

il Diabete

Vol. 34, N. 2, luglio 2022



– RASSEGNE

Epatite C cronica e diabete: una relazione bidirezionale complessa

Effetti pleiotropici della metformina: hanno rilevanza clinica?

Le reali contro-indicazioni all'utilizzo della metformina

Metformina farmaco anti-aging? Tra promesse ed evidenze

– EDITORIALI

La disfunzione sessuale negli uomini e nelle donne con diabete: una riflessione sulle complicazioni?

– AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA

Il trapianto di cellule staminali nel trattamento della disfunzione erettile

– JOURNAL CLUB

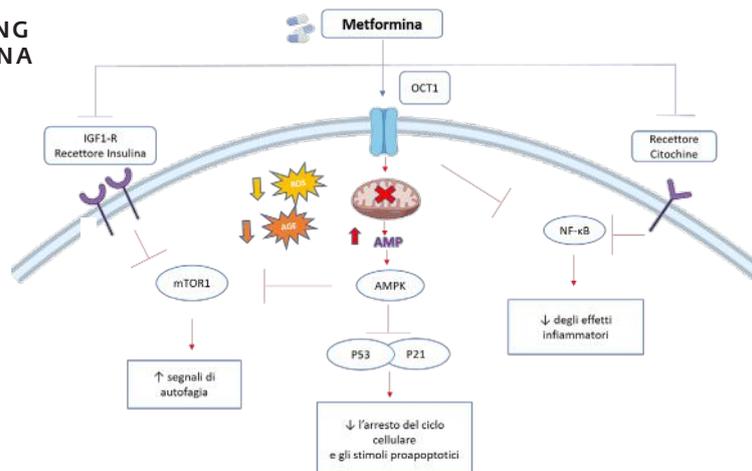
– MEDICINA TRASLAZIONALE

Fallimento β -cellulare nel diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2: esistono meccanismi comuni?

– AGGIORNAMENTO IN TEMA DI TECNOLOGIE

Verso una nuova fonte di β -cellule per la cura del diabete mellito di tipo 1

EFFETTI ANTI-AGING DELLA METFORMINA



il Diabete

Organo ufficiale della
Società Italiana di Diabetologia

Direttore Scientifico

Sebastiano Squatrito (Catania)

Co-direttori

Massimiliano Cavallo (Terni, YoSID)

Carla Greco (Modena, YoSID)

Giuseppe Defeudis (Roma)

Gloria Formoso (Chieti)

Lucia Frittitta (Catania)

Simona Frontoni (Roma)

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

Comitato di Redazione

Benedetta Bonora (Padova)

Fabio Broglio (Torino)

Stefano Ciardullo (Milano)

Francesca Cinti (Roma-Cattolica)

Giuseppe Daniele (Pisa)

Angela Dardano (Pisa)

Ilaria Dicembrini (Firenze)

Antonio Di Pino (Catania)

Francesca Fiory (Napoli)

Luigi Laviola (Bari)

Anna Leonardini (Bari)

Roberta Lupoli (Napoli-Federico II)

Ernesto Maddaloni (Roma-Sapienza)

Daria Maggi (Roma-Campus)

Alessandro Mantovani (Verona)

Lorella Marselli (Pisa)

Matteo Monami (Firenze)

Mario Luca Morieri (Padova)

Antonio Nicolucci (Pescara)

Emanuela Orsi (Milano)

Pia Clara Pafundi (Napoli-Vanvitelli)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Francesca Porcellati (Perugia)

Ivana Rabbone (Torino)

Elena Succurro (Catanzaro)

Dario Tuccinardi (Roma-Campus)

CONSIGLIO DIRETTIVO SID

Presidente

Agostino Consoli (Chieti)

Presidente Eletto

Angelo Avogaro (Padova)

Tesoriere

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

Segretario

Gloria Formoso (Chieti-Pescara)

Consiglieri

Fabio Broglio (Torino)

Massimo Federici (Roma)

Luigi Laviola (Bari)

Giuseppe Lepore (Bergamo)

Raffaele Napoli (Napoli)

Massimiliano Petrelli (Ancona)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Salvatore Piro (Catania)

Sabrina Prudente (Roma)

Anna Solini (Pisa)

Giovanni Targher (Verona)

UFFICIO DI PRESIDENZA SID 2020-2022

Angelo Avogaro (Padova)

Agostino Consoli (Chieti)

Francesco Purrello (Catania)

Responsabili di Redazione

Andrea Tumminia (Catania)

Agostino Milluzzo (Catania)

Rosario Le Moli (Catania)

Sommario

– **RASSEGNE** A CURA DI LUCIA FRITTITTA E SEBASTIANO SQUATRITO

79 **Epatite C cronica e diabete: una relazione bidirezionale complessa**

Stefano Ciardullo, Alessandro Mantovani, Antonio Ciaccio, Marco Carbone, Pietro Invernizzi, Gianluca Perseghin

CONTROVERSIE IN DIABETOLOGIA: METFORMINA, 50 ANNI E NON SENTIRLI

89 **Effetti pleiotropici della metformina: hanno rilevanza clinica?**

Giorgio Sesti

95 **Le reali contro-indicazioni all'utilizzo della metformina**

Salvatore Piro

104 **Metformina farmaco anti-aging? Tra promesse ed evidenze**

Vittoria Cataldo, Giuseppe Paolisso

– **EDITORIALI** A CURA DI SIMONA FRONTONI

110 **La disfunzione sessuale negli uomini e nelle donne con diabete: una riflessione sulle complicazioni?**

Fiorenza Pesce, Alexi Di Cristofaro, Andrea Sansone, Danielle Mollaioli e Emmanuele A. Jannini

121 – **AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA** A CURA DI MARTA LETIZIA HRIBAL

Il trapianto di cellule staminali nel trattamento della disfunzione erettile

123 – **JOURNAL CLUB** A CURA DI MARTA LETIZIA HRIBAL

125 – **MEDICINA TRASLAZIONALE: APPLICAZIONI CLINICHE DELLA RICERCA DI BASE** A CURA DI GIUSEPPE DEFEUDIS

Fallimento β -cellulare nel diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2: esistono meccanismi comuni?

Nicola Marrano, Giuseppina Biondi, Francesco Giorgino, Annalisa Natalicchio

– **AGGIORNAMENTO IN TEMA DI TECNOLOGIE** A CURA DI GLORIA FORMOSO

140 **Verso una nuova fonte di β -cellule per la cura del diabete mellito di tipo 1**

Valentina Zamarian, Silvia Pellegrini, Valeria Sordi

GOLDEN CIRCLE



il Diabete

Vol. 34, N. 2, luglio 2022

Direzione Scientifica

Sebastiano Squatrito, Catania

Direttore Responsabile

Stefano Melloni

Associato all'Unione Stampa Periodica Italiana



Copyright © 2022 SID

Società Italiana di Diabetologia

CC BY 4.0 License

ISBN online 979-12-5477-111-2

ISSN online 1720-8335

DOI 10.30682/ildia2202

Nessuna parte può essere duplicata o riprodotta senza l'autorizzazione scritta dell'Editore.

Fondazione Bologna University Press

Via Saragozza 10, 40123 Bologna

tel. (+39) 051 232 882; fax (+39) 051 221 019

e-mail: info@buponline.com

www.buponline.com

Periodico riconosciuto "di elevato valore culturale" dal Ministero per i Beni e le Attività Culturali

Autorizzazione Tribunale di Milano

n. 706 del 2/11/1988

Avvertenza ai lettori

L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni in merito a dosaggio e impiego di prodotti eventualmente citati negli articoli, e invita il lettore a controllarne personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

Epatite C cronica e diabete: una relazione bidirezionale complessa

Chronic hepatitis C and diabetes: a complex bidirectional relationship

Stefano Ciardullo^{1,2}, Alessandro Mantovani³, Antonio Ciaccio^{4,5}, Marco Carbone^{4,5},
Pietro Invernizzi^{4,5}, Gianluca Perseghin^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina e Riabilitazione, Policlinico di Monza; ²Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano Bicocca; ³Sezione di Endocrinologia, Diabetologia e Malattie del Metabolismo, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona; ⁴Division of Gastroenterology, Center for Autoimmune Liver Diseases, Department of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca, Monza, Italy; ⁵European Reference Network on Hepatological Diseases (ERN RARE-LIVER), San Gerardo Hospital, Monza, Italy

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2202a>

ABSTRACT

Chronic hepatitis C (CHC) and diabetes have a complex relationship. CHC increases the risk of developing diabetes, independently from the degree of liver fibrosis. This is due to both impairment in beta cell function and induction of insulin resistance. Conversely, diabetes worsens the liver-related prognosis of patients with CHC. Sustained virologic response, obtained by either interferon-based or interferon-free regimens, leads to a lower incidence of diabetes, to improved diabetes control in patients with known diabetes and to a lower incidence of micro- and macrovascular diabetic complications.

KEYWORDS

Diabetes; HCV; DAA; cirrhosis.

INTRODUZIONE

Il conferimento del premio Nobel 2020 per la medicina e biologia agli scienziati Harvey J. Alter, Michael Houghton e Charles M. Rice per la scoperta del virus dell'epatite C (HCV) (1-3) ha rappresentato una pietra miliare nella storia dell'epatologia. Questa scoperta, infatti, non ha soltanto rivoluzionato le nostre conoscenze in campo virologico, immunologico e sulla biologia delle epatopatie croniche, ma ha anche posto le basi per lo sviluppo di test diagnostici e, soprattutto, di terapie che si sono dimostrate estremamente efficaci nell'eradicazione (SVR, *Sustained Virological Response*) del virus (4), rendendo la storia dell'epatite C un grande esempio della capacità

della comunità scientifica e dell'industria di raggiungere l'ambizioso traguardo di un trattamento estremamente efficace di una condizione diffusa che ha una prognosi potenzialmente infausta. Nel maggio 2016, infatti, l'organizzazione mondiale della sanità ha proposto l'obiettivo di eliminare l'epatite virale entro l'anno 2030. In questa rassegna esamineremo l'epidemiologia dell'infezione da HCV nel mondo ed in Italia, gli studi epidemiologici e fisiopatologici che hanno approfondito il rapporto tra HCV e diabete, tra infezione da HCV e l'emergenza delle complicanze correlate al diabete, nonché l'effetto della terapia antivirale sul compenso glicemico e sull'incidenza delle complicanze micro e macro-vascolari.

CENNI EPIDEMIOLOGICI

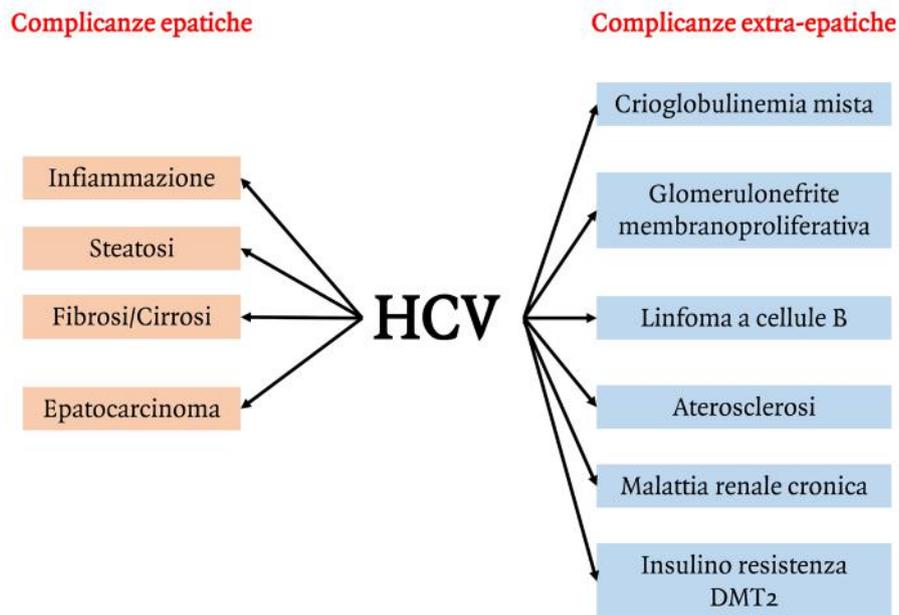
L'epatite C rimane, ad oggi, un importante problema di salute pubblica, con un grande impatto sociale ed economico. Si stima, infatti, che nel mondo 71 milioni di persone presentino un'epatite cronica HCV correlata, con un'incidenza di 260.000 nuovi casi di epatocarcinoma (HCC, *HepatoCellular Carcinoma*) all'anno e circa 365.000 decessi annui dovuti all'infezione ed alle sue complicanze (5). Stime globali dell'osservatorio Polaris indicano che solo il 20% dei casi di epatite venga effettivamente diagnosticato ed il 2.9% dei pazienti abbia ricevuto un trattamento con farmaci ad azione antivirale diretta (DAA, *Direct Anti-viral Agents*).

L'Italia rappresenta uno dei paesi europei con più alta prevalenza di HCV e di decessi causati da cirrosi epatica ed HCC. Secondo i dati Eurostat, nel 2016 l'Italia si collocava al primo posto in Europa per il tasso di mortalità per epatiti virali con 38 morti/anno per milione di abitanti (6). In assenza di studi epidemiologici rappresentativi effettuati sull'intero territorio nazionale, le stime di prevalenza derivano da valutazioni locali. Andriulli e colleghi hanno valutato la prevalenza dell'RNA virale in 4907 soggetti campionati casualmente tra gli assistiti di medici di medicina generale in cinque città italiane (Torino, Roma, Napoli, Bari e Catania) nel 2015. La positività al virus era presente nell'1.7% della popolazione, con un significativo incremento dalle regioni del Nord a quelle del Sud (da 1.6% a 2.4%) ed un importante effetto coorte. La prevalenza più elevata è stata identificata nella coorte di nascita 1935-1944 (7.0%), con un progressivo decremento nelle successive coorti ed un secondo picco di minore entità nella coorte 1965-1974 (7). Un recente studio modellistico ha inoltre stimato che vi siano nel nostro paese circa 280.000 pazienti affetti da epatite C asintomatici ancora da diagnosticare (8). Mentre ad oggi l'età media dei pazienti trattati con DAA è di 65 anni e la popolazione consiste principalmente in pazienti che hanno contratto l'infezione tramite pregresse trasfusioni o mediante utilizzo di siringhe non monouso, si stima che la maggior parte dei pazienti ancora da diagnosticare abbiano un'età compresa tra 30 e 55 anni e presentino come principali fattori di rischio la tossicodipendenza ed i trattamenti estetici a rischio (9).

HCV E DIABETE: EVIDENZE DA STUDI OSSERVAZIONALI

Diversi studi osservazionali hanno evidenziato una prevalenza maggiore di diabete mellito di tipo 2 (DMT2) in pazienti con epatite C cronica rispetto al gruppo di controllo. Una metanalisi comprendente 31 studi osservazionali ha identificato una prevalenza media di DMT2 tra pazienti con HCV del 15% rispetto ad una prevalenza del 10% nel gruppo di controllo, con un Odds Ratio (OR) complessivo di 1.58 (95% CI: 1.30-1.86) (10). Va sottolineato che l'analisi, oltre a mostrare un'associazione tra casi prevalenti e non incidenti, ha evidenziato un'importante eterogeneità in relazione al diverso grado di aggiustamento per fattori confondenti, all'età media dei soggetti arruo-

lati e al paese di origine. Evidenze più convincenti derivano da studi prospettici che hanno valutato l'incidenza di diabete in pazienti affetti da epatopatia C cronica. Mehta e colleghi hanno valutato il rischio di sviluppo di diabete in 1084 adulti statunitensi partecipanti allo studio ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities Study*). Gli Autori hanno identificato un rischio significativamente maggiore di sviluppare diabete in pazienti con HCV rispetto ai controlli (HR: 11.58, 95% CI: 1.39-96.60), evidente soprattutto se i pazienti presentavano alto rischio di diabete al baseline, valutato in base all'età e al *Body Mass Index* (BMI) (11). Un importante fattore confondente non valutato dallo studio è rappresentato dallo stadio dell'epatopatia in termini di fibrosi. È infatti ben noto in letteratura come lo sviluppo di fibrosi avanzata e soprattutto di cirrosi, indipendentemente dall'eziologia, si associ ad un importante incremento dell'insulino-resistenza e del rischio di diabete (12), da alcuni considerato una forma di diabete distinto dal DMT2 e chiamato "epatogeno" (13). Questo aspetto è stato preso in considerazione in una recente metanalisi di studi di coorte in cui analisi stratificate per presenza o assenza di cirrosi hanno confermato l'associazione tra infezione da HCV e diabete. In particolare, l'aumento del rischio relativo risultava comparabile sia nel confronto tra pazienti con HCV non cirrotici e soggetti non epatopatici (rischio relativo, RR 2.58), sia tra pazienti con cirrosi da HCV e pazienti con cirrosi di altra eziologia (epatite B, alcol, epatiti auto-immuni e forme criptogenetiche; RR 2.40) sia tra pazienti non cirrotici con epatite C e pazienti non cirrotici con epatite B (RR 2.25) (14). Lo studio ha poi confermato una maggiore prevalenza di diabete nei pazienti con cirrosi da HCV rispetto a pazienti con epatite C in assenza di cirrosi. Questi dati sembrano quindi suggerire che l'infezione da HCV determini un incremento del rischio indipendentemente dal grado di severità dell'epatopatia, ed in misura maggiore rispetto ad altre malattie croniche di fegato. In questo senso il diabete è considerato una delle manifestazioni extraepatiche dell'infezione da HCV (riassunte nella Fig. 1). Va inoltre sottolineato come la mortalità per cause epatiche sia significativamente aumentata in pazienti con diabete. In uno studio basato su dati amministrativi di regione Veneto, Zoppini e colleghi hanno evidenziato tra i pazienti con diabete un incremento di mortalità per epatopatie virali (SMR, *Standardized Mortality Ratio* 2.17), alcol-relate (SMR 2.25) e non-virali non-alcohol relate (SMR 2.86) (15).

Figura 1 ◆ Principali complicanze intra ed extraepatiche dell'infezione cronica da HCV

L'effetto negativo del diabete sulla prognosi dei pazienti con HCV è stato dimostrato in un ampio studio di coorte statunitense che ha reclutato 541 pazienti con epatite C e fibrosi epatica avanzata. Dopo aggiustamento per diversi fattori confondenti, la presenza di diabete rappresentava un fattore di rischio indipendente per sviluppo di epatocarcinoma, soprattutto nei pazienti con cirrosi (16). Infine, in uno studio di coorte francese che ha incluso 248 pazienti con cirrosi compensata HCV-correlata, il grado di insulino-resistenza stimato mediante HOMA-IR si è dimostrato un predittore indipendente sia di incidenza di HCC ($p=0.026$) sia di mortalità o trapianto di fegato ($p<0.0001$) (17).

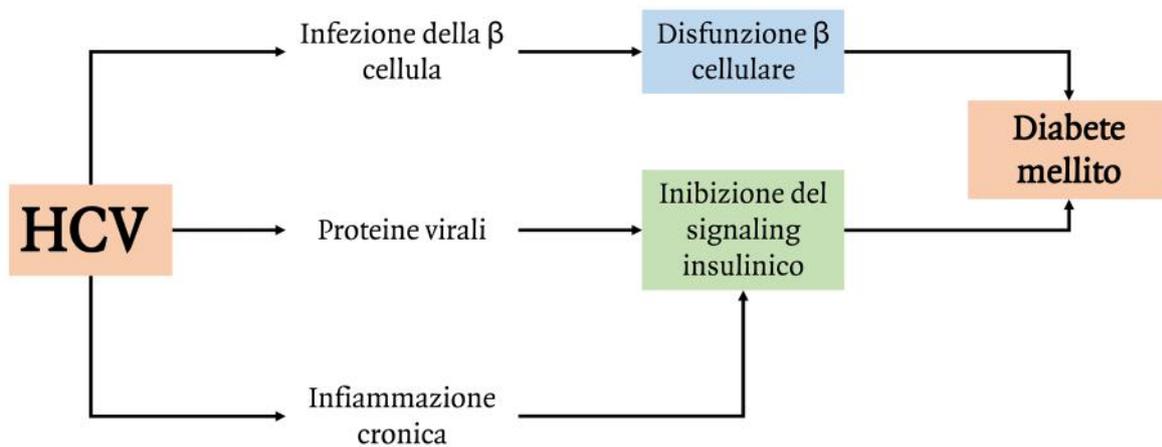
HCV E DIABETE – BASI MOLECOLARI E FISIOPATOLOGICHE

Diversi meccanismi molecolari sono alla base dell'aumentato rischio di DMT2 evidenziato nei pazienti affetti da epatite C cronica agendo sia sul grado di insulino-resistenza sia interferendo con la funzione β -cellulare (Fig. 2).

HCV ed insulino-resistenza

È stato dimostrato che, a livello epatico, la proteina core del virus è in grado di indurre la fosforilazione in serina della proteina IRS (*Insulin Receptor Substrate*) e ridurne la

fosforilazione dei residui di tirosina (18). Questa modificazione post-traduzionale interferisce con il signaling insulinico intracellulare determinando una riduzione nell'attività della proteina AKT (anche nota come proteina chinasi B) e portando in ultima analisi ad un'inibizione dell'uptake di glucosio ed un incremento dell'insulino-resistenza epatica (19). Inoltre, a livello sistemico, la presenza delle proteine virali determina uno stato di infiammazione cronica di basso grado con incremento dei livelli circolanti di citochine pro-infiammatorie come l'interleuchina 6 ed il *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), i quali hanno una forte azione inibitoria sul signaling insulinico mediante la fosforilazione in serina di IRS (20-22). Un altro meccanismo che potrebbe spiegare l'associazione tra epatite C e diabete è la capacità del virus di indurre l'accumulo intraepatico di trigliceridi diventando causa di steatosi epatica. La steatosi sembra verificarsi con maggiore frequenza nei pazienti infettati dal genotipo 3 (23). Anche se evidenze di un rapporto causale tra la steatosi HCV-relata, l'insulino-resistenza epatica e il rischio di DMT2 sono al momento limitate, diversi studi hanno dimostrato come l'accumulo intraepatocitario di metaboliti degli acidi grassi, per esempio il diacilglicerolo, sia in grado di attivare la proteina chinasi C alfa e determinare l'inibizione del signaling insulinico (24). Inoltre, poiché è stato identificato un incremento del ri-

Figura 2 ◆ Potenziali meccanismi patogenetici che legano l'infezione cronica da HCV allo sviluppo di diabete mellito

schio di diabete nei pazienti con NAFLD (25), è possibile ipotizzare che anche la steatosi da HCV possa incrementarne il rischio agendo su pathways simili. Lecube e colleghi hanno confrontato il grado di insulino-resistenza (mediante HOMA-IR) di 28 pazienti non diabetici con epatite C cronica con quello di 14 controlli con epatite cronica non HCV-correlata matchati per sesso, età, BMI, storia familiare di diabete e grado di fibrosi epatica. È emerso come i pazienti affetti da epatite C presentassero valori significativamente maggiori di HOMA-IR (5.35 vs 2.58, $p=0.01$) rispetto ai controlli, unitamente a concentrazioni maggiori di TNF- α , del suo recettore circolante e di interleuchina 6 (26). I livelli circolanti di recettore del TNF- α sono poi risultati positivamente correlati con il grado di insulino-resistenza.

