Y., Iwamoto, J., Kanoko, T., & Satoh, K. (2005). Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in elderly women with Parkinson’s disease. *The American journal of medicine*, *118*(11), 1250-1255.ù

[274] Blandini, F., Fancellu, R., Martignoni, E., et al. (2001). Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. *Clinical chemistry*, *47*(6), 1102-1104.

[275] Johansson, C., & Skoog, I. (1996). A population-based study on the association between dementia and hip fractures in 85-year olds. *Aging Clinical and Experimental Research*, *8*(3), 189-196.

[276] Kipen, E., Helme, R. D., Wark, J. D., & Flicker, L. (1995). Bone density, vitamin D nutrition, and parathyroid hormone levels in women with dementia.*Journal of the American Geriatrics Society*, *43*(10), 1088-1091.

[277] Lui, L. Y., Stone, K., Cauley, J. A., et al. (2003). Bone loss predicts subsequent cognitive decline in older women: the study of osteoporotic fractures. *Journal of the American Geriatrics Society*, *51*(1), 38-43.

[278] Sato, Y., Asoh, T., & Oizumi, K. (1998). High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in elderly women with Alzheimer's disease.*Bone*, *23*(6), 555-557.

[279] Yaffe, K., Browner, W., Cauley, J., et al. (1999). Association between bone mineral density and cognitive decline in older women. *Journal of the American Geriatrics Society*, *47*(10), 1176-1182.

[280] Zhang, Y., Seshadri, S., Ellison, R. C., et al. (2001). Bone mineral density and verbal memory impairment: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *American journal of epidemiology*, *154*(9), 795-802.

[281] Carlsten, H. (2005). Immune responses and bone loss: the estrogen connection. *Immunological reviews*, *208*(1), 194-206.

[282] Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., et al. (2000). Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *908*(1), 244-254.

[283] Rachon, D., Mysliwska, J., Suchecka-Rachon, K., et al. (2002). Effects of oestrogen deprivation on interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells of postmenopausal women.*Journal of Endocrinology*, *172*(2), 387-395.

[284] Luckhaus, C., Mahabadi, B., Grass-Kapanke, B., et al. (2009). Blood biomarkers of osteoporosis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission*,*116*(7), 905-911.

[285] Tan, Z. S., Seshadri, S., Beiser, A., et al. (2005). Bone mineral density and the risk of Alzheimer disease.*Archives of neurology*, *62*(1), 107-111.

[286] Hofbauer, L. C., Cepok, S., & Hemmer, B. (2004). Osteoprotegerin is highly expressed in the spinal cord and cerebrospinal fluid. *Acta neuropathologica*,*107*(6), 575-577.

[287] Kartsogiannis, V., Zhou, H., Horwood, N. J., et al. (1999). Localization of RANKL (receptor activator of NFκB ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone*, *25*(5), 525-534.

[288] Uberti, D., Cantarella, G., Facchetti, F., et al. (2004). TRAIL is expressed in the brain cells of Alzheimer's disease patients. *Neuroreport*, *15*(4), 579-581.

[289] Iolascon, G., Cervone, M., Gimigliano, R., et al. (2011). Neuropsychiatric disorders in hip fracture. *Clinical cases in mineral and bone metabolism*, *8*(3), 49.

[290] Voshaar, R. C. O., Banerjee, S., Horan, M., et al. (2007). Predictors of incident depression after hip fracture surgery. *The American journal of geriatric psychiatry*, *15*(9), 807-814.

[291] Rizzoli, R., Bruyère, O., Cannata-Andia, J. B., et al. (2009). Management of osteoporosis in the elderly. *Current medical research and opinion*, *25*(10), 2373-2387.

[292] Lai, S. W., Chen, Y. L., Lin, C. L., & Liao, K. F. (2013). Alzheimer's Disease Correlates with Greater Risk of Hip Fracture in Older People: A Cohort in Taiwan. *Journal of the American Geriatrics Society*, *61*(7), 1231-1232.

[293] Lenze, E. J., Munin, M. C., Skidmore, E. R., et al. (2007). Onset of Depression in Elderly Persons After Hip Fracture: Implications for Prevention and Early Intervention of Late-Life Depression. *Journal of the American Geriatrics Society*, *55*(1), 81-86.

[294] Bruggemann, L., Nixon, R. D., & Cavenett, T. (2007). Predicting acute anxiety and depression following hip fracture. *Journal of behavioral medicine*, *30*(2), 97-105.

[295] Juliebø, V., Bjøro, K., Krogseth, M., et al. (2009). Risk factors for preoperative and postoperative delirium in elderly patients with hip fracture. *Journal of the American Geriatrics Society*, *57*(8), 1354-1361.

[296] Ferrucci, L., Russo, C., Lauretani, F., et al. (2002). A role for sarcopenia in late-life osteoporosis. *Aging clinical and experimental research*, *1*(14), 1-4.

[297] Ensrud, K. E., Ewing, S. K., Taylor, B. C., et al. (2007). Frailty and risk of falls, fracture, and mortality in older women: the study of osteoporotic fractures. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *62*(7), 744-751.