HCV e funzione β -cellulare

Sebbene il fegato rappresenti l'organo bersaglio primario dell'infezione da HCV, il genoma virale è stato identificato in diversi altri organi e tessuti, tra cui le cellule acinari del pancreas esocrino (27-28). Inoltre, il virus è in grado di infettare le β -cellule legandosi ai recettori CD81 e Scavenger receptor B1 e di replicarsi al loro interno (29). Un recente studio condotto in pazienti e topi con epatite C cronica ha confermato l'effetto deleterio del virus a livello β -cellulare. Vi era infatti, oltre ad insulino-resistenza, un evidente difetto secretorio β -cellulare che si manifestava con una ridotta secrezione di insulina dovuta principalmente ad un blocco dell'esocitosi dei granuli contenenti l'ormone ad opera delle proteine virali (30).

Uno studio in vitro effettuato su linee cellulari di insulino carcinoma ha dimostrato l'effetto citopatico diretto del virus HCV in modo dose e tempo dipendente (31). Infatti, l'infezione da HCV inibiva la proliferazione cellulare inducendo la morte delle β -cellule mediante meccanismi simili a quelli dell'apoptosi, come l'espressione sulla superficie cellulare di fosfatidilserina, riduzione del potenziale di membrana mitocondriale ed attivazione della caspasi 3 e frammentazione del DNA nucleare. Gli Autori hanno poi mostrato che l'infezione di questa linea cellulare determinava anche stress del reticolo endoplasmatico, che insieme all'apoptosi, contribuiva alla riduzione della massa β -cellulare.

Queste evidenze sembrano essere confermate da un recente studio osservazionale che ha analizzato la funzione β -cellulare in 220 pazienti non diabetici con NAFLD ($n=129$) o epatite cronica da HCV ($n=91$) e l'ha confrontata con quella di 26 soggetti non epatopatici (32). Mentre i soggetti con NAFLD presentavano il più alto grado di insulino-resistenza, i pazienti con epatite cronica da HCV presentavano la più bassa risposta insulinica allo stimolo mediante OGTT, indicando un importante deficit secretorio.

HCV E COMPLICANZE DEL DIABETE

Diversi studi osservazionali e alcune metanalisi hanno documentato, negli ultimi decenni, che i pazienti con epatite cronica da HCV hanno una maggiore morbilità e mortalità cardiovascolare, rispetto a soggetti sierone-

gativi (33). Per esempio, in uno studio osservazionale pubblicato nel 2006 che è stato condotto su quasi 76.000 pazienti con epatite cronica da HCV, è emerso chiaramente come la malattia cardiovascolare era la terza causa di morte in questi pazienti (dopo quella da malattia epatica e da farmaci), osservando un tasso di mortalità standardizzato pari a 1,3 (95% CI: 1,2-1,5) (34-35). Nello studio REVEAL, che ha incluso 23.820 adulti di origine asiatica (1.095 dei quali avevano una sieropositività agli anticorpi anti-HCV e 760 con riscontro di HCV RNA nel siero), seguiti per un periodo medio di 16,2 anni, Lee e collaboratori hanno documentato che l'infezione persistente da HCV aumentava significativamente sia la mortalità epatica che quella extraepatica (36). In particolare, in questo studio, per quanto riguarda la mortalità extraepatica, è emerso che i pazienti con epatite cronica da HCV, rispetto ai controlli sieronegativi, avevano un aumentato rischio di morte per cause cardiovascolari (HR: 1,50, 95% CI: 1,10-2,03), anche dopo aggiustamento per diversi fattori di rischio cardiometabolici e per altri fattori confondenti. Una metanalisi pubblicata nel 2016, che ha incluso 22 studi osservazionali, ha ulteriormente documentato che nei pazienti HCV positivi il rischio di avere una qualsiasi malattia cardiovascolare è aumentato del 20% (OR: 1,20, 95% CI: 1,03-1,40), mentre quello di avere uno stroke ischemico di circa il 35% (OR: 1,35, 95% CI: 1,00-1,82) (37). È interessante notare, comunque, che ad oggi ci sono diverse evidenze cliniche che suggeriscono come sia la replicazione del virus (cioè il riscontro di HCV RNA nel siero), piuttosto che l'infezione pregressa (cioè la solo sieropositiva agli anticorpi anti-HCV), il principale predittore indipendente di morbidità e mortalità cardiovascolare (35). A questo proposito, l'aumentata morbidità e mortalità cardiovascolare osservata nei pazienti con epatite da HCV potrebbe essere dovuta al fatto che l'infezione da HCV predispone: a) allo sviluppo di aterosclerosi carotidea (38), b) alla malattia coronarica (39-40), c) allo scompenso cardiaco (41) e d) allo stroke ischemico (37, 42). Recentemente, è emerso anche che l'epatite cronica da HCV predispone ad alcune complicanze microvascolari, come la malattia renale cronica (43). Per esempio, in una metanalisi pubblicata nel 2018 che ha incluso 40 studi osservazionali per un totale di 4.072.867 pazienti, Fabrizi e collaboratori hanno riportato che la sieropositività agli anticorpi anti-HCV si associa ad un aumentato rischio di sviluppare malattia renale cronica (HR: 1,54,

95% CI: 1,26-1,87). Nei pazienti dializzati, l'infezione da HCV sembra inoltre essere associata ad una aumentata mortalità e morbidità cardiovascolare (43).

TERAPIA DELL'HCV E COMPENSO GLICEMICO

La possibilità di una relazione causale diretta tra infezione da HCV e sviluppo di diabete è supportata dall'effetto positivo dell'eradicazione (SVR) sul compenso glicemico anche a breve termine (e quindi non imputabile ad una riduzione del grado di fibrosi rispetto al gruppo di controllo). Diversi studi hanno dimostrato che il raggiungimento della SVR determina un miglioramento di vari parametri metabolici. Thomson e colleghi hanno valutato un sottogruppo di 1038 pazienti non diabetici randomizzati a ricevere albinterferon alpha-2b o pegylated IFNa-2a più ribavirina all'interno di due trial clinici randomizzati della durata di 24 e 48 mesi, rispettivamente. Gli Autori hanno identificato una riduzione significativa della prevalenza di insulino-resistenza (HOMA-IR>3) nei pazienti che avevano raggiunto la SVR ($p<0.001$), ma non nei non-responders. L'analisi multivariata ha poi dimostrato che l'effetto della SVR sull'insulino-resistenza era indipendente da variazioni di BMI, enzimi epatici e profilo lipidico (44). Inoltre, in uno studio osservazionale effettuato su 159 pazienti con epatite C, la presenza di insulino-resistenza prima dell'inizio della terapia con interferone e ribavirina era associata ad una riduzione significativa del tasso di SVR anche dopo aggiustamento per genotipo virale e grado di fibrosi (45), sottolineando il rapporto bidirezionale tra insulino-resistenza ed eradicazione del virus. L'effetto positivo dell'eradicazione del virus sui parametri metabolici è stato poi confermato con l'avvento della terapia con DAA, che ha permesso di raggiungere la SVR in una percentuale molto elevata di pazienti con un profilo di tollerabilità decisamente maggiore rispetto alla combinazione interferone/ribavirina. Un ampio studio osservazionale ha valutato l'incidenza di diabete in 21.279 veterani statunitensi con HCV trattati con interferone/ribavirina, DAA o in assenza di terapia farmacologica (46). Tra i pazienti trattati, il tasso di incidenza di diabete era significativamente più basso in coloro che hanno raggiunto la SVR (13,3/1000 persone anno), rispetto a coloro che non la hanno raggiunta (19,2/1000 persone anno, $p<0.001$). Un grado maggiore di riduzione del rischio è stato riscontrato nei pazienti con

fibrosi avanzata o cirrosi. Analoghi risultati sono stati ottenuti in uno studio osservazionale prospettico condotto in cinque centri epatologici italiani in cui l'incidenza di diabete è stata valutata in 1099 pazienti con epatite C cronica non trattati e 1327 pazienti trattati con DAA. Il raggiungimento della SVR mediante terapia antivirale ha dimostrato di associarsi ad una riduzione significativa dell'incidenza di diabete sia nei pazienti con uno stadio di fibrosi Fo-F2 (RR: 0.06, $p=0.005$), sia nei pazienti in stadio F3-F4 (RR: 0.21, $p<0.001$) (47).

Il trattamento con farmaci antivirali non ha solo mostrato di ridurre l'insulino-resistenza e l'incidenza di diabete, ma anche di migliorare il compenso glicemico in pazienti con diabete noto. La maggior parte degli studi, con disegno retrospettivo o prospettico, ha mostrato un effetto positivo del raggiungimento della SVR sui valori di glicemia a digiuno ed emoglobina glicata in pazienti diabetici. Il più ampio studio di coorte retrospettivo, condotto da Hum e colleghi su 2435 veterani statunitensi con DMT2 ed epatite C trattati con DAA, ha mostrato come in coloro che raggiungevano la SVR si evidenziasse una maggiore riduzione di emoglobina glicata (-0.98%), rispetto ai pazienti non responder (-0.65%). Allo stesso modo l'utilizzo di farmaci antidiabetici si è ridotto significativamente nel gruppo che ha raggiunto la SVR, dato particolarmente evidente per la terapia insulinica (48). Questi risultati sono stati confermati da uno studio osservazionale italiano condotto su 122 pazienti con DMT2 ed epatite C. I pazienti sono stati divisi in coloro che hanno ottenuto la SVR dopo terapia con DAA (gruppo 1, $n=101$) e coloro che non hanno risposto alla terapia o non sono stati trattati (gruppo 2, $n=21$). Alla fine dello studio, i pazienti del gruppo 1 hanno mostrato un decremento statisticamente significativo dei livelli di glicemia a digiuno (da 152.4 ± 56.40 mg/dL a 134.3 ± 41.32 mg/dL, $p=0.002$) e HbA1c (da 52.15 ± 5.43 mmol/mol a 46.51 ± 16.15 mmol/mol, $p<0.001$) mentre tra i pazienti del gruppo 2 non è stata trovata alcuna variazione significativa di questi valori (49). Ulteriore conferma è giunta da una recente metanalisi comprendente 5 studi osservazionali, che ha mostrato come il raggiungimento della SVR mediante terapia con DAA determini una riduzione media di HbA1c di 0.45% (95% CI: 0.3-0.6%; $p<0.001$) e di glicemia a digiuno di 22.03 mg/dL (95% CI: 2.4-41.61 mg/dL; $p=0.03$), anche se gli autori hanno rilevato un'elevata eterogeneità tra gli studi (50).

TERAPIA DELL'EPATITE C E COMPLICANZE DEL DIABETE

Gli studi a nostra disposizione sull'effetto dell'SVR sulle complicanze del DMT2 sono numericamente limitati. Va tuttavia sottolineato come diversi studi effettuati su pazienti con epatite C (con una proporzione variabile di soggetti affetti da DMT2) hanno mostrato una riduzione di eventi cardiovascolari tra coloro che riuscivano ad eradicare l'infezione. In uno studio di coorte retrospettivo, Butt e colleghi hanno incluso 242.680 veterani con epatite C cronica e identificato i pazienti trattati mediante interferone pegilato ($n=4436$) o DAA ($n=12667$). Dopo matching per svariati fattori confondenti, l'incidenza di eventi cardiovascolari si è dimostrata significativamente più bassa nei pazienti trattati rispetto ai pazienti non trattati ed il raggiungimento della SVR è risultato protettivo sull'outcome di interesse (HR: 0.87; 95% CI: 0.77-0.98) (46). Risultati analoghi sono stati ottenuti da Adinolfi e colleghi in un campione di 1668 pazienti italiani. Questo studio ha inoltre mostrato come la terapia con DAA determinasse una riduzione dell'incidenza di eventi cardiovascolari sia in pazienti con fibrosi Fo-F2 stimata mediante fibroscan (RR: 0.11, 95% CI: 0.014-0.829) sia in pazienti con F3-F4 (RR: 0.43, 95% CI: 0.25-0.75) (51).

I pochi studi condotti esclusivamente in pazienti con diabete o prediabete sembrano confermare queste evidenze. Recentemente, Sasso e colleghi hanno confrontato l'incidenza di eventi cardiovascolari in 398 pazienti prediabetici con epatite C non trattata con quella osservata in 372 pazienti prediabetici trattati con DAA. Il rate di eventi cardiovascolari è risultato significativamente maggiore tra i pazienti non trattati (1.77 vs 0.62, $p<0.001$) ed anche in questo caso l'eradicazione del virus si è associata a una riduzione significativa dell'outcome (RR: 0.411, 95% CI: 0.148-1.143; $p<0.001$), con un *number needed to treat* di 52 (52). Li et al. hanno valutato 1395 pazienti con DMT2 ed epatite C cronica, di cui 723 trattati con regimi a base di interferone o DAA. Il 75% dei pazienti trattati ha ottenuto l'eradicazione. Dopo *propensity score matching* effettuato allo scopo di correggere per bias di selezione al trattamento, i pazienti che avevano raggiunto la SVR presentavano un rischio ridotto di sindrome coronarica acuta (HR: 0.36; $p<0.001$), malattia renale cronica terminale (HR: 0.46; $p<0.001$), ictus (HR: 0.34; $p<0.001$) e retinopatia (HR:

0.24; $p < 0.001$) rispetto a pazienti non trattati. I risultati erano poi consistenti stratificando le analisi in base al regime terapeutico utilizzato ed alla presenza o assenza di cirrosi (53). Tuttavia, mentre la riduzione dell'incidenza di stroke e malattia renale terminale è risultata significativa anche confrontando pazienti con SVR e pazienti con treatment failure, non vi era differenza tra questi due gruppi per quanto riguarda le sindromi coronariche acute e la retinopatia.

CONCLUSIONI

L'epatite C continua a rimanere un importante problema di salute pubblica. Infatti, nel mondo le complicanze dell'infezione cronica da HCV provocano ancora più di 300.000 decessi all'anno, poiché, a dispetto dell'efficacia delle attuali terapie, solo 1 caso su 5 con epatite viene diagnosticato. In questo contesto, l'Italia rappresenta il paese con il tasso di mortalità per epatiti virali più alto di tutta Europa. Non è un caso che non più tardi del luglio 2021 sia stato pubblicato in Gazzetta Ufficiale il Decreto per "Esecuzione dello screening nazionale per l'eliminazione del virus dell'HCV"(54). Il decreto definisce i criteri e le modalità per l'attuazione dello screening da parte delle Regioni e stabilisce che sia rivolto, in via sperimentale, a tutta la popolazione iscritta all'anagrafe sanitaria nata dal 1969 al 1989.

Questa azione di screening dell'infezione da epatite C, trova inoltre simultanea applicabilità e sinergia con lo screening della NAFLD, recentemente sostenuto dalle società scientifiche internazionali (55-56). Inoltre, nel 2022, anche a livello nazionale, sono state pubblicate le linee guida multidisciplinari (57) per lo screening della NAFLD nell'ambulatorio diabetologico. È importante sottolineare il fatto che la diagnosi di questa condizione prevede l'esclusione delle epatopatie croniche su base virale con la valutazione sierologica dell'infezione da HCV.

La diagnosi è fondamentale perché permette di indirizzare il paziente alla valutazione epatologica per eventuale intervento con DAA, alta probabilità di eradicazione del virus e quindi prevenzione del rischio di evoluzione ad epatopatia cronica ed alle sue temibili complicanze. Per il diabetologo questo impegno è importante non solo perché molti dei pazienti che frequentano il Centro Diabetologico si trovano nella fascia d'età per la quale lo screening è raccomandato, ma anche perché la DAA si as-

socia ad un miglioramento del controllo metabolico e ad una riduzione delle complicanze macro- e probabilmente micro-vascolari del diabete, con una ricaduta positiva importante sulla malattia metabolica.

BIBLIOGRAFIA

1. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244(4902): 359-62, 1989.
2. Alter H, Holland P, Purcell R, Popper H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *The Lancet* 311(8062): 459-63, 1978.
3. Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70(6): 3363-71, 1996.
4. Baumert TF. The Nobel Prize in medicine 2020 for the discovery of hepatitis C virus: transforming hepatology. Elsevier, 2020, pp 1303-5.
5. Blach S, Zeuzem S, Manns M, Altraif I, Duberg A-S, Muljono DH, et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The lancet Gastroenterology & hepatology* 2(3): 161-76, 2017.
6. Eurostat 2018. [December 2021]. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/EDN-20190726-1>.
7. Andriulli A, Stroffolini T, Mariano A, Valvano MR, Grattagliano I, Ippolito AM, et al. Declining prevalence and increasing awareness of HCV infection in Italy: A population-based survey in five metropolitan areas. *Eur J Intern Med* 53: 79-84, 2018.
8. Gardini I, Bartoli M, Conforti M, Mennini FS, Marcellusi A. Estimation of the number of HCV-positive patients in Italy. *PLoS One* 14(10): e0223668, 2019.
9. Kondili LA, Andreoni M, Alberti A, Lobello S, Babudieri S, Roscini AS, et al. Estimated prevalence of undiagnosed HCV infected individuals in Italy: a mathematical model by route of transmission and fibrosis progression. *Epidemics* 34: 100442, 2021.
10. Younossi Z, Park H, Henry L, Adeyemi A, Stepanova M. Extrahepatic manifestations of hepatitis C: a meta-analysis of prevalence, quality of life, and economic burden. *Gastroenterology* 150(7): 1599-608, 2016.

11. Mehta SH, Brancati FL, Strathdee SA, Pankow JS, Netski D, Coresh J, et al. Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. *Hepatology* 38(1): 50-6, 2003.
12. Perseghin G, Mazzaferro V, Sereni LP, Regalia E, Benedini S, Bazzigaluppi E, et al. Contribution of reduced insulin sensitivity and secretion to the pathogenesis of hepatogenous diabetes: effect of liver transplantation. *Hepatology* 31(3): 694-703, 2000.
13. Orsi E, Grancini V, Menini S, Aghemo A, Pugliese G. Hepatogenous diabetes: Is it time to separate it from type 2 diabetes? *Liver International* 37(7): 950-62, 2017.
14. Fabiani S, Fallahi P, Ferrari SM, Miccoli M, Antonelli A. Hepatitis C virus infection and development of type 2 diabetes mellitus: Systematic review and meta-analysis of the literature. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 19(4): 405-20, 2018.
15. Zoppini G, Fedeli U, Gennaro N, Saugo M, Targher G, Bonora E. Mortality from chronic liver diseases in diabetes. *Am J Gastroenterol.* 2014 Jul;109(7):1020-5. PubMed PMID: 24890439. Epub 2014/06/04. eng.
16. Veldt BJ, Chen W, Heathcote EJ, Wedemeyer H, Reichen J, Hofmann WP, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C cirrhosis and diabetes mellitus. *Hepatology* 47(6): 1856-62, 2008.
17. Nkontchou G, Bastard J-P, Ziolo M, Aout M, Cosson E, Ganne-Carrie N, et al. Insulin resistance, serum leptin, and adiponectin levels and outcomes of viral hepatitis C cirrhosis. *J Hepatol* 53(5): 827-33, 2010.
18. Banerjee S, Saito K, Ait-Goughoulte M, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein upregulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs the downstream akt/protein kinase B signaling pathway for insulin resistance. *J Virol* 82(6): 2606-12, 2008.
19. Aytug S, Reich D, Sapiro LE, Bernstein D, Begum N. Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology* 38(6): 1384-92, 2003.
20. Cua IH, Hui JM, Bandara P, Kench JG, Farrell GC, McCaughan GW, et al. Insulin resistance and liver injury in hepatitis C is not associated with virus specific changes in adipocytokines. *Hepatology* 46(1): 66-73, 2007.
21. Knobler H, Zhornicky T, Sandler A, Haran N, Ashur Y, Schattner A. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance may mediate the hepatitis C virus-diabetes association. *The American journal of gastroenterology* 98(12): 2751-6, 2003.
22. Greenberg A, McDaniel M. Identifying the links between obesity, insulin resistance and β -cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 32: 24-34, 2002.
23. Lonardo A, Adinolfi LE, Restivo L, Ballestri S, Romagnoli D, Baldelli E, et al. Pathogenesis and significance of hepatitis C virus steatosis: an update on survival strategy of a successful pathogen. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20(23): 7089, 2014.
24. Birkenfeld AL, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology* 59(2): 713-23, 2014.
25. Mantovani A, Petracca G, Beatrice G, Tilg H, Byrne CD, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident diabetes mellitus: an updated meta-analysis of 501 022 adult individuals. *Gut* 70(5): 962-9, 2021.
26. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients: a case-control study. *Diabetes Care* 29(5): 1096-101, 2006.
27. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired immunodeficiency syndrome: specific detection of negative-strand viral RNA in various tissues. *Hepatology* 28(5): 1398-401, 1998.
28. Masini M, Campani D, Boggi U, Menicagli M, Funel N, Pollera M, et al. Hepatitis C virus infection and human pancreatic β -cell dysfunction. *Diabetes Care* 28(4): 940-1, 2005.
29. Blackard JT, Kong L, Lombardi A, Homann D, Hammerstad SS, Tomer Y. A preliminary analysis of hepatitis C virus in pancreatic islet cells. *Virology* 14(1): 1-10, 2017.
30. Chen J, Wang F, Zhou Y, Jiang J, Ksimu S, Zhang X, et al. Chronic hepatitis C virus infection impairs insulin secretion by regulation of p38 δ MAPK-dependent exocytosis in pancreatic β -cells. *Clin Sci* 134(5): 529-42, 2020.
31. Wang Q, Chen J, Wang Y, Han X, Chen X. Hepatitis C virus induced a novel apoptosis-like death of pancreatic beta cells through a caspase 3-dependent pathway. *PLoS One* 7(6): e38522, 2012.
32. Svegliati-Baroni G, Gaggini M, Carli F, Barbieri C, Cucco M, Younes R, et al. Mechanisms for increased risk of

- diabetes in chronic liver diseases. *Liver International* 40(10): 2489-99, 2020.
33. Younossi ZM, Bireddi A, Henry L. Hepatitis C infection: A multi-faceted systemic disease with clinical, patient reported and economic consequences. *J Hepatol* 65(Suppl 1):S109-s19, 2016. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.005.
 34. Amin J, Law MG, Bartlett M, Kaldor JM, Dore GJ. Causes of death after diagnosis of hepatitis B or hepatitis C infection: a large community-based linkage study. *Lancet* 368(9539): 938-45, 2006. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69374-4.
 35. Negro F. Facts and fictions of HCV and comorbidities: steatosis, diabetes mellitus, and cardiovascular diseases. *J Hepatol* 61(Suppl 1): S69-78, 2014. doi: 10.1016/j.jhep.2014.08.003.
 36. Lee MH, Yang HI, Lu SN, Jen CL, You SL, Wang LY, et al. Chronic hepatitis C virus infection increases mortality from hepatic and extrahepatic diseases: a community-based long-term prospective study. *J Infect Dis* 206(4): 469-77, 2012. doi: 10.1093/infdis/jis385.
 37. Petta S, Maida M, Macaluso FS, Barbara M, Licata A, Craxi A, et al. Hepatitis C Virus Infection Is Associated With Increased Cardiovascular Mortality: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Gastroenterology* 150(1): 145-55.e4; quiz e15-6, 2016. doi: 10.1053/j.gastro.2015.09.007.
 38. Adinolfi LE, Restivo L, Zampino R, Guerrera B, Lonardo A, Ruggiero L, et al. Chronic HCV infection is a risk of atherosclerosis. Role of HCV and HCV-related steatosis. *Atherosclerosis* 221(2): 496-502, 2012. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.051.
 39. Wong RJ, Kanwal F, Younossi ZM, Ahmed A. Hepatitis C virus infection and coronary artery disease risk: a systematic review of the literature. *Dig Dis Sci* 59(7): 1586-93, 2014. doi: 10.1007/s10620-014-3222-3.
 40. Alyan O, Kacmaz F, Ozdemir O, Devci B, Astan R, Celebi AS, et al. Hepatitis C infection is associated with increased coronary artery atherosclerosis defined by modified Reardon severity score system. *Circ J* 72(12): 1960-5, 2008. doi: 10.1253/circj.cj-08-0459.
 41. Younossi ZM, Stepanova M, Nader F, Younossi Z, Elsheikh E. Associations of chronic hepatitis C with metabolic and cardiac outcomes. *Aliment Pharmacol Ther* 37(6): 647-52, 2013. doi: 10.1111/apt.12234.
 42. Lee MH, Yang HI, Wang CH, Jen CL, Yeh SH, Liu CJ, et al. Hepatitis C virus infection and increased risk of cerebrovascular disease. *Stroke* 41(12): 2894-900, 2010. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.598136.
 43. Fabrizi F, Donato FM, Messa P. Association Between Hepatitis C Virus and Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Hepatol*. 2018 May-June; 17(3): 364-91. doi: 10.5604/01.3001.0011.7382.
 44. Thompson AJ, Patel K, Chuang W-L, Lawitz EJ, Rodriguez-Torres M, Rustgi VK, et al. Viral clearance is associated with improved insulin resistance in genotype 1 chronic hepatitis C but not genotype 2/3. *Gut* 61(1): 128-34, 2012.
 45. Romero-Gómez M, Vilorio MDM, Andrade RJ, Salmerón J, Diago M, Fernández-Rodríguez CM, et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 128(3): 636-41, 2005.
 46. Butt AA, Yan P, Shuaib A, Abou-Samra A-B, Shaikh OS, Freiberg MS. Direct-acting antiviral therapy for HCV infection is associated with a reduced risk of cardiovascular disease events. *Gastroenterology* 156(4): 987-96. e8, 2019.
 47. Adinolfi LE, Petta S, Fracanzani AL, Nevola R, Coppola C, Narciso V, et al. Reduced incidence of type 2 diabetes in patients with chronic hepatitis C virus infection cleared by direct acting antiviral therapy: A prospective study. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 22(12): 2408-16, 2020.
 48. Hum J, Jou JH, Green PK, Berry K, Lundblad J, Hettinger BD, et al. Improvement in glycemic control of type 2 diabetes after successful treatment of hepatitis C virus. *Diabetes Care* 40(9): 1173-80, 2017.
 49. Ciancio A, Bosio R, Bo S, Pellegrini M, Sacco M, Vogliotti E, et al. Significant improvement of glycemic control in diabetic patients with HCV infection responding to direct acting antiviral agents. *J Med Virol* 90(2): 320-7, 2018.
 50. Carnovale C, Pozzi M, Dassano A, D'Addio F, Gentili M, Magni C, et al. The impact of a successful treatment of hepatitis C virus on glyco-metabolic control in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Acta Diabetol* 56(3): 341-54, 2019.
 51. Adinolfi LE, Petta S, Fracanzani AL, Coppola C, Narciso V, Nevola R, et al. Impact of hepatitis C virus clearance by direct-acting antiviral treatment on the incidence of major cardiovascular events: A prospective multicentre study. *Atherosclerosis* 296: 40-7, 2020.

52. Sasso FC, Pafundi PC, Caturano A, Galiero R, Vetrano E, Nevola R, et al. Impact of direct acting antivirals (DAAs) on cardiovascular events in HCV cohort with pre-diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.*, 2021.
53. Li J, Gordon SC, Rupp LB, Zhang T, Trudeau S, Holmberg SD, et al. Sustained virological response to hepatitis C treatment decreases the incidence of complications associated with type 2 diabetes. *Aliment Pharmacol Ther* 49(5): 599-608, 2019.
54. Decreto 14 maggio 2021 - Esecuzione dello screening nazionale per l'eliminazione del virus dell'HCV. [cited 2021 December 30]. [https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2021/07/08/21A04075/sg#:~:text=Lo%20screening%20verra'%20effettuato%3A%20attraverso,\)3B%20op-pure%3A%20attraverso%20un%20test.](https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2021/07/08/21A04075/sg#:~:text=Lo%20screening%20verra'%20effettuato%3A%20attraverso,)3B%20op-pure%3A%20attraverso%20un%20test.)
55. Marchesini G, Day CP, Dufour J-F, Canbay A, Nobili V, Ratziu V, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 64(6): 1388-402, 2016.
56. Berzigotti A, Tsochatzis E, Boursier J, Castera L, Cazzagon N, Friedrich-Rust M, et al. EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis-2021 update. *J Hepatol* 75(3): 659-89, 2021.
57. Marchesini G, Bugianesi E, Burra P, Marra F, Miele L, Alisi A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in adults 2021: A clinical practice guideline of the Italian Association for the Study of the Liver (AISF), the Italian Society of Diabetology (SID) and the Italian Society of Obesity (SIO). *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 32(1): 1-16, 2022.

CONTROVERSIE IN DIABETOLOGIA: METFORMINA, 50 ANNI E NON SENTIRLI

Effetti pleiotropici della metformina: hanno rilevanza clinica? *Pleiotropic effects of metformin: are they clinically relevant?*

Giorgio Sesti

Medicina Interna, Sapienza Università di Roma

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2202b>

ABSTRACT

Sixty years after its introduction in the therapeutic arsenal of type 2 diabetes, metformin remains the first-line treatment of type 2 diabetes according to national and international guidelines. Numerous observational studies have suggested that metformin may exert beneficial therapeutic effects on diabetes – and nondiabetes – related comorbidities, including cardiovascular, hepatic, neoplastic, and infectious diseases. However, direct evidence of the pleiotropic effects of metformin from specific randomized controlled trials is still lacking.

KEYWORDS

Metformin, cardiovascular disease, microvascular disease, cancer, NAFLD, COVID-19.

Nel 2021 la metformina ha compiuto sessant'anni dalla sua introduzione nel prontuario terapeutico. Il suo uso terapeutico risale al Medioevo quando un estratto della *Galega Officinalis* era considerato come una medicina “bona ad tutte le infermità secundo lo male così lo adopera” (Fig. 1). All'epoca non aveva impiego per curare il diabete ma piuttosto era usata per stimolare la lattazione, come rimedio al morso di serpente, come antipiretico e per la cura del ballo di San Vito. Soltanto negli anni Venti dello scorso secolo ne venne apprezzata la capacità di ridurre la glicemia

nella persona con diabete e nel 1961 è stata immessa in commercio in Italia. Da questo momento in poi, la metformina è stata uno dei farmaci più studiati dal punto di vista dei meccanismi d'azione a livello molecolare e degli effetti clinici. La metformina inibisce la gluconeogenesi e la glicogenolisi epatica determinando così una riduzione della produzione epatica di glucosio e dei livelli di glicemia a digiuno (1). La metformina è in grado di aumentare anche la sensibilità all'insulina del muscolo e del tessuto adiposo. Questi effetti si esplicano solo in presenza di insulina, a dimostrazione che il meccanismo attraverso cui il farmaco agisce su questi processi è un potenziamento della azione dell'ormone. La metformina, migliorando l'insulino-resistenza, è in grado di esercitare non soltanto un'azione anti-iperlipemicica, ma anche effetti positivi sul profilo lipidico, sull'ipertensione arteriosa e sulla coagulazione ematica. La metformina, infatti, riduce i livelli plasmatici di trigliceridi, probabilmente legata ad una riduzione della sintesi delle VLDL, di colesterolo totale e LDL, riduce l'iperlipemia post-prandiale, abbassa i livelli di acidi grassi liberi e ne riduce l'ossidazione, riduce la pressione arteriosa, migliora la funzione endoteliale, aumenta lievemente i livelli di GLP-1, esercita effetti antinfiammatori, antiossidanti e modifica la composizione

Figura 1 ♦ La galega (*Galega officinalis*) è una pianta della famiglia delle Fabaceae. Conosciuta sin dall'antichità, è tradizionalmente usata in fitoterapia durante la fase di allattamento, per la sua proprietà galattogena. La galegina presente nella pianta le conferisce proprietà ipoglicemizzante



del microbioma intestinale. La metformina non determina ipoglicemia e non provoca aumento ponderale (1). Sulla base di questi dati, la metformina è stata studiata in trial clinici nel trattamento del diabete e del prediabete, nella prevenzione cardiovascolare e sono stati analizzati in studi osservazionali i potenziali effetti neuro- e nefroprotettivi, anti-neoplastici, anti-aging e di protezione dal COVID-19.

In questa rassegna saranno analizzate alcune delle azioni della metformina che riguardano gli effetti sugli eventi cardiovascolari, sulle complicanze micro-vascolari, sulla NAFLD/NASH, sul cancro e sul COVID-19.

Esistono una serie di studi in modelli cellulari, animali e sull'uomo che hanno indagato i meccanismi d'azione cardioprotettivi della metformina mediati sia dall'attivazione della proteina chinasi AMP-activated protein kinase (AMPK) sia dall'attivazione di altre vie di trasduzione del segnale. Questi studi hanno dimostrato un effetto protettivo della metformina sull'infarto del miocardio, sull'ipertrofia cardiaca, sullo scompenso cardiaco e sulla cardiopatia diabetica. Esistono anche metanalisi di studi condotti su modelli animali ex vivo ed in vivo che hanno dimostrato un effetto positivo della metformina sulla riduzione delle dimensioni dell'infarto del miocardio.

Gli effetti della metformina su outcome cardiovascolari sono stati analizzati solamente in tre studi randomizzati controllati: l'UKPSD (3), lo studio HOME (4) e lo SPREAD-DIMCAD (5) (Fig. 2). Nello studio *United Kingdom Prospective*

Diabetes Study (UKPSD), il trattamento intensivo con metformina in un sottogruppo di pazienti sovrappeso o obesi determinava una riduzione della mortalità associata a diabete del 42% (HR: 0.58, 95% CI: 0.37-0.91) e di quella dovuta a tutte le cause del 36% (HR: 0.64, 95% CI: 0.45-0.91) rispetto al trattamento convenzionale. Inoltre, l'uso di metformina determinava una riduzione del 41% del rischio di infarto del miocardio (HR: 0.61, 95% CI: 0.41-0.89) (3) (Fig. 3). La sicurezza cardiovascolare della metformina è stata confermata nello studio HOME (*Hyperinsulinemia: the Outcome of its Metabolic Effects*), uno dei pochi studi controllati contro placebo condotto in pazienti con diabete di tipo 2 in trattamento con insulina e in gran parte senza malattia cardiovascolare pregressa. Il trattamento con metformina ha mostrato oltre al miglioramento del controllo glicemico, una riduzione del 40% della malattia cardiovascolare (HR: 0.60, 95% CI: 0.40-0.92) (endpoint secondario composito) ma non dell'endpoint primario (composito tra morbidità e mortalità micro- e macro-vascolare) (4). Infine, lo studio in doppio cieco SPREAD-DIMCAD (*The Study on the Prognosis and Effect of Antidiabetic Drugs on Type 2 Diabetes Mellitus with Coronary Artery Disease*), condotto in 304 pazienti con diabete di tipo 2 e coronaropatia, è l'unico che ha confrontato gli effetti del trattamento per 3 anni con glipizide in confronto metformina. Il trattamento con metformina è risultato associato a una riduzione del 46% (HR 0.54; 95% CI: 0.30-0.90) degli eventi che costituivano l'endpoint primario (morte cardiovascolare, morte per tutte le cause, infarto non fatale, ictus non fatale o rivascolarizzazione arteriosa) (5) (Fig. 3).

Sulla base di queste evidenze, le Linee Guida della Società Italiana di Diabetologia (SID) e dell'Associazione dei Medici Diabetologi (AMD) riguardanti la terapia del diabete mellito di tipo 2 raccomandano l'uso di metformina, SGLT-2i e GLP-1 RA come farmaci di prima scelta per il trattamento a lungo termine in pazienti con diabete di tipo 2 con pregressi eventi cardiovascolari e senza scompenso cardiaco. Questa raccomandazione è classificata come forte e la qualità delle prove è considerata moderata. Gli effetti della metformina su outcome microvascolari sono stati analizzati solamente in due studi randomizzati controllati: l'UKPSD (3) e lo studio HOME. Nello studio UKPSD, il trattamento con metformina non induceva una riduzione degli eventi microvascolari aggregati (retinopatia che richiedeva fotocoagulazione, emorragia del vitreo e insufficienza renale fatale o non fatale) sia rispetto alla

Figura 2 ♦ Caratteristiche cliniche degli studi UKPDS 34, HOME e SPREAD-DIMCAD

UKPDS 34, HOME, and SPREAD-DIMCAD Caratteristiche degli studi

	UKPDS 34	HOME	SPREAD-DIMCAD
Partecipanti (n)	753	390	304
Protocollo	Metformin vs. dieta	Metformina + insulina vs. insulina alone	Metformina vs. glipizide
Storia di precedenti eventi cardiovascolari (%)	NR	1.4 vs. 1.3	100 (CAD)
Durata diabete (anni)	0.3	14 vs. 12	5.6 vs. 5.6
HbA1c (%) al basale	7.1 vs. 7.3	7.9 vs. 7.9	7.6 vs. 7.6

Figura 3 ♦ Risultati dell'endpoint primario degli studi UKPDS 34, HOME e SPREAD-DIMCAD

UKPDS 34, HOME, and SPREAD-DIMCAD Risultati

	UKPDS 34	HOME	SPREAD-DIMCAD
HbA1c % (metformina vs. controllo)	8.4 vs. 8.9	7.7 vs. 7.9	7.0 vs. 7.1
Definizione degli endpoint primari	21 endpoints clinici	Complicanze microvascolari + macrovascolari	Mortalità cardiovascolare, mortalità per tutte le cause, infarto dle miocardio non fatale, ictus non fatale o rivascolarizzazione
Follow-up (anni)	10.7	4.3	3
HR per l'endpoint primario (95%CI)	0.61 (MI) (0.41-0.89) P=0.01	0.60* (0.40-0.92) P=0.04	0.54 (0.30-0.90) P=0.026
HR per la mortalità per tutte le cause (95%CI)	0.64 (0.45-0.91) (P=0.011)	Non disponibile	P = 0.55

*Complicanze macrovascolari, endpoint secondario

terapia intensiva, che alla terapia convenzionale. Nello studio HOME, il trattamento con metformina non era associato ad una riduzione delle complicanze microvascolari (HR: 1.04, 95% CI: 0.75-1.44). Anche le metanalisi di questi studi indicano che la metformina abbia effetti neutri sulle complicanze microvascolari. Questa raccomandazione potrebbe essere classificata come forte e la qualità delle prove potrebbe essere considerata moderata. Numerosi studi preclinici in modelli animali hanno dimostrato che l'attivazione della proteina chinasi AMPK da parte della metformina e di altri attivatori è in grado di migliorare la steatosi epatica non alcolica (*Nonalcoholic Fatty Liver Disease* - NAFLD). Infatti, l'attivazione di AMPK

induce una riduzione della sintesi de novo dei lipidi a livello epatico, aumenta l'ossidazione degli acidi grassi, migliora l'autofagia e stimola la biogenesi dei mitocondri (6). Diversi trial clinici randomizzati hanno valutato gli effetti della metformina sui markers epatici e sulla NAFLD diagnosticata mediante biopsia epatica. La metanalisi di questi studi ha evidenziato come la metformina ha un modesto, ma significativo, effetto sulla riduzione delle ALT nei soggetti con NAFLD ma non in quelli affetti da steatoepatite non alcolica (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis* - NASH) (7). La metformina non riduce significativamente i livelli di AST sia nei soggetti con NAFLD sia in quelli con NASH. Le metanalisi dei trial clinici randomizzati che

hanno valutato gli effetti della metformina sulla NAFLD diagnosticata mediante biopsia epatica e sul suo avanzamento verso NASH hanno evidenziato un effetto neutro sulla steatosi, sull'infiammazione, sul ballooning e sulla fibrosi (7).

Da questi dati si evince che la metformina non ha effetti terapeutici sulla NAFLD e sulla NASH e questa raccomandazione potrebbe essere classificata come forte e la qualità delle prove potrebbe essere considerata moderata.

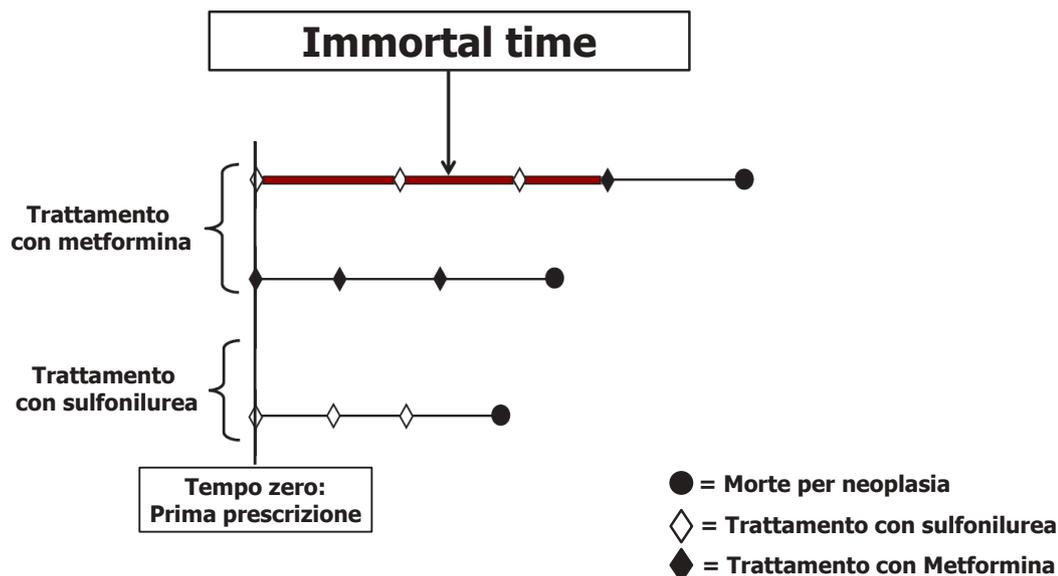
Diversi studi sperimentali in modelli cellulari e animali suggeriscono che l'effetto antitumorale della metformina sia dovuto a una combinazione di effetti indiretti sistemici e diretti (8). Gli effetti indiretti sistemici potrebbero essere secondari all'azione della metformina sul metabolismo nei tessuti bersaglio insulino-sensibili. Infatti, la metformina riduce i livelli circolanti di glucosio e insulina con conseguente riduzione della crescita e la progressione del tumore mediata dall'insulina (8). Anche gli effetti antinfiammatori della metformina possono contribuire a ridurre il rischio di cancro. La metformina potrebbe inibire a più livelli l'attivazione di mTORC1 (*Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*), un complesso proteico che svolge un ruolo importante nella sintesi proteica e nella proliferazione tumorale. La bassa carica energetica nelle cellule tumorali trattate con metformina attiva la proteina chinasi AMPK, che può frenare la crescita e la proliferazione cellulare attraverso l'attivazione del gene oncosoppressore TSC2. La metformina potrebbe anche ridurre il segnale di trasduzione a valle dei recettori dell'insulina e dell'IGF-1 in via indiretta, riducendo i livelli di insulina, e, in via diretta, attraverso la fosforilazione AMPK-dipendente del substrato IRS-1 che stimola l'attivazione della via AKT/mTORC1 provocando così una riduzione della sintesi proteica e della proliferazione tumorale (8).