[298] Bellamy, N. (2008). *WOMAC osteoarthritis index: user guide IX*. Nicholas Bellamy.

[299] Yesavage, J. A., Brink, T. L., Rose, T. L., et al. (1983). Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. *Journal of psychiatric research*, *17*(1), 37-49.

[300] Crichton, N. (2001). Visual analogue scale (VAS). *J Clin Nurs*, *10*(5), 706-6.

[301] Granger, C. V., Dewis, L. S., Peters, N. C., et al. (1979). Stroke rehabilitation: analysis of repeated Barthel index measures.*Archives of physical medicine and rehabilitation*, *60*(1), 14-17.

[302] Kristensen, M. T., Andersen, L., Bech-Jensen, R., et al. (2009). High intertester reliability of the cumulated ambulation score for the evaluation of basic mobility in patients with hip fracture. *Clinical rehabilitation*.

[303] Charlson, M. E., Pompei, P., Ales, K. L., & MacKenzie, C. R. (1987). A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *Journal of chronic diseases*, *40*(5), 373-383.

[304] Wong Sweet Fun. (2011). Management of functional decline in older adults. *The Singapore Family Physician. apr-jun,* vol 37, n. 2 (supplement); 1:17.

[305] Bitsch, M., Foss, N., Kristensen, B., & Kehlet, H. (2004). Pathogenesis of and management strategies for postoperative delirium after hip fracture a review.*Acta Orthopaedica*, *75*(4), 378-389.

[306] Givens, J. L., Sanft, T. B., & Marcantonio, E. R. (2008). Functional recovery after hip fracture: the combined effects of depressive symptoms, cognitive impairment, and delirium. *Journal of the American Geriatrics Society*, *56*(6), 1075-1079.

[307] Gala, C., Peirone, A., Bellodi, S., Pasquale, L., & Redaelli, C. (2008). Depressione e deterioramento cognitivo nell'anziano. *G GERONtOL*, *56*(1), 25-33.

[308] Vochteloo, A. J., van der Burg, B. L. B., Röling, M. A., et al. (2012). Contralateral hip fractures and other osteoporosis-related fractures in hip fracture patients: incidence and risk factors. An observational cohort study of 1,229 patients.*Archives of orthopaedic and trauma surgery*, *132*(8), 1191-1197.

[309] Colón-Emeric, C., Kuchibhatla, M., Pieper, C., et al. (2003). The contribution of hip fracture to risk of subsequent fractures: data from two longitudinal studies. *Osteoporosis international*, *14*(11), 879-883.

[310] Mossey, J. M., Knott, K., & Craik, R. (1990). The effects of persistent depressive symptoms on hip fracture recovery. *Journal of Gerontology*, *45*(5), M163-M168.

[311] Fredman, L., Hawkes, W. G., Black, S., et al. (2006). Elderly patients with hip fracture with positive affect have better functional recovery over 2 years. *Journal of the American Geriatrics Society*,*54*(7), 1074-1081.

[312] Holmes, J., & House, A. (2000). Psychiatric illness predicts poor outcome after surgery for hip fracture: a prospective cohort study. *Psychological medicine*, *30*(04), 921-929.

[313] Mezuk, B., Eaton, W. W., & Golden, S. H. (2008). Depression and osteoporosis: epidemiology and potential mediating pathways. *Osteoporosis International*, *19*(1), 1-12.

[314] Birge, S. J. (2008). Osteoporotic fractures: a brain or bone disease?. *Current osteoporosis reports*, *6*(2), 57-61.

[315] Whooley, M. A., Kip, K. E., Cauley, J. A., et al. (1999). Depression, falls, and risk of fracture in older women.*Archives of internal medicine*, *159*(5), 484-490.

[316] Korpelainen, R., Korpelainen, J., Heikkinen, J., et al. (2006). Lifelong risk factors for osteoporosis and fractures in elderly women with low body mass index—a population-based study. *Bone*,*39*(2), 385-391.

[317] Kelsey, J. L., Prill, M. M., Keegan, T. H., et al. (2005). Reducing the risk for distal forearm fracture: preserve bone mass, slow down, and don't fall!. *Osteoporosis International*, *16*(6), 681-690.

[318] Søgaard, A. J., Joakimsen, R. M., Tverdal, A., et al. (2005). Long-term mental distress, bone mineral density and non-vertebral fractures. The Tromsø Study. *Osteoporosis international*, *16*(8), 887-897.

[319] Forsén, L., Meyer, H. E., Søgaard, A. J., et al. (1999). Mental distress and risk of hip fracture. Do broken hearts lead to broken bones?. *Journal of epidemiology and community health*, *53*(6), 343-347.

[320] Michelson, D., Stratakis, C., Hill, L., et al. (1996). Bone mineral density in women with depression. *New England Journal of Medicine*, *335*(16), 1176-1181.

[321] Halbreich, U., Rojansky, N., Palter, S., et al. (1995). Decreased bone mineral density in medicated psychiatric patients. *Psychosomatic medicine*, *57*(5), 485-491.