Sono stati pubblicati diversi studi osservazionali che hanno investigato l'associazione tra esposizione a metformina e cancro e alcuni studi randomizzati di confronto della metformina e altri agenti ipoglicemizzanti sul rischio di insorgenza di cancro e di mortalità. In una metanalisi di 18 studi osservazionali con 561.836 soggetti, è stata osservata una riduzione significativa del rischio di qualsiasi tumore maligno nei pazienti esposti a metformina rispetto ai pazienti non esposti a metformina (OR: 0.73, 95% CI: 0.61-0.88, $p=0.001$). Tuttavia, era presente un alto grado di eterogeneità tra i vari studi (9). Al contrario, in una metanalisi di 7 trial rando-

mizzati controllati con 17.785 partecipanti, l'esposizione a metformina non era associata ad alcuna significativa riduzione del rischio di malignità con rispetto ai pazienti non esposti a metformina (OR: 0.98; 0.81-1.19, $p=0.83$) (9). Risultati simili sono stati ottenuti analizzando la mortalità correlata al cancro. Nella metanalisi di 11 studi, 6 osservazionali e 5 trial randomizzati controllati, che includevano 28.671 pazienti, si è osservato una riduzione significativa del rischio di mortalità nei pazienti esposti a metformina rispetto ai pazienti non esposti a metformina (OR: 0.65, 95% CI: 0.53-0.80; $p<0.0001$) negli studi osservazionali. Tuttavia, nei trial clinici randomizzati, l'esposizione a metformina non era associata ad alcuna significativa riduzione della mortalità per cancro con rispetto ai pazienti non esposti a metformina (OR: 1.13, 95% CI 0.82-2.08; $p=0.685$) (9).

Risultati più promettenti sono stati osservati quando sono stati analizzati gli effetti della metformina come terapia coadiuvante forme specifiche di neoplasia. Ad esempio, una metanalisi degli effetti della metformina come coadiuvante nel trattamento del tumore del colon-retto ha evidenziato che il trattamento con metformina riduceva la ricomparsa della neoplasia (HR: 0.63, 95% IC: 0.47-0.85), la mortalità totale (HR: 0.69, 95% IC: 0.58-0.83) e quella cancro specifica (HR: 0.58, 95% IC: 0.39-0.86) (10). Alla luce dei dati di letteratura, il potenziale effetto antitumorale della metformina, identificato negli studi osservazionali, non è ancora stato dimostrato nei pochi studi randomizzati controllati che sono stati condotti. Questi trial non sono stati progettati per valutare come outcome primario l'effetto della metformina sui maggiori eventi clinici, e quindi è necessaria una conferma in trial di intervento progettati ad hoc con una adeguata durata. Le discordanti osservazioni tra gli studi osservazionali e quelli randomizzati possono essere dovute a diversi fattori tra cui l'eterogeneità delle popolazioni di confronto e dei tumori analizzati e il time-lag bias ovvero il fattore confondente indotto dalla storia più breve di diabete. È infatti probabile che i soggetti trattati con metformina, farmaco di prima linea, abbiano una durata più breve di diabete e quindi un rischio inferiore di cancro rispetto ai soggetti in trattamento con altri farmaci di seconda linea. In questo caso, la durata maggiore del diabete potrebbe essere associata a una maggiore incidenza del cancro, indipendentemente dall'età. Questo time-lag bias

Figura 4 ♦ Illustrazione del cosiddetto *immortal bias* utilizzando un esempio di pazienti esposti a metformina e sulfoniluree deceduti per neoplasia



richiederebbe studi di confronto tra soggetti appaiati per durata della malattia.

Un altro fattore confondente è quello legato al cosiddetto *immortal bias* ovvero a quell'effetto comune a molti degli studi di intervento farmacologico che si verifica quando l'inizio del trattamento di un individuo non tiene conto del tempo che ha vissuto assumendo altre terapie (Fig. 4). È come se l'inizio del trattamento con metformina assumesse anche i vantaggi delle terapie precedenti, che hanno allungato la "sopravvivenza". Questo è un bias comune negli studi osservazionali in cui i soggetti partecipanti non sono tutti trattati allo stesso tempo zero con i farmaci oggetto della comparazione.

Da questi dati si evince che la metformina sembra avere effetti protettivi nei confronti della insorgenza di cancro e mortalità per neoplasie negli studi osservazionali ma non nei trial controllati randomizzati e questa raccomandazione potrebbe essere classificata come debole e la qualità delle prove potrebbe essere considerata bassa/moderata.

Il trattamento con metformina potrebbe fornire diversi vantaggi contro l'infezione da SARS-CoV-2 (12). L'attivazione della proteina chinasi AMPK potrebbe indurre la fosforilazione del recettore ACE2 provocandone un cambiamento conformazionale che inibisce il legame dello spike proteico virale con il recettore ACE2 con conseguente riduzione dell'ingresso virale nella cellula. L'aumento dell'espressione e della stabilità di ACE2 potrebbe incrementare

la protezione cardiopolmonare. La capacità della metformina di ridurre i livelli circolanti di glucosio e migliorare la sensibilità all'insulina riduce il rischio di infezioni da SARS-CoV-2. La metformina sopprime la risposta infiammatoria e il rilascio di citochine pro-infiammatorie inibendo l'attivazione dei macrofagi e inibisce la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) mitocondriali. Inoltre, la metformina sopprime le interazioni proteina-virus ospite inibendo la replicazione virale host-dipendente, la sintesi delle proteine virali, la maturazione e il rilascio del virione. In aggiunta, poiché la metformina è una base forte, aumenta il pH cellulare ed endosomiale sopprimendo il ciclo endocitosico e l'assemblaggio e la maturazione del virione. Infine, grazie ai suoi effetti anti-iperglicemici, antiossidanti, immunomodulatori e antinfiammatori, la metformina attenua la disfunzione endoteliale e potrebbe conferire protezione vascolare, riducendo così le complicanze microvascolari e gli eventi trombotici durante l'infezione da SARS-CoV-2 (12).

I dati di letteratura disponibili sui potenziali effetti protettivi della metformina nei confronti della infezione da COVID-19 sono tratti da studi osservazionali. Una pooled analysis che ha analizzato la mortalità intraospedaliera di 5 studi ha evidenziato che i soggetti ospedalizzati in trattamento con metformina prima dell'ammissione in ospedale avevano una riduzione della mortalità del 38% (OR:

0.62; 95% CI: 0.43-0.89) rispetto ai soggetti non trattati con metformina (13).

In uno studio di coorte osservazionale condotto nel Regno Unito a livello nazionale utilizzando i dati del National Diabetes Audit per persone con diabete di tipo 2 e che ha raccolto le informazioni di 2.851.465 soggetti, è stato osservato che il trattamento con metformina era associato ad una riduzione del 23% della mortalità dovuta all'infezione da COVID-19 (HR: 0.77 95% IC: 0.73-0.81) (14). Occorre, tuttavia, osservare che lo studio non consente di escludere potenziali bias di reclutamento in quanto la metformina costituisce il farmaco di prima linea prescritto a soggetti con minore durata di malattia e assenza di complicanze che ne controindicano l'uso come l'insufficienza renale cronica, le malattie epatiche avanzate, la broncopatia cronico ostruttiva, l'insufficienza cardiaca. Da questi dati si evince che la metformina sembra avere effetti protettivi nei confronti del COVID-19 e questa raccomandazione potrebbe essere classificata come forte e la qualità delle prove potrebbe essere considerata bassa/moderata.

BIBLIOGRAFIA

1. Drzewoski J, Hanefeld M. The Current and Potential Therapeutic Use of Metformin-The Good Old Drug. *Pharmaceuticals (Basel)* 14(2): 122, 2021.
2. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab* 20(6): 953-66, 2014.
3. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 352: 854-65, 1998.
4. Kooy A, de Jager J, Lehert P, et al. Long-term effects of metformin on metabolism and microvascular and macrovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 169: 616-25, 2009.
5. Hong J, Zhang Y, Lai S, Lv A, Su Q, Dong Y, Zhou Z, Tang W, Zhao J, Cui L, Zou D, Wang D, Li H, Liu C, Wu G, Shen J, Zhu D, Wang W, Shen W, Ning G; SPREAD-DIMCAD Investigators. Effects of metformin versus glipizide on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Care* 36(5): 1304-11, 2013.
6. Smith BK, Marcinko K, Desjardins EM, Lally JS, Ford RJ, Steinberg GR. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 311(4):E730-E740, 2016.
7. Li Y, Liu L, Wang B, Wang J, Chen D. Metformin in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Res* 1(1): 57-64, 2013.
8. Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol* 10(3): 143-56, 2014.
9. Franciosi M, Lucisano G, Lapice E, Strippoli GF, Pellegrini F, Nicolucci A. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. *PLoS One* 8(8): e71583, 2013.
10. Coyle C, Cafferty FH, Vale C, Langley RE. Metformin as an adjuvant treatment for cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol* 27(12): 2184-95, 2016.
11. Suissa S, Azoulay L. Metformin and the risk of cancer: time-related biases in observational studies. *Diabetes Care* 35(12): 2665-73, 2012.
12. Samuel SM, Varghese E, Büsselberg D. Therapeutic Potential of Metformin in COVID-19: Reasoning for Its Protective Role. *Trends Microbiol* 29(10): 894-907, 2021.
13. Kow CS, Hasan SS Mortality risk with preadmission metformin use in patients with COVID-19 and diabetes: A meta-analysis. *J Med Virol* 93(2): 695-97, 2021.
14. Khunti K, Knighton P, Zaccardi F, Bakhai C, Barron E, Holman N, Kar P, Meace C, Sattar N, Sharp S, Wareham NJ, Weaver A, Woch E, Young B, Valabhji J. Prescription of glucose-lowering therapies and risk of COVID-19 mortality in people with type 2 diabetes: a nationwide observational study in England. *Lancet Diabetes Endocrinol* 9(5): 293-303, 2021.

Le reali contro-indicazioni all'utilizzo della metformina

Metformin: the real contraindications

Salvatore Piro

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2202c>

ABSTRACT

Metformin, a molecule belonging to the biguanide family, is one of the best known and most widely used drug for the management of diabetes mellitus therapy in the world.

During sixty years of its use, countless benefits have been described, not only for the treatment of diabetes mellitus. However, due to similarity with other members of the drug family, concern remains high about the risk of developing lactic acidosis. This article attempts to take stock of the real risks associated with the use of metformin, trying to shed light on the real risks and the possible onset of lactic acidosis or renal damage. Metformin-induced lactic acidosis exists but is rare. Appropriate use of the drug, under safe conditions, induces benefits in the absence of risks.

KEYWORDS

Metformin, biguanides, MALA, Metformin-Associated Lactic Acidosis.

La metformina, molecola appartenente alla famiglia delle biguanidi, è tra i farmaci più noti e più utilizzati per la gestione della terapia del diabete mellito nel mondo.

Commercializzata per la prima volta in Europa nel 1957, ha raggiunto la vera gloria nel 1995 quando inizia ad essere utilizzata e raccomandata anche negli Stati Uniti d'America. Alla stessa famiglia chimica appartengono anche la buformina e la fenformina. La buformina è stata sintetizzata nel 1957 e continua ad essere commercializzata in alcuni paesi emergenti con poche evidenze

cliniche disponibili; la fenformina invece è stata ampiamente commercializzata dagli anni Cinquanta ed è stata ritirata nel 1976 per l'elevato numero di casi di acidosi lattica riscontrati in associazione all'utilizzo della stessa (Fig. 1). Dal punto di vista della farmacocinetica e della farmacodinamica, nonostante l'appartenenza alla stessa classe chimica, la fenformina mostra una forte affinità per il complesso I mitocondriale, con una emivita plasmatica di 9-12 ore venendo eliminata dal rene solo per il 35%; il suo effetto sembra svolgersi prevalentemente con l'inibizione del metabolismo ossidativo periferico e con una azione importante a livello del metabolismo epatico. La metformina mostra invece una debole affinità con il complesso I della catena respiratoria mitocondriale, una emivita plasmatica di circa 6 ore con una eliminazione che avviene prevalentemente per via renale. Infatti, circa il 90% della metformina viene eliminata dal rene in 24 ore. Le azioni sul metabolismo epatico e sul metabolismo ossidativo periferico risultano assenti (Fig. 2). Pochissimi dati sono disponibili sulla farmacocinetica e farmacodinamica della buformina (1).

La metformina, sin dal momento della sua prima commercializzazione e maggiormente dalla sua disponibilità nel mercato degli Stati Uniti d'America non ha mai avuto eguali; in sessant'anni le evidenze precliniche e cliniche ne hanno sempre incoraggiato all'utilizzo (2-6). Nel 2017 è stato sottolineato il sessantesimo anno del suo successo con un numero speciale pubblicato su *Diabetologia* [www.

Figura 1 ♦ Le biguanidi: la struttura chimica e la storia della fenformina, della buformina e della metformina in relazione alla loro disponibilità nel mercato farmacologico internazionale

Le biguanidi

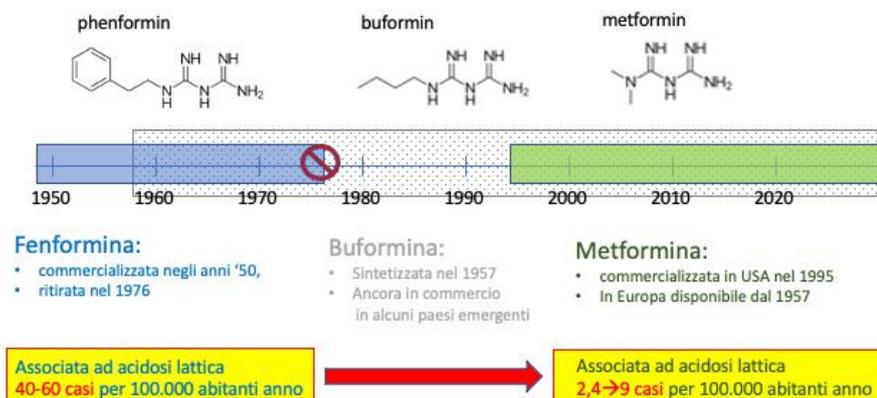


Figura 2 ♦ Farmacodinamica e farmacocinetica della fenformina e della metformina

Le biguanidi

	phenformin <chem>Nc1nc(NC2=CC=CC=C2)nc1</chem>	metformin <chem>Nc1nc(NC2=CC=CC=C2)nc1</chem>
Farmacodinamica	FORTE affinità complesso I mitocondriale	DEBOLE affinità complesso I mitocondriale
Inibizione metabolismo Ossidativo periferico	SI	NO
Metabolismo epatico	SI	NO
Eliminazione renale	Circa il 35% del farmaco viene eliminato immodificato dal rene	Circa 90% viene eliminato in 24h
Emivita plasmatica	9→12 h	6,2 h

buformin 
Pochi dati disponibili

springer.com/journal/125/updates/17199106 (ultima consultazione 01/06/2022)]. In questa *special issue*, una serie di contributi ripercorrono la storia, i meccanismi di azione noti fino alla data attuale, le migliori evidenze cliniche e le prospettive future di utilizzo anche come farmaco anti-aging o per la prevenzione di alcuni tumori (3, 7-9).

UTILIZZO NON UTILIZZO DIVIETO

Le indicazioni all'utilizzo e le controindicazioni sono riportate nella RCP della metformina e vengono aggiornate continuamente come per ogni farmaco.

Si riporta qui per facilità la RCP/scheda tecnica della metformina: (https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_001561_037040_RCP.pdf&sys=mobil3 [ultima consultazione 01/06/2022]).

L'utilizzo della metformina è raccomandato già come primo approccio farmacologico sin dalla diagnosi di diabete di tipo 2. Tutte le linee guida diabetologiche internazionali sono concordi nel ritenere questo approccio univoco e necessario. Esistono inoltre evidenze scientifiche che spingerebbero all'utilizzo più precoce anche nelle fasi di pre-diabete (10-11). Tuttavia, alla data attuale questa pos-

sibilità è riservata alla libera scelta dello specialista, con assunzione di responsabilità che deve passare dalla condivisione del consenso da parte del paziente. La rimborsabilità del farmaco sarà a carico del Sistema Sanitario Nazionale solo per l'indicazione di diabete mellito di tipo 2. La metformina non dovrebbe essere utilizzata nei pazienti con diabete di tipo 1 per gestire la glicemia e non è assolutamente immaginabile il suo utilizzo in alternativa all'insulina. La copresenza di obesità e sindromi da insulino-resistenza ne incoraggiano la somministrazione. È ampiamente riconosciuto che sia possibile associare metformina con qualsiasi altro farmaco o trattamento per la gestione del diabete.

Dalla attuale scheda tecnica/RCP del prodotto si evince inoltre che alcune condizioni cliniche ne determinano la assoluta controindicazione. Tra queste si evidenzia il non utilizzo in caso di ipersensibilità alla molecola o in caso di coma o pre-coma derivante dalla condizione di diabete. Sono elencati inoltre come condizioni di non impiego la presenza di insufficienza renale cronica con eGFR inferiore a 30 ml/min/1,73 m², in condizioni di malattie che possono provocare ipossia tissutale (insufficienza cardiaca in fase di scompenso, insufficienza respiratoria acuta, infarto acuto del miocardio o shock) o in condizioni di insufficienza epatica grave ed intossicazione da alcol.

Qualsiasi condizione acuta di ipossia tissutale ne rappresenta un divieto all'utilizzo.

Interpretazione del paragrafo precedente

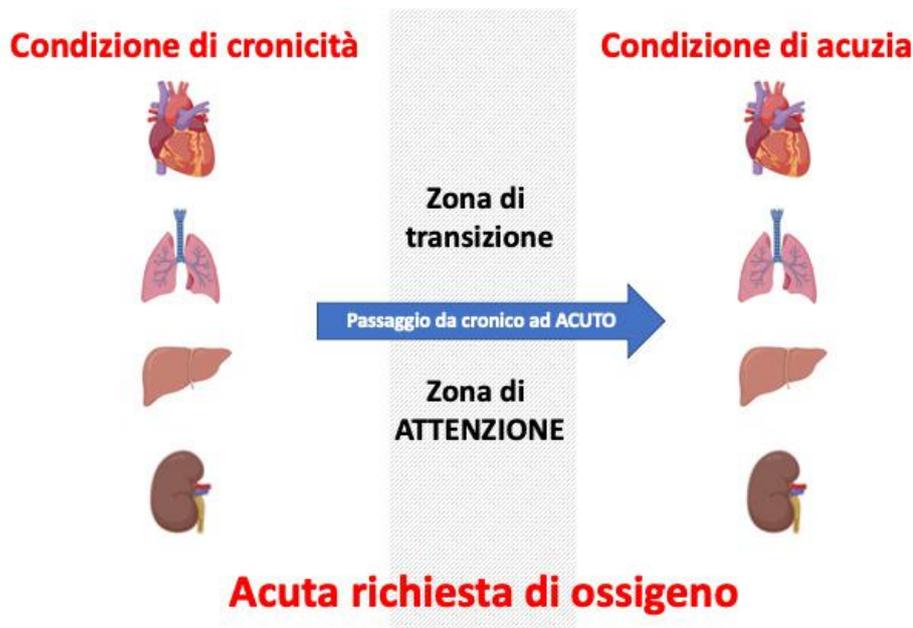
Le controindicazioni all'utilizzo della metformina negli anni passati hanno subito delle modifiche per adattarsi alle evidenze derivanti dalle acquisizioni di letteratura o per sottolineare talvolta l'atteggiamento medico non consono alla loro interpretazione. Riguardo a quest'ultima affermazione bisogna evidenziare come sia abbastanza diffuso l'atteggiamento di considerare la metformina un agente nefrotossico, in grado di danneggiare il rene. Va ribadito con forza che questo non è vero e che addirittura nel tempo recente l'impiego della metformina nella pratica clinica è stato svincolato dal valore di creatinina plasmatica, sottolineandone un possibile utilizzo fino a valori di eGFR di 30 ml/min/1,73 m². Questo aspetto di apertura dovrebbe rassicurare chi per anni ha temuto di compromettere la funzione renale e per questo non ha utilizzato la molecola. Analogo ragionamento va fatto per l'insufficienza respiratoria, epatica o cardiaca. Seppur

elencati tra le condizioni che possono decretarne la non raccomandazione all'utilizzo, la loro presenza nell'elenco delle controindicazioni è sempre accompagnato dal termine "ACUTO". Pertanto, interpretando correttamente il paragrafo delle controindicazioni all'interno della più recente RCP, soltanto le condizioni di acuzia di insufficienza respiratoria, cardiaca, epatica e renale dovrebbero impedirne l'utilizzo nei pazienti diabetici.

FISIOPATOLOGIA DEL TERMINE "ACUTO"

Le controindicazioni all'utilizzo riportate nella scheda tecnica indicano dunque una certa cautela verso condizioni di ridotta funzione renale, epatica, respiratoria e cardiaca. Come noto, tuttavia, queste condizioni internistiche convivono all'interno della maggior parte dei pazienti con diabete e possono coesistere con il diabete per tutta la durata della vita. Va quindi chiarito il momento oltre il quale non è possibile utilizzare la metformina e di contro la zona di comfort all'interno della quale deve essere utilizzate per il bene del paziente. Per comprendere questo limite bisognerà analizzare la storia naturale delle condizioni di insufficienza di funzionale dei parenchimi epatico, cardiaco, polmonare e renale. Certamente in maniera fisiologica questi organi invecchiano e riducono la loro funzione nel corso della vita. Una eterogeneità di decadimento funzionale comincia ad essere presente già dopo il terzo decennio di vita per ognuno di questi organi e certamente la co-presenza di patologie sistemiche, utilizzo di farmaci e terapie complesse possono determinare ulteriori riduzioni di funzione. Fisiopatologicamente, tuttavia, il limite che determina il passaggio da insufficienza cronica ad insufficienza acuta è rappresentata da una "acuta" perdita di funzione o da una "acuta" maggiore richiesta di funzione. In questa condizione è certamente la maggiore richiesta "acuta" di ossigeno che determina il crollo rapido della funzione dell'organo. La richiesta acuta di ossigeno è riconosciuta come determinante fisiopatologica del passaggio da insufficienza cronica ad insufficienza acuta. Questo momento fisiopatologico a livello cellulare si verifica con l'incremento della produzione dei lattati. La produzione di lattati rappresenta inoltre il vero rischio all'utilizzo delle biguanidi. Queste evidenze indicano che l'utilizzo improprio della metformina potrebbe gravare sul bisogno acuto di ossigeno dei tessuti e potenziare la produzione di lattati, aprendo la porta alla temibile acidosi lattica (Fig. 3).

Figura 3 ♦ Rappresentazione schematica dell'evoluzione dallo stato cronico allo stato acuto del danno di cuore, polmone, fegato e rene. La zona di transizione del passaggio rappresenta il momento fisiopatologico più importante per lo sviluppo di ipossia tissutale e sviluppo di acidosi



COME SI FORMANO I LATTATI

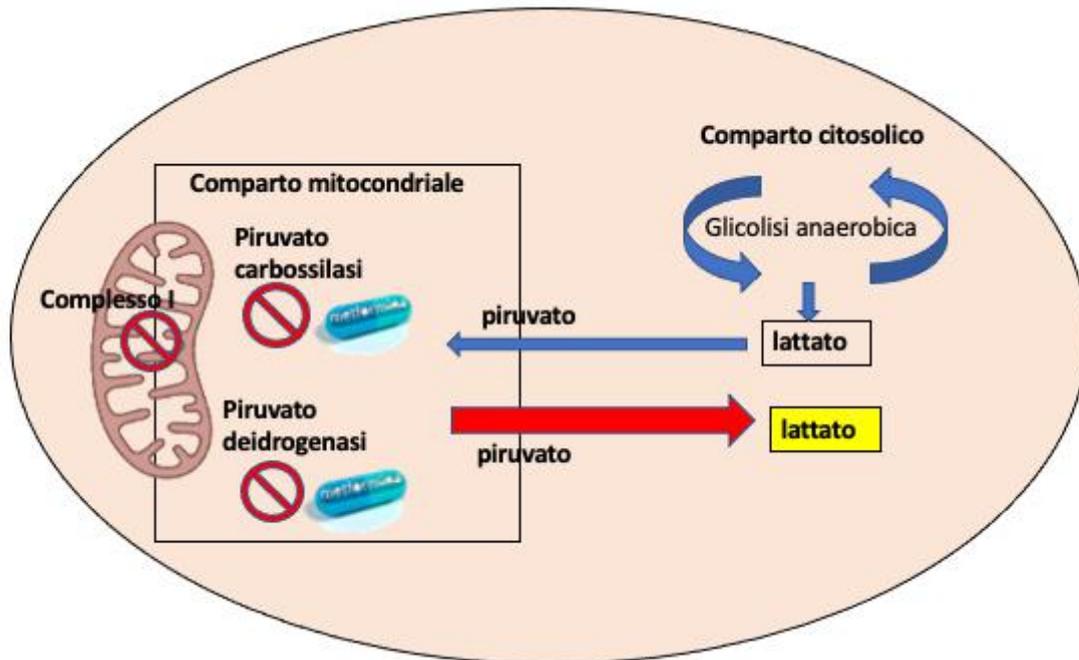
Volendo descrivere brevemente il metabolismo dei nutrienti a livello cellulare, si ricorderà come alcuni processi avvengano a livello citosolico ed altri a livello mitocondriale. Il mitocondrio certamente rappresenta la sede dei processi ossidativi in presenza di ossigeno (12). Se volessimo, da clinici, schematizzare questi processi, potremmo ricordare che un primo grado di utilizzo grossolano dei nutrienti le cellule lo applicano in assenza di ossigeno a livello citosolico. Tuttavia, il ricavo energetico più importante viene ottenuto a livello mitocondriale, tramite l'utilizzo della catena respiratoria e dei complessi ad essa connessi. La reazione più nota che partecipa a questa resa energetica è certamente il ciclo di Krebs. Il combustibile principale del ciclo di Krebs è il piruvato. Quest'ultimo rappresenta il prodotto di ingresso del metabolismo mitocondriale, derivante dal lattato prodotto dalla glicolisi anaerobia citosolica. Con questa elementare sintesi, magari eccessivamente semplificata, risulta chiaro che il piruvato potrebbe essere eletto come protagonista per la nostra comprensione. Dal lato citosolico, all'aumento del metabolismo anaerobio corrisponde un aumento di produzione di lattato che dovrà essere trasformato in pi-

ruvato per ricavarne energia all'interno del mitocondrio. Un blocco della trasformazione del lattato in piruvato potrà rappresentare un fattore limitante alla produzione di energia ma anche un rischio di accumulo di lattato dentro la cellula. Parallelamente, un blocco dell'ingresso del piruvato all'interno del mitocondrio potrà determinare una maggiore trasformazione di piruvato a lattato (via contraria) ed un ulteriore rischio di accumulo di lattato a livello citosolico (Fig. 4). L'accumulo di lattato intracellulare determinerà una riduzione del pH ed una conseguente acidosi sistemica nota come acidosi lattica.

ACIDOSI LATTICA IN GENERALE

L'acidosi lattica è definita comunemente come una condizione clinica nella quale il pH del sangue arterioso risulta inferiore a 7.35 [v.n. 7.38-7.42], in presenza di una concentrazione di lattati su sangue arterioso superiore a 5 mmol/L [v.n. 0.5-2.2 mmol/L; (4.5-19.8 mg/dL)] (13). Queste determinazioni si ottengono tramite emogasanalisi su sangue arterioso e possono essere presenti in diverse condizioni cliniche legati a deficit di scambi alveolari, alterazioni funzionali del rene, disidratazione e sepsi. Condizioni di malattie debilitanti, vomito sostenuto e diarrea,

Figura 4 ♦ Schematica rappresentazione della formazione del lattato intracellulare. Il comparto citosolico, il comparto mitocondriale e il ruolo della metformina

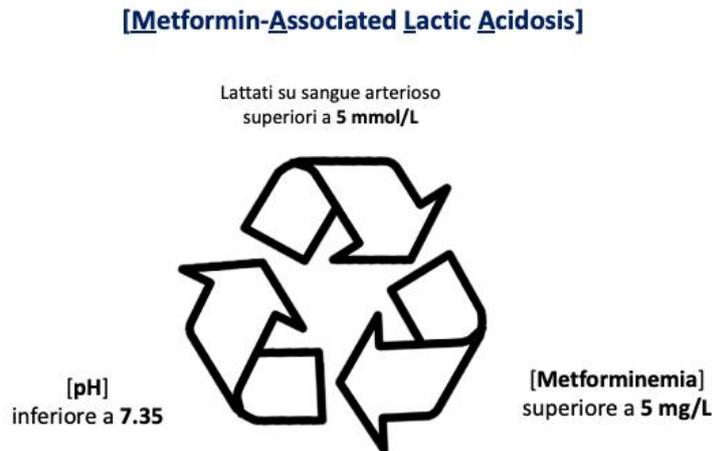


possono essere causa di acidosi lattica (14). Il ripristino del volume circolante e della corretta idratazione dell'organismo rappresenta la soluzione a molte di queste condizioni. In caso di ipossia, la corretta ri-ossigenazione dei tessuti sembra essere la corretta strategia di intervento. Gli stati di insufficienza renale acuta, secondarie a insulti acuti sul rene legati a cause renali o pre-renali potrebbero essere altre cause di sviluppo di acidosi lattica. Tra questi si annoverano le alterazioni acute renali determinate dall'utilizzo di mezzi di contrasto utilizzati in radiologia. Il corretto supporto di bicarbonati e la giusta idratazione rappresentano la strategia di prevenzione. Le acidosi con aumento dei lattati rappresentano in generale emergenze in medicina che possono portare a morte del paziente. In questi contesti, la presenza in circolo di metformina o biguanidi potrebbe essere un aggravante o forse un determinante negativo da evitare. Conoscere il ruolo della metformina in questo contesto potrebbe rappresentare il giusto determinante da apportare per il bene del paziente.

ACIDOSI LATTICA E METFORMINA

L'acidosi lattica associata alla metformina è nota in letteratura come MALA (*Metformin-Associated Lactic Acidosis*) (14). In questo contesto, l'acidosi lattica riscontrata in corso di

emogasanalisi dovrebbe coesistere con l'utilizzo di metformina. In questo caso quindi, oltre ai due determinanti individuati per l'acidosi lattica, pH arterioso inferiore 7.35 e concentrazione di lattati su sangue arterioso superiore a 5 mmol/L, dovremmo stabilire anche un ipotetico limite di metforminemia ematica (Fig. 5). Questo valore, fondamentale per definire la triade diagnostica, nella realtà clinica non risulta ben definito. La letteratura non è univoca nell'indicare un *cut-off* di riferimento al di sopra del quale il paziente potrebbe essere identificato a rischio di sviluppare acidosi lattica indotta la metformina. Esiste estrema variabilità di valori descritti in analisi specifiche ed eterogeneità di dosaggio e di determinazione. Non è chiaro, inoltre, se è meglio misurare i livelli di metformina su plasma o su siero. Una *short communication* del 2011 fa il punto sulla questione (15); in questo articolo vengono riportati i range di metformina misurata su plasma di pazienti in trattamento ed all'interno degli eritrociti degli stessi. Gli autori riportano una estrema eterogeneità di valori registrati, 2.7 mg/L per i livelli plasmatici e 2 mg/L per i livelli intra-eritrocitari. Nel lavoro, nonostante l'estrema eterogeneità dei dati, gli autori arbitrariamente si spingono a suggerire un valore superiore a 5 mg/L quale valore pragmatico identificato come soglia di rischio per

Figura 4 ♦ L'acidosi lattica associata all'uso di metformina (MALA). La triade che definisce i valori diagnostici

MALA. Al di sopra di 5 mg/L, il rischio di MALA potrebbe essere probabile nei pazienti in terapia con metformina.

LA MALA E LA VITA REALE

Se in corso di utilizzo di fenformina il riscontro di acidosi lattica era frequente (40-60 casi/100.000 abitanti/anno) (16-17), i casi di acidosi da metformina registrati nelle realtà occidentali risultano assai inferiori (2,4-9 casi/100.000 abitanti/anno) (18-20). Tuttavia, nonostante l'apparente numero ridotto, restano pur sempre numeri associati ad elevato rischio di decesso o morte. È quindi d'obbligo riconoscere il problema ed evitare il rischio. Pertanto, avendo note le tre determinanti dell'equazione [pH<7.35, lattati>5 mmol/L, metforminemia>5 mg/L] resta da definire quanto queste tre condizioni si verificano nei pazienti che utilizzano metformina e sviluppano acidosi lattica o di contro quanto queste condizioni siano non legate al farmaco. In altri termini, quali sono i valori di metforminemia che raggiungono i pazienti in terapia con metformina? Una bellissima *review* del 2017, metanalisi di 2.747 studi, si interroga su questo nostro stesso quesito e riporta una serie di evidenze illuminanti (21). Gli autori analizzano una serie di utilizzatori di metformina con condizioni sottostanti differenti e di seguito elencate: utilizzatori di metformina a dosaggio corretto e con corretta indicazione all'utilizzo; utilizzatori di metformina con controindicazione all'uso per comorbilità; utilizzatori di metformina in corso di esercizio fisico

intenso in grado di influenzare la produzione di lattati; utilizzatori di metformina in associazione a terapie antivirali per HIV con inibizione specifica del metabolismo mitocondriale. In questi gruppi i livelli di lattati non superavano 5 mmol/L in nessuna condizione. Nessun gruppo, anche in condizioni estreme, mostrava un aumento del valore di lattato superiore al limite di rischio. Questi dati rasserenano molto sulla possibilità di generare lattati in corso di terapia con metformina e sul rischio di generare MALA.

COSA SUCCEDDE ALLA TRIADE DURANTE LA MALA?

Se in corso di terapie estreme con metformina i valori di lattato non sembrano avere influenze pericolose, sarebbe utile sapere nel dettaglio come si comporta la triade in corso di MALA. Un lavoro di Duong e collaboratori di qualche anno fa ci permette di entrare nel dettaglio del problema (14). Gli autori riportano i dati di una coorte di soggetti ricoverati per documentata MALA con la triade soddisfatta [concentrazione media di metformina ematica 29,8±19.1 mg/L; concentrazione media di lattati ematici 12.9±6.1 mmol/L; media pH arterioso 7±0.2]. In questi soggetti è stato possibile dosare in maniera seriata i tre parametri ed effettuare le verifiche sulle determinanti in funzione delle condizioni cliniche, del decorso e della prognosi. Gli autori hanno riportato che nella coorte studiata i livelli di gravità del caso non correlavano con i livelli di pH ematico, con i livelli di lattati e con la met-

forminemia; inoltre, la metforminemia non correlava positivamente con i lattati e non era inversamente correlata con il pH. In questa coorte, tuttavia, gli esiti dei pazienti erano differenti nella presenza di decessi. L'analisi dettagliata degli esiti indicava che il declino della funzione renale durante il ricovero era il parametro prognostico negativo più importante; lo sviluppo di AKI (*Acute Kidney Disease*) era il determinante più importante per il peggioramento della prognosi come la copresenza di vomito e diarrea e lo sviluppo di sepsi.

Pertanto, come evidenziato all'inizio di questo articolo, forse è il declino verso la fase acuta di una condizione clinica che rappresenta il reale determinante del rischio piuttosto che la triade della MALA.

METFORMINA, SULFONILUREE E ACIDOSI LATTICA

Come riportato sopra, seppur la metformina potrebbe essere responsabile di MALA in proporzione decisamente inferiore rispetto alla fenformina, resta la necessità di comprendere come può variare il rischio di acidosi lattica in corso di terapie differenti rispetto alla famiglia delle biguanidi. Un recente articolo fa il paragone tra utilizzatori di metformina o sulfoniluree in soggetti con ridotta funzione renale in merito al rischio di ospedalizzazione per acidosi lattica (22). In questo studio di registro effettuato su dati di veterani americani, tramite una analisi retrospettiva dei dati con l'utilizzo del *propensity score matching* sono stati analizzati circa 50.000 soggetti: 24.542 nuovi utilizzatori di metformina e 24.662 soggetti utilizzatori di sulfoniluree. Gli *end-point* dello studio erano individuati nel numero di ospedalizzazione per acidosi lattica, nello sviluppo di acidosi lattica o morte. In questo lavoro, nessun rischio aggiuntivo era presente nei soggetti con insufficienza renale cronica ed utilizzo di metformina. Nessun rischio aggiuntivo era presente rispetto ai soggetti in terapia con sulfoniluree.

METFORMINA, POSSIAMO STARE TRANQUILLI?

Da quanto riportato fino a qui sembra quindi che l'utilizzo di metformina può considerarsi una pratica sicura; lo sviluppo acidosi lattica associata all'uso di metformina, la MALA appunto, sembra improbabile secondo le indicazioni correnti. La normale funzione renale e l'assenza di condizioni che possano determinare riduzioni acute del-

la stessa sembrano l'unica condizione da tenere in considerazione in corso di terapia. In presenza di un filtrato glomerulare adeguato e di condizioni di adeguata idratazione, l'utilizzo di metformina non ha limitazioni, nel range di dosaggio consentito. In corso di riduzioni del filtrato (in atto per eGFR inferiori a 30 ml/min/1,73 m²), in caso di rischio di sviluppare AKI, in corso di sepsi o in tutte le condizioni che possano determinare un accumulo di metformina a livello plasmatico la determinazione dei lattati potrebbe essere utile così come l'esecuzione di emogasanalisi in pazienti che praticano questa terapia. Escludendo queste condizioni, è possibile utilizzare questo farmaco tranquillamente e senza indugio.

Pertanto, facendo il punto dei dati riportati, risulta necessario precisare che l'utilizzo di metformina non è strettamente legato allo sviluppo di acidosi lattica né al rischio di determinare danno renale. I dati disponibili in letteratura, in parte sintetizzati in questo articolo, fanno chiarezza sul reale ruolo della metformina in corso di acidosi lattica. Non tutte le acidosi lattiche sono associate all'utilizzo di metformina. Pertanto, alcuni autori cominciano a fare leva sul reale significato di MALA (*Metformin-Associated Lactic Acidosis*) (23). Probabilmente forse sarebbe tempo di distinguere tra tutte le latticoacidemie che si presentano nella pratica clinica differenziando tra quelle associate all'utilizzo di metformina da quelle non correlate. Queste ultime, quindi, definite appunto MULA (*Metformin-Unrelated Lactic Acidosis*) seppur simili nella presentazione clinica, non avrebbero relazione con l'uso contemporaneo del farmaco. Il clinico nella sua valutazione complessiva potrebbe avere la possibilità e capacità di discernere e decidere anche sull'utilizzo del farmaco. Resta tuttavia importante tenere a mente che per il meccanismo d'azione noto e per il rischio connesso, quando la metformina rappresenta la causa dell'acidosi lattica, in questo caso sarebbe più corretto parlare di MILA (*Metformin-Induced Lactic Acidosis*), evidenziandone il ruolo patogenetico della molecola.

MALA, MULA o MILA quindi dovrebbero far parte del nostro vocabolario per comprendere e riconoscere il ruolo della metformina e l'origine dell'eventuale rischio e per scorporarne l'eventuale ingiusta incriminazione. Questa nomenclatura puntuale, proposta da Jean-Daniel Lalau e collaboratori (23), potrebbe consentire di fare ulteriore chiarezza su un aspetto importante della nostra pratica clinica.

CONSIDERAZIONI FINALI

Dopo sessant'anni di utilizzo la metformina continua a presentarsi sempre in splendida forma. Mezzo secolo di ricerche ne hanno evidenziato vantaggi e privilegi dei quali ogni paziente diabetico dovrebbe beneficiare. I potenziali benefici dimostrati in settori diversi dal diabete ne sottolineano l'ampia possibilità di utilizzo che sarà sempre maggiore nei prossimi anni. Se il rischio di acidosi lattica resta ancora un aspetto da considerare, le conoscenze disponibili lasciano lo spazio per essere molto più tranquilli nell'utilizzo anche in pazienti delicati. Tuttavia, preme precisare che qualsiasi condizione che possa richiedere un maggiore fabbisogno di ossigeno, qualsiasi condizione che determini un passaggio da uno stato di equilibrio ad uno stato acuto deve imporre il ragionamento e l'interrogativo se vale la pena di sospendere il trattamento. Escludendo questi aspetti, è possibile non avere indugio permettendo di utilizzare serenamente questo trattamento, sempre attuale, in tutti i pazienti con le corrette indicazioni.

BIBLIOGRAFIA

- Grytsai O, Myrgorodska I, Rocchi S, Ronco C, Benhida R. Biguanides drugs: Past success stories and promising future for drug discovery. *Eur J Med Chem* 224: 113726, 2021.
- Lupi R, Del Guerra S, Fierabracci V, Marselli L, Novelli M, Patane G, Boggi U, Mosca F, Piro S, Del Prato S, Marchetti P. Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin. *Diabetes* 51(Suppl 1): S134-137, 2002.
- Marshall SM. 60 years of metformin use: a glance at the past and a look to the future. *Diabetologia* 60(9): 1561-65, 2017.
- Papa G, Fedele V, Chiavetta A, Lorenti I, Leotta C, Luca S, Rabuazzo AM, Piro S, Alagona C, Spadaro L, Purrello F, Pezzino V. Therapeutic options for elderly diabetic subjects: open label, randomized clinical trial of insulin glargine added to oral antidiabetic drugs versus increased dosage of oral antidiabetic drugs. *Acta Diabetol* 45(1): 53-59, 2008.
- Patane G, Piro S, Rabuazzo AM, Anello M, Vigneri R, Purrello F. Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose: a direct metformin effect on pancreatic beta-cells. *Diabetes* 49(5): 735-40, 2000.
- Piro S, Rabuazzo AM, Renis M, Purrello F. Effects of metformin on oxidative stress, adenine nucleotides balance, and glucose-induced insulin release impaired by chronic free fatty acids exposure in rat pancreatic islets. *J Endocrinol Invest* 35(5): 504-10, 2012.
- Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia* 60(9): 1566-76, 2017.
- Heckman-Stoddard BM, DeCensi A, Sahasrabudhe VV, Ford LG. Repurposing metformin for the prevention of cancer and cancer recurrence. *Diabetologia* 60(9): 1639-47, 2017.
- Florez JC. The pharmacogenetics of metformin. *Diabetologia* 60(9): 1648-55, 2017.
- Aroda VR, Knowler WC, Crandall JP, Perreault L, Edelstein SL, Jeffries SL, Molitch ME, Pi-Sunyer X, Darwin C, Heckman-Stoddard BM, Temprosa M, Kahn SE, Nathan DM, Diabetes Prevention Program Research G. Metformin for diabetes prevention: insights gained from the Diabetes Prevention Program/Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Diabetologia* 60(9): 1601-11, 2017.
- The Diabetes Prevention Program. Design and methods for a clinical trial in the prevention of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22(4): 623-34, 1999.
- Kuan W, Beavers CJ, Guglin ME. Still sour about lactic acidosis years later: role of metformin in heart failure. *Heart Fail Rev* 23(3): 347-53, 2018.
- Luft D, Deichsel G, Schmulling RM, Stein W, Eggstein M. Definition of clinically relevant lactic acidosis in patients with internal diseases. *Am J Clin Pathol* 80(4): 484-89, 1983.
- Duong JK, Furlong TJ, Roberts DM, Graham GG, Greenfield JR, Williams KM, Day RO. The Role of Metformin in Metformin-Associated Lactic Acidosis (MALA): Case Series and Formulation of a Model of Pathogenesis. *Drug Saf* 36(9): 733-46, 2013.
- Lalau JD, Lemaire-Hurtel AS, Lacroix C. Establishment of a database of metformin plasma concentrations and erythrocyte levels in normal and emergency situations. *Clin Drug Investig* 31(6): 435-38, 2011.
- Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med* 334(9): 574-79, 1996.

17. DeFronzo R, Fleming GA, Chen K, Bicsak TA. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. *Metabolism* 65(2): 20-29, 2016.
18. Salpeter SR, Greyber E, Pasternak GA, Salpeter EE. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 163(21): 2594-602, 2003.
19. Wiholm BE, Myrhed M. Metformin-associated lactic acidosis in Sweden 1977-1991. *Eur J Clin Pharmacol* 44(6): 589-91, 1993.
20. Brown JB, Pedula K, Barzilay J, Herson MK, Latare P. Lactic acidosis rates in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 21(10): 1659-63, 1998.
21. Huang W, Castelino RL, Peterson GM. Lactate Levels with Chronic Metformin Use: A Narrative Review. *Clin Drug Investig* 37(11): 991-1007, 2017.
22. Chu PY, Hackstadt AJ, Chipman J, Griffin MR, Hung AM, Greevy RA, Jr., Grijalva CG, Elasy T, Roumie CL. Hospitalization for Lactic Acidosis Among Patients With Reduced Kidney Function Treated With Metformin or Sulfonylureas. *Diabetes Care* 43(7): 1462-70, 2020.
23. Lalau JD, Kajbaf F, Protti A, Christensen MM, De Broe ME, Wiernsperger N. Metformin-associated lactic acidosis (MALA): Moving towards a new paradigm. *Diabetes Obes Metab* 19(11): 1502-12, 2017.