[322] Coelho, R., Silva, C., Maia, A., et al. (1999). Bone mineral density and depression: a community study in women. *Journal of psychosomatic research*, *46*(1), 29-35.

[323] Yazıcı, K. M., Akıncı, A., Sütçü, A., & Özçakar, L. (2003). Bone mineral density in premenopausal women with major depressive disorder. *Psychiatry research*, *117*(3), 271-275.

[324] Kahl, K. G., Rudolf, S., Stoeckelhuber, B. M., et al.(2014). Bone mineral density, markers of bone turnover, and cytokines in young women with borderline personality disorder with and without comorbid major depressive disorder. *American Journal of Psychiatry*.

[325] Robbins, J., Hirsch, C., Whitmer, R., et al. (2001). The association of bone mineral density and depression in an older population. *Journal of the American Geriatrics Society*, *49*(6), 732-736.

[326] Mussolino, M. E., Jonas, B. S., & Looker, A. C. (2004). Depression and bone mineral density in young adults: results from NHANES III. *Psychosomatic medicine*, *66*(4), 533-537.

[327] Wong, S. Y., Lau, E. M., Lynn, H., et al. (2005). Depression and bone mineral density: is there a relationship in elderly Asian men? Results from Mr. Os (Hong Kong). *Osteoporosis international*, *16*(6), 610-615.

[328] Reginster, J. Y., Deroisy, R., Paul, I., et al. (1999). Depressive vulnerability is not an independent risk factor for osteoporosis in postmenopausal women. *Maturitas*, *33*(2), 133-137.

[329] Amsterdam, J. D., & Hooper, M. B. (1998). Bone density measurement in major depression. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *22*(2), 267-277.

[330] Herrán, A., Amado, J. A., García-Unzueta, M. T., et al. (2000). Increased bone remodeling in first-episode major depressive disorder. *Psychosomatic medicine*, *62*(6), 779-782.

[331] Forsen, L., Søgaard, A. J., Meyer, H. E., et al. (1999). Survival after hip fracture: short-and long-term excess mortality according to age and gender. *Osteoporosis International*, *10*(1), 73-78.

[332] Kanis, J. A., Johnell, O., Oden, A., et al. (2001). Ten year probabilities of osteoporotic fractures according to BMD and diagnostic thresholds. *Osteoporosis International*, *12*(12), 989-995.

[333] Järvinen, T. L., Sievänen, H., Khan, K. M., et al. (2008). Shifting the focus in fracture prevention from osteoporosis to falls. *BMJ: British Medical Journal*, *336*(7636), 124.

[334] Parkkari, J., Kannus, P., Palvanen, M., et al. (1999). Majority of hip fractures occur as a result of a fall and impact on the greater trochanter of the femur: a prospective controlled hip fracture study with 206 consecutive patients. *Calcified Tissue International*,*65*(3), 183-187.

[335] Youm, T., Koval, K. J., Kummer, F. J., & Zuckerman, J. D. (1999). Do all hip fractures result from a fall?. *American journal of orthopedics (Belle Mead, NJ)*,*28*(3), 190-194.

[336] Greendale, G. A., Unger, J. B., Rowe, J. W., & Seeman, T. E. (1999). The relation between cortisol excretion and fractures in healthy older people: Results

from the MacArthur studies-Mac. *Journal of the American Geriatrics Society*, *47*(7), 799-803.

[337] Carroll, B. J., Curtis, G. C., Davies, B. M., et al. (1976). Urinary free cortisol excretion in depression. *Psychol Med*, *6*(1), 43-50.

[338] Kann, P., Laudes, M., Piepkorn, B., et al. (2001). Suppressed levels of serum cortisol following high-dose oral dexamethasone administration differ between healthy postmenopausal females and patients with established primary vertebral osteoporosis. *Clinical rheumatology*, *20*(1), 25-29.

[339] Ferrucci, L., Guralnik, J. M., Studenski, S., et al. (2004). Interventions on Frailty Working Group: Designing randomized, controlled trials aimed at preventing or delaying functional decline and disability in frail, older persons: a consensus report. *J Am Geriatr Soc*,*52*(4), 625-634.

[340] Crepaldi, G., & Maggi, S. (2004). Sarcopenia and osteoporosis: A hazardous duet. *Journal of endocrinological investigation*, *28*(10 Suppl), 66-68.

[341] Di Monaco, M., Vallero, F., Di Monaco, R., et al. (2006). 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone, and functional recovery after hip fracture in elderly patients. *Journal of bone and mineral metabolism*, *24*(1), 42-47.

[342] Kristensen, M. T., Andersen, L., Bech-Jensen, R., et al. (2009). High intertester reliability of the cumulated ambulation score for the evaluation of basic mobility in patients with hip fracture. *Clinical rehabilitation*.

[343] Foss, N. B., Kristensen, M. T., & Kehlet, H. (2006). Prediction of postoperative morbidity, mortality and rehabilitation in hip fracture patients: the cumulated ambulation score. *Clinical rehabilitation*, *20*(8), 701-708.