Metformina farmaco anti-aging? Tra promesse ed evidenze

Is metformin an anti-aging drug? Between promises and evidence

Vittoria Cataldo, Giuseppe Paolisso

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Avanzate, Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2202d>

ABSTRACT

Biological aging results from molecular and cellular damage over time. This process determines a progressive decrease in physical and functional capacity, an increased risk of disease and death. Therefore, the identification of the molecular mechanisms of aging has led to research for senotherapeutic strategies. Metformin is an oral hypoglycaemic drug. It is the first choice for the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM). However, clinical and preclinical evidence has shown the beneficial effects of metformin also in cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, and aging. This editorial explores the recent evidence on metformin as an anti-aging drug.

KEYWORDS

Metformin, anti-aging, senescence, inflammaging, senolytic, senomorphic.

L'INVECCHIAMENTO BIOLOGICO E LA SFIDA DELLA MEDICINA ANTI-AGING

L'invecchiamento biologico, secondo la definizione della World Health Organization, rappresenta il risultato del progressivo accumulo nel tempo, di danni molecolari e cellulari nell'organismo. Ciò determina una graduale riduzione delle capacità organiche e funzionali dell'individuo con crescente rischio di sviluppare morbidità e mortalità. L'età cronologica rappresenta infatti, il principale fattore predittivo per la maggior parte delle patologie età correlate, quali ad esempio malattie neurodegenerative,

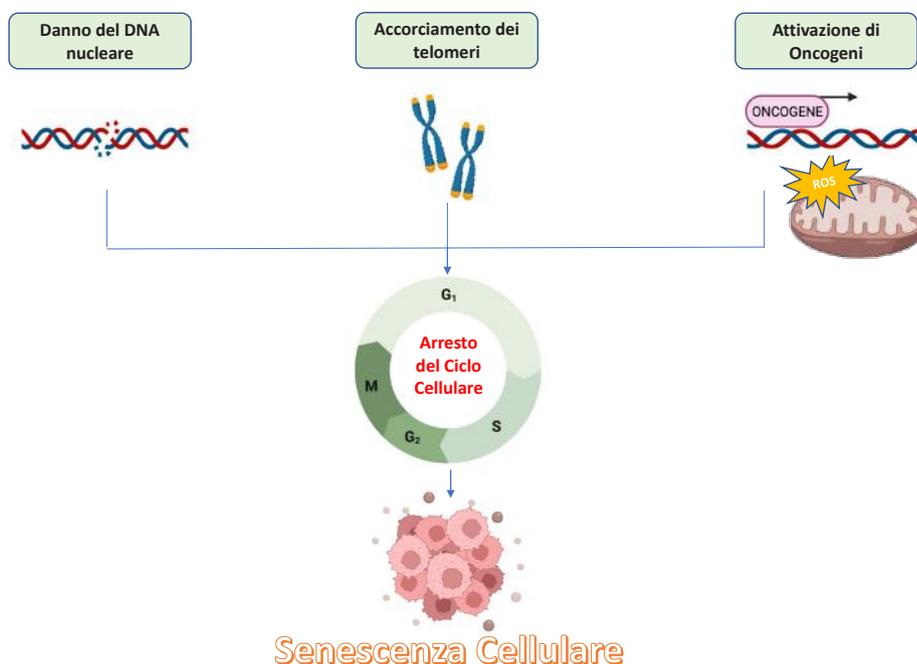
cardiovascolari e tumorali, che ad oggi assorbono l'80% della spesa sanitaria nazionale (1). Negli ultimi anni, infatti, l'invecchiamento e le patologie ad esso associate rappresentano un florido filone di ricerca con l'obiettivo di identificare i meccanismi molecolari alla base dell'invecchiamento cellulare e potenziali target terapeutici che possano realizzare le tre grandi sfide della medicina anti-aging: l'allungamento della durata della vita, dello stato di salute ed il ringiovanimento (2).

MECCANISMI MOLECOLARI DELL'INVECCHIAMENTO CELLULARE

L'invecchiamento cellulare è uno stato stazionario di arresto della crescita e proliferazione, nonostante la presenza di stimoli mitogeni e di condizioni di crescita ottimali. I meccanismi molecolari che determinano la scelta tra apoptosi e senescenza non sono del tutto noti, tuttavia, ad oggi, sono descritti in letteratura diversi fattori che possono indurre senescenza cellulare (Fig. 1), di seguito descritti:

1) *Il danno del DNA nucleare* è spesso il trigger più comune di senescenza cellulare. Tale danno attiva una cascata di segnali, definita come risposta al danno del DNA, DDR (dall'inglese *DNA Damage Response*), che determina l'attivazione di p53, che a sua volta provoca l'arresto del ciclo cellulare. L'attivazione prolungata del DDR innesca la senescenza cellulare.

Figura 1 ♦ I principali meccanismi in grado di determinare senescenza cellulare sono: 1) Il danno del DNA nucleare 2) L'accorciamento dei telomeri 3) L'attivazione di Oncogeni. Tali fattori convergono nell'arresto del ciclo cellulare che innesca la senescenza cellulare



2) *L'accorciamento dei telomeri* rappresenta un ulteriore meccanismo di senescenza cellulare. Ogni volta che le cellule si dividono, il DNA si duplica e i telomeri, le porzioni terminali del DNA si accorciano, con conseguente perdita, ad ogni divisione cellulare, di un numero variabile di nucleotidi. Quando i telomeri sono troppo corti per proteggere il DNA, le cellule smettono di dividersi, andando incontro a senescenza replicativa.

3) *L'attivazione oncogenica* rappresenta un potente induttore della senescenza cellulare. Essa innesca una fase iperproliferativa iniziale che è intrinsecamente associata al danno del DNA da replicazione, in parte attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Le cellule senescenti, pertanto, oltre alla risposta prolungata al danno del DNA (DDR), subiscono variazioni dell'organizzazione della cromatina e dell'espressione genica, con secrezione di citochine proinfiammatorie, chemochine, fattori di crescita e proteasi, che determinano il cosiddetto fenotipo secretorio senescente (SASP). Il SASP contribuisce all'instaurarsi di uno stato di infiammazione cronica, il cosiddetto "inflammaging", alla disfunzione delle cellule staminali e progenitrici

e alla diffusione della senescenza alle cellule non senescenti (2-5).

I FARMACI ANTI-AGING

Le strategie "senoterapeutiche" possono essere ampiamente classificate in due categorie: agenti farmacologici detti "senolitici", che eliminano direttamente le cellule senescenti, e agenti "senomorfici" che prevengono gli effetti dannosi estrinseci delle cellule senescenti (3). Dalla combinazione di modelli di senescenza in vitro e su animali in vivo, sono state sviluppate diverse strategie di senolisi. Le cellule senescenti hanno una maggiore resistenza all'apoptosi a causa di un *up-regulation* dei pathways di sopravvivenza cellulare, come la famiglia delle proteine anti-apoptotiche BCL-2 (6). Di recente, è stato scoperto che il glicoside cardiaco ouabaina, è dotato, almeno in parte di attività senolitica, attraverso l'induzione una proteina proapoptotica appartenente alla famiglia BCL-2 (Tab. 1). I farmaci senomorfi, invece, non eliminano direttamente le cellule senescenti ma sono in grado di modificare il fenotipo secretorio associato alla senescenza e pertanto la loro capacità mantenere un arresto stabile del

Tabella 1 ◆ **Agenti senolitici**

Principali agenti con attività senolitica, il loro utilizzo nella pratica clinica ed il meccanismo molecolare determinante l'azione senolitica. BCL protein, B-cell lymphoma-2 family proteins; PI3K, Phosphatidylinositol 3-Kinase; AKT, Protein kinase B or Akt; mTOR, mammalian target of rapamycin; HDAC, histone deacetylase.

AGENTE FARMACOLOGICO	USO CLINICO APPROVATO	POSSIBILE MECCANISMO D'AZIONE COME AGENTE SENOLITICO
Desatinib	Terapia antitumorale	Inibizione recettori tirosin-chinasi
Oubaina e Digossina	Glicosidi cardioattivi	Inibizione proteine pro-apoptotiche (BCL proteins)
Quercetina	Integratore ad azione antiossidante	Inibizione PI3K
Fisetina	Integratore ad azione antiossidante	Inibizione PI3K/AKT/mTOR
Azitromicina	Terapia antibiotica	Induce cambiamenti del metabolismo e dei meccanismi di autofagia
Roxitromicina	Terapia antibiotica	Induce cambiamenti del metabolismo e dei meccanismi di autofagia
Panobinostat	Terapia antitumorale	Inibisce HDAC

ciclo cellulare (Tab. 2). A questa categoria appartengono farmaci di comune utilizzo nella pratica clinica quali ad esempio la rapamicina che esplica l'effetto senomorfo inibendo mTOR, l'etanercept inibendo il TNF α o la metformina inibendo il fattore NF- κ B (7). Nel complesso, tali farmaci, indipendentemente dal loro target molecolare, agiscono riducendo l'attività proinfiammatoria cellulare, responsabile dell'inflammaging (4).

LA METFORMINA COME FARMACO ANTI-AGING

La metformina è un farmaco ipoglicemizzante orale, insulino-sensibilizzante, appartenente alla classe dei biguanidi. È ormai il farmaco di prima scelta nel trattamento del Diabete Mellito di Tipo 2 (DMT₂), oltre che per l'efficacia anche per il profilo di sicurezza e per il basso costo. Negli ultimi anni, evidenze cliniche e precliniche, hanno dimostrato gli effetti benefici della metformina non solo sul controllo glicemico ma anche nell'ambito delle malattie cardiovascolari, delle malattie neurodegenerative, delle malattie autoimmuni e, più recentemente, dell'invecchiamento (4). I meccanismi molecolari con cui la metformina regola i pathway coinvolti nell'invecchiamento non sono del tutto noti; tuttavia, un modello proposto, è il seguente (Fig. 2). La metformina, a livello cellulare esplica effetti metabolici, anti-ossidativi ed antinfiammatori. Essa agisce a livello extracellulare, determinando una ridotta attivazione del recettore in-

ulinico, del recettore del fattore di crescita IGF-1 e dei recettori citochinici. Il suo ingresso nelle cellule è mediato da un trasportatore cationico OCT₁. All'interno della cellula uno dei principali effetti della metformina è l'inibizione della catena mitocondriale con conseguente ridotta produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed un aumento del rapporto AMP/ATP che causa attivazione diretta dell'AMPK, sensore energetico della cellula. L'attivazione di AMPK determina riduzione dei prodotti avanzati di glicazione, degli stimoli pro-apoptotici ed inibizione di mTOR₁.

mTOR₁ è una serin-treonin chinasi in grado di regolare metabolismo e crescita cellulare oltre ad essere fortemente implicata nel processo di invecchiamento. La sua inibizione attiva i segnali di autofagia evitando l'accumulo di proteine danneggiate. Gli effetti antinfiammatori invece sono indipendenti dall'attivazione di AMPK e sono determinati dalla downregulation delle citochine proinfiammatorie come NF- κ B (4).

METFORMINA ANTI-AGING: STUDI IN VITRO ED IN VIVO

Con l'avvento della medicina anti-aging sono stati condotti i primi studi volti a valutare il potenziale effetto della metformina sull'invecchiamento. Studi condotti su *C. Elegans* hanno dimostrato che la metformina determina un allungamento della vita media in maniera dose-dipendente dal 18 al 36%. Successivamente, studi

Tabella 2 ◆ **Agenti senomorfici**

Principali agenti con attività senomorfica, il loro utilizzo nella pratica clinica ed il meccanismo molecolare determinante l'azione senomorfica. NF- κ B nuclear factor- κ B kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; HSP90, heat shock protein 90; IL-1R, interleukin-1 receptor; TNF, tumour necrosis factor.

AGENTE FARMACOLOGICO	USO CLINICO APPROVATO	POSSIBILE MECCANISMO D'AZIONE COME AGENTE SENOMORFICO
Metformina	Diabete Mellito di Tipo 2	Inibizione NF- κ B
Rapamicina	Farmaco immunosoppressore	Inibizione mTOR
Loperamide	Trattamento della diarrea	Blocco HSP90
Simvastatina	Trattamento dell'ipercolesterolemia	Inibizione IL-1 e IL-6
Anakinra	Trattamento dell'artrite reumatoide	Blocco IL-R
Etanercept	Trattamento delle malattie autoimmuni	Inibizione TNF
Infliximab	Trattamento delle malattie autoimmuni	Inibizione TNF

condotti su modelli animali hanno dimostrato che topi trattati per 9 mesi con metformina hanno presentato un allungamento della durata della vita del 14% circa. Pertanto, partendo da queste evidenze sono stati condotti diversi trial volti a valutare l'effetto anti-aging della metformina nell'uomo (2).

Lo studio MILES (*Metformin in Longevity Study*) è uno studio crossover, condotto in doppio cieco, su 14 soggetti di età maggiore ai 70 anni con una ridotta tolleranza agli idrati di carbonio, che valuta i cambiamenti trascrittomici (nel muscolo e nel tessuto adiposo) indotti dall'utilizzo di metformina per 6 settimane. L'analisi genomica condotta ha evidenziato che la metformina non solo esercita effetti metabolici a livello di tali tessuti, ma è in grado di influenzare anche l'espressione genica di geni rispettivamente coinvolti, nella riparazione del DNA nel muscolo e geni mitocondriali del tessuto adiposo, i quali influenzano il processo di invecchiamento. Inoltre, è interessante notare che i mediatori dell'infiammazione rappresentano comuni regolatori a monte dei geni differenzialmente espressi nei due tessuti (4, 8).

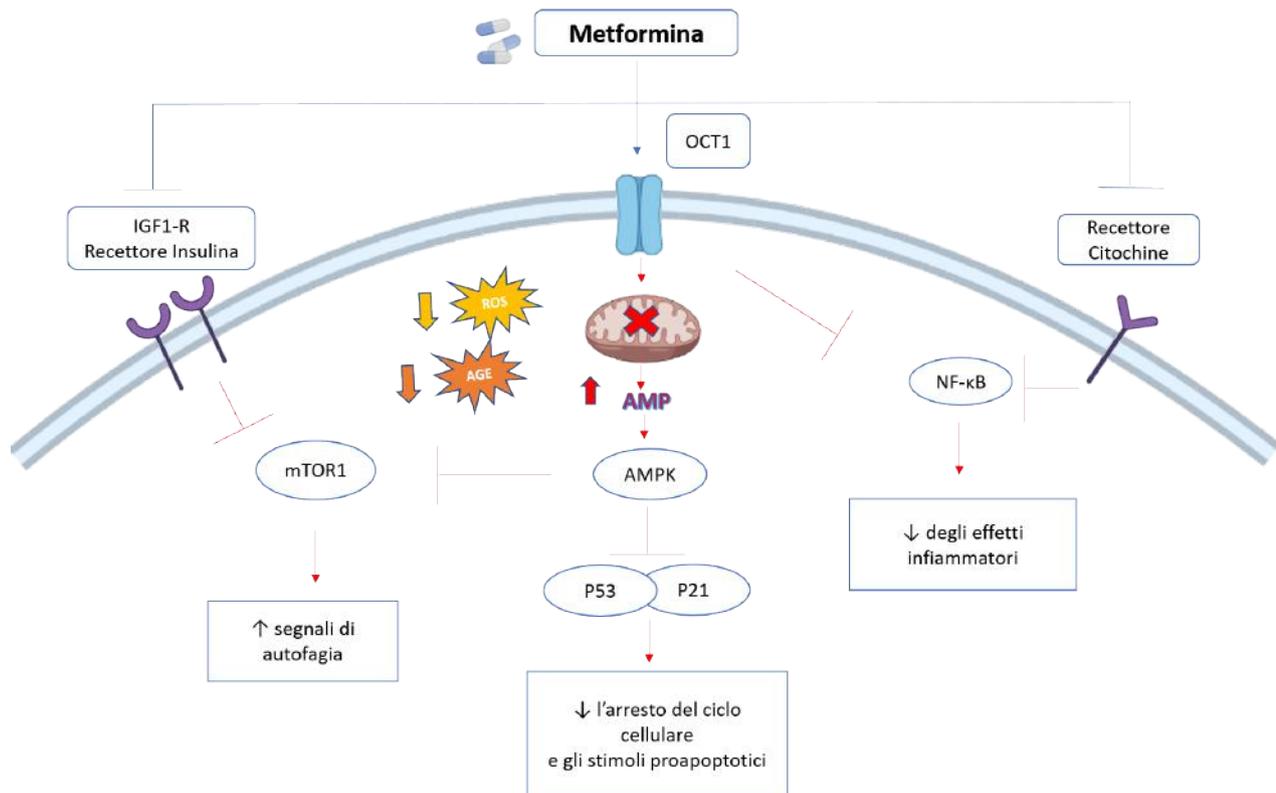
Sono stati inoltre valutati gli effetti della metformina sulle patologie età-correlate mediante trial prospettici quali: GLINT e TAME. Lo studio GLINT (*Glucose Lowering In Non-diabetic hyperglycaemia Trial*) è uno studio randomizzato, multicentrico, in doppio cieco, che ha valutato gli

effetti della metformina a lento rilascio rispetto al placebo nei pazienti anziani obesi con iperglicemia non diabetica e con alto rischio cardiovascolare su un endpoint composito di infarto del miocardio, ictus e morte per malattie cardiovascolari, in circa 5 anni di follow-up. Gli endpoint secondari, invece, si proponevano di andare a valutare l'impatto della metformina sullo stato funzionale dei soggetti arruolati, sull'incidenza del diabete, patologie oncologiche (non melanoma), morte per tumore, morte per qualsiasi causa e su una valutazione costo-efficacia del trattamento. Sono stati quindi arruolati 249 pazienti con età ≥ 40 anni, livelli di HbA_{1c} ≥ 36.6 mmol/mol ma < 47.5 mmol/mol ($\geq 5.5\%$ ma $< 6.5\%$) e rischio cardiovascolare a 10 anni stimato ≥ 20 mediante Framingham Risk Score o QRISK₂ scores. La metformina è stata associata ad un lieve miglioramento dei valori di HbA_{1c}, della velocità di filtrato glomerulare e dei valori medi di colesterolo LDL. Nessun risultato statisticamente significativo è stato riscontrato per gli endpoints prefissati. Tuttavia, sono emerse una serie di raccomandazioni per studi futuri volte a:

- modificare i criteri di inclusione per poter arruolare persone con e senza malattie cardiovascolari preesistenti al fine di aumentare il numero di soggetti reclutabili ed il tasso degli eventi;

Figura 2 ♦ Effetti anti-aging della metformina

Effetti metabolici, anti-ossidativi ed antinfiammatori a livello cellulare. mTOR1, mammalian target of rapamycin 1; AMPK, AMP-activated protein Kinase; NF-κB fnuclear factor-κB kinase.



- utilizzare grandi banche dati per migliorare l'identificazione dei partecipanti;
- eseguire il follow-up da remoto per ridurre i costi e migliorare l'efficienza.

Inoltre, sulla base dei dati emersi da questo studio, è possibile ottenere una riduzione degli eventi cardiovascolari del 2%, arruolando almeno 20.000 soggetti (9). Infine, il trial *Targeting Aging with Metformin* (TAME), ancora in corso, ha coinvolto 14 centri ed arruolato 3000 pazienti con una età compresa tra i 65-79 anni ed ha come obiettivo quello di valutare se la metformina determini un ritardo nello sviluppo o nella progressione di malattie croniche legate all'età e se abbia un impatto sulle capacità funzionali dell'individuo. Inoltre, questo trial migliorerà anche la conoscenza dei biomarcatori dell'invecchiamento attraverso uno studio simultaneo: TAME BIO (10).

CONCLUSIONI

Sebbene un gran numero di studi, condotti su linee cellulari o su modelli animali, abbia evidenziato l'efficacia

della metformina riguardo l'invecchiamento e le patologie età correlate, gli studi condotti sull'uomo non hanno riportato risultati statisticamente significativi. Pertanto, trial futuri potranno meglio chiarire i target intracellulari della metformina e il suo potenziale ruolo come farmaco anti-aging.

BIBLIOGRAFIA

1. Ageing and Health Unit [website]. Geneva: World Health Organization; 2021 (<https://www.who.int/teams/maternal-newborn-child-adolescent-health-and-ageing/ageing-and-health/integrated-care-for-older-people-icope>, ultima consultazione 10 agosto 2021).
2. Hartmut H. Glossmann, Oliver M.D. Lutz. Metformin and Aging: A Review. *Gerontology* 65: 581-590, 2019.
3. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22(2): 75-95, 2021.
4. Kulkarni AS, Gubbi S, Barzilai N. Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging. *Cell Metab* 2020 Jul 7; 32(1): 15-30. Epub 2020 Apr 24.

5. Osorio FG, Bárcena C, Soria-Valles C, et al. Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF- κ B activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes Dev* 26(20): 2311-24, 2012.
6. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* 6; 7: 11190, 2016.
7. Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell* 12(3): 489-98, 2013.
8. Kulkarni AS, Brutsaert EF, Anghel V, Zhang K et al. Metformin regulates metabolic and nonmetabolic pathways in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissues of older adults. *Aging Cell* 2018.
9. Griffin SJ, Bethel MA, Holman RR, et al. Metformin in non-diabetic hyperglycaemia: the GLINT feasibility RCT. *Health Technol Assess* 22(18): 1-64, 2018.
10. Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, et al. Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metab* 14; 23(6): 1060-65, 2016.

a cura di Simona Frontoni

Ospedale Fatebenefratelli Isola Tiberina, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università di Roma Tor Vergata

La disfunzione sessuale negli uomini e nelle donne con diabete: una riflessione sulle complicazioni? *Sexual dysfunction in men and women with diabetes: a reflection of their complications?*

Fiorenza Pesce, Alexi Di Cristofaro, Andrea Sansone,
Danielle Mollaioli e Emmanuele A. Jannini

*Cattedra di Endocrinologia e Sessuologia Medica (ENDOSEX), Dipartimento di Medicina dei Sistemi,
Università di Roma Tor Vergata*

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2202e>

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is associated with a plethora of micro- and macro-vascular complications which should be carefully investigated and treated in order to improve quality of life and reduce the risk of premature mortality. Female and male sexual dysfunction often occurs in diabetes; while cardiovascular complications are clearly involved, psychosexological factors, endocrine complications, and endothelial dysfunction all contribute to the pathogenesis of sexual dysfunctions. Sexual dysfunctions can also act as early biomarkers of cardiovascular disease.

KEYWORDS

Diabetes, erectile dysfunction, premature ejaculation, female sexual dysfunction, hypogonadism, PDE5 inhibitors.

INTRODUZIONE

Il Diabete Mellito (DM) è una delle principali cause di decesso a livello mondiale, come riportato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (1); nel 2016, 1.6 milioni di morti avevano come causa diretta il diabete, con il 5% di aumento nella mortalità prematura.

I pazienti diabetici di norma vanno incontro a diverse complicanze micro e macrovascolari, tra cui la nefropatia, la retinopatia e la coronaropatia (1). Queste condizioni portano a delle drammatiche ripercussioni sulla qualità della vita del paziente e potrebbero contribuire significativamente alla sua morte prematura. La disfunzione ventricolare sinistra secondaria a cardiomiopatia diabetica è la complicazione più comune e la più frequente causa di morte nei pazienti diabetici (2).

Il diabete è sensibilmente associato alla disfunzione sessuale, i pazienti diabetici di ambo i generi riportano una salute sessuale fortemente compromessa. Nell'uomo, le complicazioni vascolari, il coinvolgimento neurologico e l'umore depresso potrebbero tutti contribuire al peggioramento della disfunzione erettile (3-4). Nella donna, la funzionalità sessuale è similmente interessata, anche se è ancora poco studiato quanto la sua insorgenza sia influenzata dalle diverse complicazioni (5).

Considerata l'alta prevalenza del diabete, con 451 milioni di pazienti nel 2017, che si stima diventino 693 milioni entro il 2045 (6) e l'aumento dell'aspettativa di vita media globale, diventerà necessario per tutti i clinici affrontare le disfunzioni sessuali nei pazienti diabetici. Tuttavia, la presenza di complicazioni cardiovascolari non può essere trascurata quando si considera la relazione tra diabete e le disfunzioni sessuali. Infatti, il diabete e le disfunzioni sessuali sono strettamente intrecciate, avendo una stretta associazione con fattori psicosessuologici, complicazioni endocrine e disfunzioni endoteliali. Tale associazione non può essere trascurata né dall'esperto di medicina sessuale né dal diabetologo; d'altra parte, la sessuologia potrebbe essere una "leva" sulla quale i clinici potrebbero aumentare la motivazione dei pazienti a migliorare i loro stili di vita. Abbiamo eseguito una revisione approfondita della letteratura disponibile sul tema dell'associazione tra salute sessuale e DM su PubMed e Scholar al fine di riportare come le diverse caratteristiche di quest'ultimo (come la disfunzione endoteliale, la depressione e la terapia farmacologica) possano influenzare la salute sessuale, e come la valutazione della salute sessuale possa essere utile anche per la gestione clinica del paziente diabetico. È stata utilizzata la seguente stringa di ricerca: *diabetes AND ("erectile dysfunction" OR "sexual dysfunction" OR "premature ejaculation" OR "hypoactive sexual desire")*.

IL DIABETE COME FATTORE DI RISCHIO PER LA MANIFESTAZIONE O IL PEGGIORAMENTO DELLA DISFUNZIONE SESSUALE

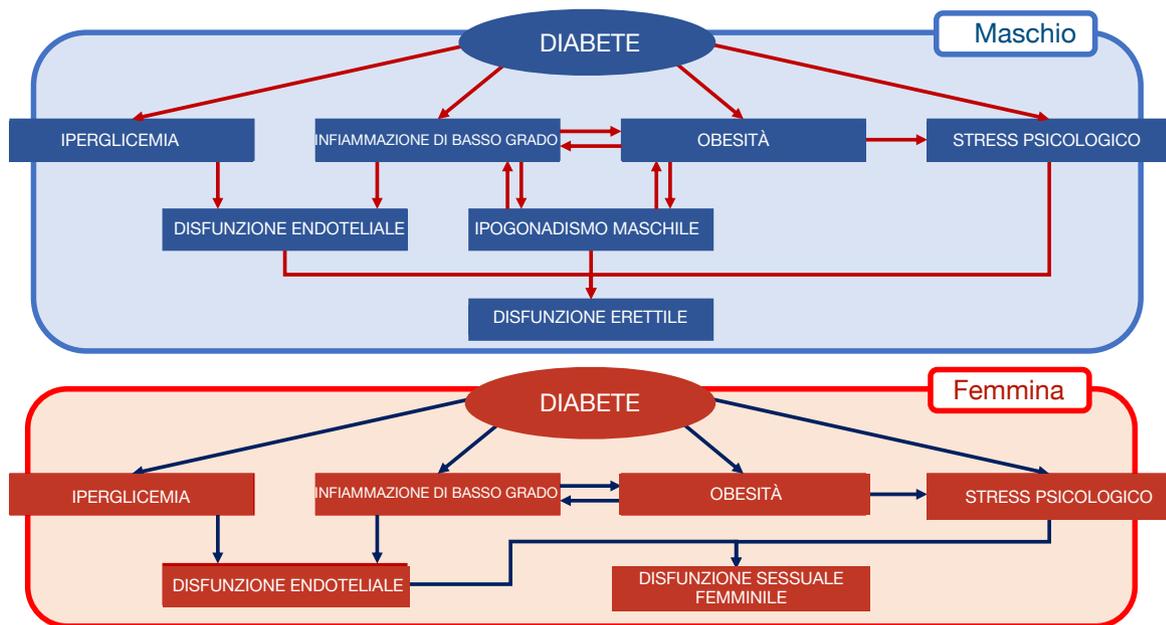
Disfunzione Sessuale Maschile

Diverse possibili cause sono state proposte per correlare la disfunzione sessuale e il diabete (Fig. 1). L'ipotesi della "diminuzione delle arterie" per la Disfunzione Erettile (DE) si basa sull'alterazione dell'emodinamica peniena a seguito di un danno vascolare aterosclerotico; dato il piccolo calibro delle arterie peniene, il flusso sanguigno in questi vasi può subire una drastica riduzione una volta che le placche aterosclerotiche si sono formate (7). Questa ipotesi, benché consolidata, si concentra principalmente sulla DE vasculogenica (8), e quindi non si riesce ad adattare adeguatamente all'intero spettro delle complicazioni diabetiche.

Il diabete è strettamente correlato, tramite l'obesità, con l'ipogonadismo e viceversa. L'associazione tra obesità e diabete è abbastanza nota, spesso descritta con il termine comprensivo di "diabesità" fin dalla prima volta che questa parola fu usata nei primi anni Settanta (9). Inoltre, sono stati identificati diversi meccanismi molecolari che collegano l'obesità all'insulino-resistenza e al diabete di tipo 2 (DMT2) (10). L'obesità porta allo sviluppo dell'ipogonadismo ipogonadotropo funzionale, una condizione in parte risolta dalla perdita di peso (11-12) che può comportare una funzione sessuale compromessa (13-14). Gli interventi sulla dieta e sullo stile di vita sono il pilastro del trattamento, tuttavia la questione se la terapia sostitutiva con testosterone possa essere utile per migliorare lo stato metabolico e la funzione sessuale è stata più volte sollevata e le prove a riguardo sono contrastanti, come indicato nelle più recenti linee guida sull'indagine sul trattamento e il monitoraggio dell'ipogonadismo funzionale (15).

In breve, le prove attuali sembrano suggerire che il testosterone abbia molto meno effetto sull'adipe di quanto l'obesità non abbia sui livelli sierici di testosterone (16). La breve durata degli studi che indagano gli effetti del trattamento con testosterone sullo stato metabolico potrebbe tuttavia essere la causa di tali risultati incoerenti. In effetti, in un rapporto molto recente in un *real world setting*, che ha coinvolto 356 uomini ipogonadici con DMT2 seguiti per 11 anni, i soggetti sottoposti a terapia sostitutiva con testosterone hanno migliorato significativamente il controllo glicemico e lo stato metabolico rispetto al gruppo di controllo non trattati, con un minor numero di eventi cardiovascolari maggiori e decessi (17). Rispetto al controllo alla fine del follow-up, i soggetti trattati richiedevano un minor numero di dosi di

Figura 1 ◆



insulina, mostravano miglioramenti nel loro profilo lipidico e avevano una qualità di vita complessivamente migliore (secondo l'*International Index of Erectile Function and Aging Males' Symptoms scale*) (17).

Disfunzione Sessuale Femminile

La Disfunzione Sessuale Femminile (DSF) è generalmente poco studiata, e lo stesso è vero anche per la DSF legata al diabete (18), nonostante il diabete sia il fattore di rischio metabolico più studiato in assoluto. Negli ultimi decenni sono state identificate diverse cause endocrine di DSF, una scoperta molto rilevante considerata l'alta prevalenza di condizioni ipofisarie, tiroidee, surrenali e gonadiche (19). Riguardo al diabete, studi di meta-analisi hanno riportato che la DSF è comune sia nel diabete mellito di tipo 1 (DMT1) sia nei pazienti affetti da DMT2, con una prevalenza crescente negli ultimi 15 anni e una significativa associazione con la depressione (5, 20). Da un punto di vista fisiopatologico, la DSF legata al diabete sembra essere principalmente dovuta a fattori psicologici piuttosto che organici, diversamente da quanto avviene negli uomini (Fig. 1). Sebbene tutti i domini della funzione sessuale femminile siano compromessi nelle pazienti diabetiche, il desiderio sembra essere il più interessato (21). L'eccitazione può essere ridotta come conseguenza di un abbassamento del flusso ematico nei tessuti genitali (22-23), analogamente alla compromissione dell'erezione dovuta a un ridotto flusso sanguigno nel pene; in un recente studio condotto su giovani donne, la perfusione dei tessuti clitoridei misurata attraverso la tensione di ossigeno transmucosale è stata associata con una compromissione dell'eccitazione, della lubrificazione, dell'orgasmo e della soddisfazione (24). Inoltre, solide prove supportano l'idea che l'obesità sia uno dei più, se non il più, potente determinante della DSF (25). Mentre l'obesità è certamente importante per l'insorgenza di disfunzioni sessuali anche negli uomini, nelle donne questa associazione è molto più forte (26-27), fornendo un sostegno sostanziale agli effetti negativi della "diabesità" sulla funzione sessuale femminile.

SINTOMI SESSUALI COME INDICI PREDITTIVI PRECOCI DI COMPLICANZE

Disfunzione Sessuale Maschile

È generalmente accettato come la DE, condividendo molti fattori di rischio con le malattie cardiovascolari (3) ed essendo di per sé una manifestazione evidente di disfunzione endoteliale (28), sia un predittore di eventi cardiovascolari importanti (29). A questo proposito, la DE si trova al confine tra la medicina dei sistemi e la medicina sessuale (30).

La prevalenza della DE aumenta costantemente con l'invecchiamento (31), questa condizione è dovuta per la maggior parte a comorbilità, tra cui fattori endocrini (14), come l'ipogonadismo maschile (32), e fattori ambientali come il fumo di sigaretta (33). Diverse condizioni che possono portare allo sviluppo della DE restano clinicamente silenti per molto tempo, come dimostra l'infiammazione cronica di basso grado (34), che è stata identificata come un fattore di rischio per lo sviluppo della disfunzione endoteliale. Il diabete presenta uno stato di infiammazione di basso grado, avendo una relazione bidirezionale con l'obesità; l'obesità scatena l'infiammazione che a sua volta potrebbe causare resistenza all'insulina, generando così un circolo vizioso. Lo stato infiammatorio è associato ad una diminuzione del testosterone sierico (35), che a sua volta peggiora lo stato infiammatorio stesso riducendo i livelli di citochine pro-infiammatorie, come TNF- α , IL-6 e IL-1 β (36-37), generando così un altro circolo vizioso.

A tal proposito, è quindi chiaro che le condizioni metaboliche hanno un effetto negativo ben definito sulla funzione sessuale. È generalmente accettato che la durata della patologia, l'età, la presenza di complicazioni e il livello di sovrappeso/obesità siano legate al rischio di sviluppare una disfunzione sessuale (38). I sintomi sessuali, tuttavia, non sempre sono una manifestazione tardiva di un deterioramento metabolico preesistente, anzi, al contrario, la DE potrebbe essere il primo sintomo con cui il diabete si presenta negli uomini (39-40), nonché uno dei primi segni di una malattia cardiovascolare (41). La già citata ipotesi delle dimensioni delle arterie (7) diventa di fondamentale importanza nel contesto della cardiologia preventiva, dato che le arterie coronarie hanno quasi il doppio del diametro di quelle peniene, e una riduzione nel flusso nelle arterie peniene avverrebbe quindi molto prima del presentarsi del danno alle coronarie. Inoltre, anche nei pazienti che sono asintomatici per le malattie cardiovascolari, il diabete è associato a una maggiore attivazione ossidativa dei monociti (42), e il trattamento con gli inibitori della PDE5 ha risultati potenzialmente benefici sulla conseguente disfunzione endoteliale (43). Poiché il DMT2 è spesso asintomatico (44), l'utilità dello screening è oggetto di discussione (45); tuttavia, indagare la presenza e la gravità delle disfunzioni sessuali può identificare i pazienti a rischio, sebbene l'indagine dovrebbe essere eseguita preferibilmente attraverso l'uso di questionari validati e *inventories* (46), anche fare una semplice domanda (come "hai difficoltà a raggiungere e mantenere l'erezione?") potrebbe essere utile per far emergere il disagio del paziente.

Disfunzione Sessuale Femminile

Un'associazione significativa tra salute cardiovascolare e DSF emerge da un'ampia letteratura e dai meccanismi patogenetici descritti nella sezione precedente (5); tuttavia, come affermato da Maseroli et al. le donne sono meno interessate da questa correlazione rispetto agli uomini (47). D'altra parte, diversi altri fattori di rischio cardiovascolare intervengono nella transizione verso la menopausa e le malattie cardiovascolari sono meno indagate nelle donne che negli uomini, portando a esiti più gravi (48). Mentre nessuna relazione diretta può essere dedotta dalla letteratura attuale, è generalmente accettato, anche sulla base di quanto detto sopra, che l'esordio della DSF nelle pazienti diabetiche meriterebbe ulteriori ricerche.

EIACULAZIONE PRECOCE COME INDICATORE TRASCURATO DI ALTRE DISFUNZIONI SESSUALI NEGLI UOMINI DIABETICI

Le disfunzioni sessuali maschili, come la DE e l'Eiaculazione Precoce (EP), sembrano essere fortemente correlate ed interconnesse in un circolo vizioso. Infatti, i pazienti con DE che tentano di aumentare il livello di eccitazione, al fine di avere e/o mantenere un'erezione adeguata, potrebbero sviluppare EP; al contrario, i pazienti con EP cercano di ridurre il loro livello di eccitazione, aumentando la probabilità di incorrere in un'ulteriore disfunzione erettile (49-50). Ne consegue che l'EP possa "nascondere" i sintomi della DE; risulta quindi di fondamentale importanza nel contesto dei pazienti con DM nei quali, come affermato, la DE potrebbe essere il sintomo di presentazione (39-40) o indicatore di complicanze CV (41). Tuttavia, mentre l'epidemiologia e l'eziologia della disfunzione erettile sono ben documentate nella popolazione con DM, la relazione tra EP e DM è scarsamente studiata. In una serie consecutiva di 676 pazienti di sesso maschile con DMT2, El-Sakka riporta in media una prevalenza di circa il 40% di EP (51). Una prevalenza molto

ridotta (28%) è stata invece riportata dallo studio SUBITO-DE, uno studio italiano condotto su 1503 uomini diagnosticati con DMT2 (52). Le ragioni di questa discrepanza non sono del tutto note. È possibile che la durata relativamente bassa della malattia (<24 mesi) nello studio SUBITO-DE possa spiegare in parte queste discrepanze. Nessuna differenza in termini di prevalenza di EP è stata riportata da Bellastella et al. (53) confrontando soggetti con DMT1 con un gruppo di controllo (24 vs 23,5%). Al contrario, una maggiore prevalenza di EP, strettamente associata alla presenza di DE, è stata riportata in pazienti con DMT2 rispetto al gruppo di controllo (53). Nonostante le controverse evidenze in letteratura, la presenza di DE nei pazienti diabetici può peggiorare lo stato di ansia da prestazione promuovendo sintomi dell'EP attraverso un meccanismo adattativo (50). Allo stesso modo, l'EP può essere associata ad una ridotta qualità della vita e ad una maggiore prevalenza di sintomi di ansia e depressione che esiterebbero in DE.

PESO PSICOLOGICO DEL DIABETE NEL FUNZIONAMENTO SESSUALE

Disfunzioni Sessuali Maschili

Interazioni tra DE e sintomi depressivi sono ben documentate in letteratura (54-57). È dimostrato come la DE sia presente ed associata a condizioni di salute precaria (58) in pazienti diabetici in associazione ad una ridotta qualità delle funzioni psichiche (con alti livelli di sintomi depressivi) (59-60), sessuali (minore soddisfazione sessuale) e metaboliche (61). Inoltre, due pazienti su tre hanno riferito come la funzione sessuale non sia stata in alcun modo studiata nel processo diagnostico e terapeutico (59).

D'altra parte, una maggiore quantità di complicanze legate al diabete aumenta il rischio di una qualità della vita (QoL) più scadente, portando all'insorgenza di problemi relativi al desiderio, all'eccitazione e all'orgasmo (62).

Disfunzioni Sessuali Femminili

I fattori psico-sociali sono i principali contributori alla DSF sia nel diabete di tipo 1 sia di tipo 2 (63-65). Data la complessità della sessualità femminile e la sua forte dipendenza dal benessere mentale, un ruolo di primo piano per lo sviluppo dei disturbi sessuali nella popolazione diabetica femminile sarebbe rappresentato dalla depressione (5, 60). In particolare, la gravità dei sintomi depressivi sembrerebbe modulare non solo la funzione sessuale ma anche la frequenza dell'attività sessuale (66). Inoltre, i sintomi della depressione sono fortemente correlati alla durata del DMT2 e alla minore accettazione della malattia, contribuendo ad un peggioramento della funzione sessuale (67).

Per di più, le complicanze croniche del diabete potrebbero incidere ulteriormente sulla qualità della vita, generale e relazionale, in aggiunta ad una minore soddisfazione dell'immagine corporea, andando a generare un circolo vizioso in grado di influenzare negativamente le prestazioni sessuali. In ultimo, La DSF può anche essere espressione di effetti collaterali legati al trattamento con farmaci antidepressivi (venlafaxina e altri inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina, piuttosto che bupropione o nefazodone) (5, 64).

FUNZIONE SESSUALE, DIABETE ED EFFETTI DELLA TERAPIA FARMACOLOGICA

Disfunzioni Sessuali Maschili

La terapia sostitutiva con testosterone (TRT) è il trattamento più comune per l'ipogonadismo maschile, basato sulla somministrazione di testosterone esogeno al fine di ripristinare adeguate concentrazioni sieriche (68). L'efficacia e la sicurezza della TRT sono state forte oggetto di dibattito nell'ultimo decennio, a seguito della pubblicazione di alcuni rapporti che evidenziavano un aumento del rischio CV nei pazienti trattati (68). Sebbene diversi studi abbiano cercato di fornire una risposta definitiva a questa domanda, ad oggi, i dati al riguardo sono ancora controversi (69). Le linee guida sconsigliano di prescrivere la TRT a pazienti con una storia recente di eventi CV maggiori o a uomini con policitemia documentata (15); tuttavia, le stesse linee guida esprimono l'efficacia della TRT per migliorare i sintomi sessuali e suggeriscono di utilizzarla "per la gestione dei sintomi ipogonadici tradizionali senza la promessa (o l'aspettativa) di miglioramenti dello stato metabolico" (15).

Gli inibitori della fosfodiesterasi-5 (PDE5i) sono la scelta più comune tra i trattamenti farmacologici per il miglioramento della funzione erettile. I farmaci PDE5i bloccano la degradazione del GMP ciclico (cGMP), il secondo messaggero necessario per indurre il rilassamento delle cellule muscolari lisce; a sua volta, il cGMP è prodotto dall'enzima guanilato ciclasi in seguito all'attivazione da parte dell'ossido nitrico (NO) (70). Pertanto, i PDE5i spengono il meccanismo attraverso il quale l'erezione termina in condizioni fisiologiche. Tuttavia, tali farmaci hanno mostrato proprietà aggiuntive; infatti, il sildenafil riduce le resistenze vascolari nella circolazione polmonare (71) e potrebbe prevenire la trombosi agendo sull'aggregazione piastrinica (72). Inoltre, i PDE5i potrebbero agire sul profilo delle chemochine; evidenze in vivo e in vitro suggeriscono come la somministrazione di sildenafil potrebbe diminuire i livelli di interleuchina (IL)-8 (73), una delle chemochine coinvolte nello sviluppo della cardiomiopatia diabetica. In effetti, il trattamento con PDE5i sembra essere collegato ad una riduzione complessiva della mortalità per tutte le cause (74).

Diversi farmaci sono comunemente utilizzati nel trattamento del diabete. Come trattamento di prima linea la metformina è un farmaco antidiabetico ampiamente utilizzato con effetti antinfiammatori (75) e antiobesità (76). Diversi studi su modelli di roditori e umani hanno identificato i potenziali effetti benefici della metformina sull'endotelio e, quindi, sulla funzione erettile (77-79). Tuttavia, sono emersi nuovi farmaci come trattamento di seconda linea, inclusi gli inibitori della dipeptidil-peptidasi IV (DPP4i), gli inibitori del cotrasportatore sodio-glucosio di tipo 2 (SGLT2i) e gli agonisti del recettore del peptide-1 glucagone-simile (GLP1RA). Le evidenze sugli effetti di questi farmaci sulla funzione sessuale sono limitate e molto eterogenee; tuttavia, alcuni effetti positivi sulla funzione endoteliale, che potrebbero risultare in una migliore funzione erettile, sono stati descritti in modelli animali per DPP4i (80) e SGLT2i (81). Alcuni risultati più solidi sono stati riportati riguardo l'efficacia clinica del GLP1RA nell'uomo (79, 82-83), dimostrando effetti benefici sui livelli sierici di testosterone e sui sintomi sessuali, forse in parte mediati dalla perdita di peso.

Disfunzioni Sessuali Femminili

Per quanto strano possa sembrare, gli effetti dei diversi trattamenti antidiabetici sulle DSF non sono mai stati adeguatamente studiati. Tuttavia, sulla base dei meccanismi patogenetici sopra descritti, c'è ragione di ipotizzare che il trattamento del diabete si traduca in un miglioramento della salute sessuale anche per le donne. Inoltre, sono stati segnalati alcuni effetti benefici della perdita di peso per le donne diabetiche (84); un farmaco antidiabetico noto per favorire la perdita di peso, come il GLP1RA (85), potrebbe quindi fornire ulteriori benefici.

CONCLUSIONI

Il diabete mellito è un fattore di rischio accertato per la disfunzione sessuale. Il diabete genera disfunzioni sessuali maschili (e in larga misura femminili) per i seguenti motivi: vascolari (macro e microvasculopatia), neurologici (neuropatia), endocrini (ipogonadismo), immunologici/infettivi (balanopostite, vaginite), sistemici (nefropatia), intrapsichici (depressione, ansia), relazionali (affrontare i cambiamenti della vita quotidiana), e iatrogeni (farmaci prescritti per diabete, depressione, ansia, gastropatia ecc.). Per questo motivo si può "usare" la salute sessuale come eccellente biomarcatore delle complicanze diabetiche e dell'evoluzione della malattia. Nonostante ciò, la propensione dei diabetologi ad affrontare la salute sessuale dei propri pazienti è ancora molto bassa. Pertanto, è necessario indagare sistematicamente, soprattutto nel campo della sessualità femminile, come migliorare le prestazioni e la funzione sessuale nel diabete aumentando la compliance alle terapie antidiabetiche, puntando anche a dimostrare che scotomizzare la sessualità significa perdere un'ulteriore possibilità di rafforzare la gestione stessa del diabete.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization Global Report on Diabetes. World Health Organization 2016.
2. Filardi T, Ghinassi B, Di Baldassarre A, et al. Cardiomyopathy As-associated with Diabetes: The Central Role of the Cardiomyocyte. *Int J Mol Sci* 20(13): E3299, 2019. doi: 10.3390/ijms20133299.
3. Shamloul R, Ghanem H. Erectile dysfunction. *Lancet* 381(9861): 153-65, 2013. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60520-0.

4. Kouidrat Y, Pizzol D, Cosco T, et al. High prevalence of erectile dysfunction in diabetes: a systematic review and meta-analysis of 145 studies. *Diabet Med* 34(9): 1185-92, 2017. doi: 10.1111/dme.13403.
5. Pontiroli AE, Cortelazzi D, Morabito A. Female sexual dysfunction and diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Sex Med* 10(4): 1044-51, 2013. doi: 10.1111/jsm.12065.
6. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 138: 271-81, 2018. doi: 10.1016/j.diabres.2018.02.023.
7. Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, et al. The artery size hypothesis: a macrovascular link between erectile dysfunction and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 96(12B): 19M-23M, 2005. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.07.006.
8. Meller SM, Stilp E, Walker CN, Mena-Hurtado C. The link between vasculogenic erectile dysfunction, coronary artery disease, and peripheral artery disease: role of metabolic factors and endovascular therapy. *J Invasive Cardiol* 25(6): 313-9, 2013.
9. Sims EA, Danforth E Jr, Horton ES, Bray GA, Glennon JA, Salans LB. Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. *Recent Prog Horm Res* 29: 457-96, 1973.
10. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444(7121): 840-6, 2006. doi: 10.1038/nature05482.
11. Corona G, Rastrelli G, Monami M, et al. Body weight loss reverts obesity-associated hypogonadotropic hypogonadism: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 168(6): 829-43, 2013. doi: 10.1530/EJE-12-0955.
12. Allen MS, Walter EE. Health-Related Lifestyle Factors and Sexual Dysfunction: A Meta-Analysis of Population-Based Research. *J Sex Med* 15(4): 458-75, 2018. doi: 10.1016/j.jsxm.2018.02.008.
13. Corona G, Isidori AM, Aversa A, Burnett AL, Maggi M. Endocrinologic Control of Men's Sexual Desire and Arousal/Erection. *J Sex Med* 13(3): 317-37, 2016. doi: 10.1016/j.jsxm.2016.01.007.
14. Sansone A, Romanelli F, Gianfrilli D, Lenzi A. Endocrine evaluation of erectile dysfunction. *Endocrine* 46(3): 423-30, 2014. doi: 10.1007/s12020-014-0254-6.
15. Corona G, Goulis DG, Huhtaniemi I, et al. European Academy of Andrology (EAA) guidelines on investigation, treatment and monitoring of functional hypogonadism in males: Endorsing organization: European Society of Endocrinology. *Andrology* 8(5): 970-87, 2020. doi: 10.1111/andr.12770.
16. Grossmann M. Hypogonadism and male obesity: Focus on unresolved questions. *Clin Endocrinol (Oxf)* 89(1): 11-21, 2018. doi: 10.1111/cen.13723.
17. Haider KS, Haider A, Saad F, et al. Remission of type 2 diabetes following long-term treatment with injectable testosterone undecanoate in patients with hypogonadism and type 2 diabetes: 11-year data from a real-world registry study. *Diabetes Obes Metab* 22(11): 2055-68, 2020. doi: 10.1111/dom.14122.
18. Miner M, Esposito K, Guay A, Montorsi P, Goldstein I. Cardiometabolic risk and female sexual health: the Princeton III summary. *J Sex Med* 9(3): 641-51, 2012. doi: 10.1111/j.1743-6109.2012.02649.x.
19. Carosa E, Sansone A, Jannini EA. Management of endocrine disease: Female sexual dysfunction for the endocrinologist. *Eur J Endocrinol* 182(6): R101, 2020. doi: 10.1530/EJE-19-0903.
20. Rahmanian E, Salari N, Mohammadi M, Jalali R. Evaluation of sexual dysfunction and female sexual dysfunction indicators in women with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr* 11: 73, 2019. doi: 10.1186/s13098-019-0469-z.
21. Giraldi A, Kristensen E. Sexual dysfunction in women with diabetes mellitus. *J Sex Res* 47(2): 199-211, 2010. doi: 10.1080/00224491003632834.
22. Traish AM, Botchevar E, Kim NN. Biochemical factors modulating female genital sexual arousal physiology. *J Sex Med* 7(9): 2925-46, 2010. doi: 10.1111/j.1743-6109.2010.01903.x.
23. Maseroli E, Fanni E, Cipriani S, et al. Cardiometabolic Risk and Female Sexuality: Focus on Clitoral Vascular Resistance. *J Sex Med* 13(11): 1651-61, 2016. doi: 10.1016/j.jsxm.2016.09.009.

24. Coppola A, Gallotti P, Choussos D, Pujia A, Montalcini T, Gazzaruso C. Association between clitoral tissue perfusion and female sexual dysfunction in healthy women of reproductive age: a pilot study. *Int J Impot Res* 32(2): 221-5, 2020. doi: 10.1038/s41443-019-0155-6.
25. Mollaioli D, Ciocca G, Limoncin E, et al. Lifestyles and sexuality in men and women: the gender perspective in sexual medicine. *Reprod Biol Endocrinol* 18(1): 10, 2020. doi: 10.1186/s12958-019-0557-9.
26. Kolotkin RL, Crosby RD, Gress RE, Hunt SC, Engel SG, Adams TD. Health and health-related quality of life: differences between men and women who seek gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis* 4(5): 651-8, 2008. doi: 10.1016/j.soard.2008.04.012.
27. Kolotkin RL, Binks M, Crosby RD, Østbye T, Gress RE, Adams TD. Obesity and sexual quality of life. *Obesity (Silver Spring)* 14(3): 472-9, 2006. doi: 10.1038/oby.2006.62.
28. Guay AT. ED2: erectile dysfunction = endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am* 36(2): 453-63, 2007. doi: 10.1016/j.ecl.2007.03.007.
29. Corona G, Forti G, Maggi M. Why can patients with erectile dysfunction be considered lucky? The association with testosterone deficiency and metabolic syndrome. *Aging Male* 11(4): 193-9, 2008. doi: 10.1080/1368553080246849.
30. Jannini EASM. SM = SM: The Interface of Systems Medicine and Sexual Medicine for Facing Non-Communicable Diseases in a Gender-Dependent Manner. *Sex Med Rev* 5(3): 349-64, 2017. doi: 10.1016/j.sxmr.2017.04.002.
31. Romanelli F, Sansone A, Lenzi A. Erectile dysfunction in aging male. *Acta Biomed* 8(Suppl 1): 89-94, 2010.
32. Isidori AM, Buvat J, Corona G, et al. A critical analysis of the role of testosterone in erectile function: from pathophysiology to treatment-a systematic review. *Eur Urol* 65(1): 99-112, 2014. doi: 10.1016/j.eururo.2013.08.048.
33. Corona G, Sansone A, Pallotti F, et al. People smoke for nicotine, but lose sexual and reproductive health for tar: a narrative review on the effect of cigarette smoking on male sexuality and reproduction. *J Endocrinol Invest* 43(10): 1391-408, 2020. doi: 10.1007/s40618-020-01257-x.
34. Esposito K, Giugliano D. The metabolic syndrome and inflammation: association or causation? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 14(5): 228-32, 2004. doi: 10.1016/S0939-4753(04)80048-6.
35. Maiorino MI, Bellastella G, Giugliano D, Esposito K. From inflammation to sexual dysfunctions: a journey through diabetes, obesity, and metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest* 41(11): 1249-58, 2018. doi: 10.1007/s40618-018-0872-6.
36. Mohamad N-V, Wong SK, Wan Hasan WN, et al. The relationship between circulating testosterone and inflammatory cytokines in men. *Aging Male* 22(2): 129-40, 2019. doi: 10.1080/13685538.2018.1482487.
37. Sansone A, Mollaioli D, Ciocca G, Limoncin E, Colonnello E, Vena W, et al. Addressing male sexual and reproductive health in the wake of COVID-19 outbreak. *J Endocrinol Invest* 2020. doi: 10.1007/s40618-020-01350-1.
38. Fedele D, Coscelli C, Santeusano F, et al. Erectile dysfunction in diabetic subjects in Italy. Gruppo Italiano Studio Deficit Erettile nei Diabetici. *Diabetes Care* 21(11): 1973-7, 1998. doi: 10.2337/diacare.21.11.1973.
39. Boeri L, Capogrosso P, Pederzoli F, et al. Unrecognized Prediabetes Is Highly Prevalent in Men With Erectile Dysfunction-Results From a Cross-Sectional Study. *J Sex Med* 15(8): 1117-24, 2018. doi: 10.1016/j.jsxm.2018.06.009.
40. Lue TF, Brant WO, Shindel A, Bella AJ. *Sexual Dysfunction in Diabetes*. Endotext South Dartmouth (MA): MDTextcom, Inc. Feingold, KR 2017.
41. Same RV, Miner MM, Blaha MJ, Feldman DI, Billups KL. Erectile Dysfunction: an Early Sign of Cardiovascular Disease (Internet). Vol. 9. *Curr Cardiovasc Risk Rep* 2015. doi: 10.1007/s12170-015-0477-y.
42. Morano S, Gatti A, Mandosi E, et al. Circulating monocyte oxidative activity is increased in patients with type 2 diabetes and erectile dysfunction. *J Urol* 177(2): 655-9, 2007. doi: 10.1016/j.juro.2006.09.046.
43. Morano S, Mandosi E, Fallarino M, et al. Antioxidant treatment associated with sildenafil reduces monocyte activation and markers of endothelial damage in patients with diabetic erectile dysfunction: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur Urol* 52(6): 1768-74, 2007. doi: 10.1016/j.eururo.2007.04.042.
44. Adeva-Andany MM, Funcasta-Calderón R, Fernández-Fernández C, Ameneiros-Rodríguez E, Domínguez-Montero A. Subclinical vascular disease in patients with diabetes is associated with insulin resistance. *Diabetes Metab Syndr* 13(3): 2198-206, 2019. doi: 10.1016/j.dsx.2019.05.025.

45. Raggi P. Screening for Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Controversies and Guidelines. *Can J Diabetes* 44(1): 86-92, 2020. doi: 10.1016/j.jcjd.2019.08.009.
46. Corona G, Jannini EA, Maggi M. Inventories for male and female sexual dysfunctions. *Int J Impot Res* 18(3): 236-50, 2006. doi: 10.1038/sj.ijir.3901410.
47. Maseroli E, Scavello I, Vignozzi L. Cardiometabolic Risk and Female Sexuality-Part I. Risk Factors and Potential Pathophysiological Underpinnings for Female Vasculogenic Sexual Dysfunction Syndromes. *Sex Med Rev* 6(4): 508-24, 2018. doi: 10.1016/j.sxmr.2018.02.009.
48. Maseroli E, Scavello I, Vignozzi L. Cardiometabolic Risk and Female Sexuality-Part II. Understanding (and Overcoming) Gender Differences: The Key Role of an Adequate Methodological Approach. *Sex Med Rev* 6(4): 525-34, 2018. doi: 10.1016/j.sxmr.2018.03.004.
49. Sansone A, Aversa A, Corona G, et al. Management of premature ejaculation: a clinical guideline from the Italian Society of Andrology and Sexual Medicine (SIAMS). *J Endocrinol Invest* 2020. doi: 10.1007/s40618-020-01458-4.
50. Jannini EA, Lombardo F, Lenzi A. Correlation between ejaculatory and erectile dysfunction. *Int J Androl* 28(Suppl 2): 40-5, 2005. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00593.x.
51. El-Sakka AI. Premature ejaculation in non-insulin-dependent diabetic patients. *Int J Androl* 26(6): 329-34, 2003. doi: 10.1111/j.1365-2605.2003.00433.x.
52. Corona G, Giorda CB, Cucinotta D, Guida P, Nada E. SUBI-TO-DE study group. The SUBITO-DE study: sexual dysfunction in newly diagnosed type 2 diabetes male patients. *J Endocrinol Invest* 36(10): 864-8, 2013.
53. Bellastella G, Maiorino MI, Olita L, Della Volpe E, Giugliano D, Esposito K. Premature ejaculation is associated with glycemic control in Type 1 diabetes. *J Sex Med* 12(1): 93-9, 2015. doi: 10.1111/jsm.12755.
54. Corona G, Giorda CB, Cucinotta D, Guida P, Nada E. Gruppo di studio SUBITO-DE. Sexual dysfunction at the onset of type 2 diabetes: the interplay of depression, hormonal and cardiovascular factors. *J Sex Med* 11(8): 2065-73, 2014. doi: 10.1111/jsm.12601.
55. Maiorino MI, Bellastella G, Della Volpe E, et al. Erectile dysfunction in young men with type 1 diabetes. *Int J Impot Res* 29(1): 17-22, 2017. doi: 10.1038/ijir.2016.38.
56. Goldstein I, Chambers R, Tang W, Stecher V, Hassan T. Realworld observational results from a database of 48 million men in the United States: Relationship of cardiovascular disease, diabetes mellitus and depression with age and erectile dysfunction. *Int J Clin Pract* 72(4): e13078, 2018. doi: 10.1111/ijcp.13078.
57. Albasheer OB, Mahfouz MS, Solan Y, et al. Depression and related risk factors among patients with type 2 diabetes mellitus, Jazan area, KSA: A cross-sectional study. *Diabetes Metab Syndr* 12(2): 117-21, 2018. doi: 10.1016/j.dsx.2017.09.014
58. Avasthi A, Grover S, Bhansali A, et al. Erectile dysfunction in diabetes mellitus contributes to poor quality of life. *Int Rev Psychiatry* 23(1): 93-9, 2011. doi: 10.3109/09540261.2010.545987.
59. De Berardis G, Franciosi M, Belfiglio M, et al. Quality of Care and Outcomes in Type 2 Diabetes (QuED) Study Group. Erectile dysfunction and quality of life in type 2 diabetic patients: a serious problem too often overlooked. *Diabetes Care* 25(2): 284-91, 2002. doi: 10.2337/diacare.25.2.284.
60. Ciocca G, Carosa E, Stornelli M, et al. Post-traumatic stress disorder, coping strategies and type 2 diabetes: psychometric assessment after L'Aquila earthquake. *Acta Diabetol* 52(3): 513-21, 2015. doi: 10.1007/s00592-014-0686-8.
61. Franciosi M, Pellegrini F, De Berardis G, et al. QuED Study Group. The impact of blood glucose self-monitoring on metabolic control and quality of life in type 2 diabetic patients: an urgent need for better educational strategies. *Diabetes Care* 24(11): 1870-7, 2001. doi: 10.2337/diacare.24.11.1870.
62. Enzlin P, Mathieu C, Van Den Bruel A, Vanderschueren D, Demyttenaere K. Prevalence and predictors of sexual dysfunction in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26(2): 409-14, 2003. doi: 10.2337/diacare.26.2.409.
63. Bultrini A, Carosa E, Colpi EM, et al. Possible correlation between type 1 diabetes mellitus and female sexual dysfunction: case report and literature review. *J Sex Med* 1(3): 337-40, 2004. doi: 10.1111/j.1743-6109.04048.x.
64. Maiorino MI, Bellastella G, Castaldo F, Petrizzo M, Giugliano D, Esposito K. Sexual function in young women with type 1 diabetes: the METRO study. *J Endocrinol Invest* 40(2): 169-77, 2017. doi: 10.1007/s40618-016-0542-5.

65. Yenice MG, Danacıoğlu YO, Mert M, et al. Evaluation of factors affecting sexual dysfunction in female patients with diabetes mellitus. *Arch Endocrinol Metab* 64(3): 319-25, 2020. doi: 10.20945/2359-399700000238.
66. Nowosielski K, Skrzypulec-Plinta V. Mediators of sexual functions in women with diabetes. *J Sex Med* 8(9): 2532-45, 2011. doi: 10.1111/j.1743-6109.2011.02336.x.
67. Bąk E, Marcisz C, Krzemińska S, Dobrzym-Matusiak D, Foltyn A, Drosdzol-Cop A. Relationships of Sexual Dysfunction with Depression and Acceptance of Illness in Women and Men with Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Environ Res Public Health* 14(9): E1073, 2017. doi: 10.3390/ijerph14091073.
68. Sansone A, Sansone M, Lenzi A, Romanelli F. Testosterone Replacement Therapy: The Emperor's New Clothes. *Rejuvenation Res* 20(1): 9-14, 2017. doi: 10.1089/rej.2016.1818.
69. Corona G, Rastrelli G, Reisman Y, Sforza A, Maggi M. The safety of available treatments of male hypogonadism in organic and functional hypogonadism. *Expert Opin Drug Saf* 17(3): 277-92, 2018. doi: 10.1080/14740338.2018.1424831.
70. Dolci S, Belmonte A, Santone R, et al. Subcellular localization and regulation of type-1C and type-5 phosphodiesterases. *Biochem Biophys Res Commun* 341(3): 837-46, 2006. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.035.
71. Prasad S, Wilkinson J, Gatzoulis MA. Sildenafil in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 343(18): 1342, 2000. doi: 10.1056/NEJM200011023431814.
72. Yang H-M, Jin S, Jang H, et al. Sildenafil Reduces Neointimal Hyperplasia after Angioplasty and Inhibits Platelet Aggregation via Activation of cGMP-dependent Protein Kinase. *Sci Rep* 9(1): 7769, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-44190-7.
73. Giannattasio S, Corinaldesi C, Colletti M, et al. The phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil decreases the proinflammatory chemokine IL-8 in diabetic cardiomyopathy: in vivo and in vitro evidence. *J Endocrinol Invest* 42(6): 715-25, 2019. doi: 10.1007/s40618-018-0977-y.
74. Anderson SG, Hutchings DC, Woodward M, et al. Phosphodiesterase type-5 inhibitor use in type 2 diabetes is associated with a reduction in all-cause mortality. *Heart* 102(21): 1750-6, 2016. doi: 10.1136/heartjnl-2015-309223.
75. Saisho Y. Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 15(3): 196-205, 2015. doi: 10.2174/1871530315666150316124019.
76. Pastor-Villaescusa B, Cañete MD, Caballero-Villarraso J, et al. Metformin for Obesity in Prepubertal and Pubertal Children: A Randomized Controlled Trial. *Pediatrics* 140(1): e20164285, 2017. doi: 10.1542/peds.2016-4285.
77. Jing Y, Wu F, Li D, Yang L, Li Q, Li R. Metformin improves obesity-associated inflammation by altering macrophages polarization. *Mol Cell Endocrinol* 461: 256-64, 2018. doi: 10.1016/j.mce.2017.09.025.
78. Goldberg RB, Aroda VR, Bluemke DA, et al. Diabetes Prevention Program Research Group. Effect of Long-Term Metformin and Lifestyle in the Diabetes Prevention Program and Its Outcome Study on Coronary Artery Calcium. *Circulation* 136(1): 52-64, 2017. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025483.
79. Giagulli VA, Carbone MD, Ramunni MI, et al. Adding liraglutide to lifestyle changes, metformin and testosterone therapy boosts erectile function in diabetic obese men with overt hypogonadism. *Andrology* 3(6): 1094-103, 2015. doi: 10.1111/andr.12099.
80. Matsubara J, Sugiyama S, Sugamura K, et al. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Am Coll Cardiol* 59(3): 265-76, 2012. doi: 10.1016/j.jacc.2011.07.053.
81. Assaly R, Gorny D, Compagnie S, et al. The Favorable Effect of Empagliflozin on Erectile Function in an Experimental Model of Type 2 Diabetes. *J Sex Med* 15(9): 1224-34, 2018. doi: 10.1016/j.jsxm.2018.07.002.
82. Corona G, Fagioli G, Mannucci E, et al. Penile doppler ultrasound in patients with erectile dysfunction (ED): role of peak systolic velocity measured in the flaccid state in predicting arteriogenic ED and silent coronary artery disease. *J Sex Med* 5(11): 2623-34, 2008. doi: 10.1111/j.1743-6109.2008.00982.x.
83. Shao N, Yu X-Y, Yu Y-M, et al. Short-term combined treatment with exenatide and metformin is superior to glimepiride combined metformin in improvement of serum testosterone levels in type 2 diabetic patients with obesity. *Andrologia* 50(7): e13039, 2018. doi: 10.1111/and.13039.

84. Wing RR, Bond DS, Gendrano IN III, et al. Sexual Dysfunction Subgroup of the Look AHEAD Research Group. Effect of intensive lifestyle intervention on sexual dysfunction in women with type 2 diabetes: results from an ancillary Look AHEAD study. *Diabetes Care* 36(10): 2937-44, 2013. doi: 10.2337/dc13-0315.
85. Shah M, Vella A. Effects of GLP-1 on appetite and weight. *Rev Endocr Metab Disord* 15(3): 181-7, 2014. doi: 10.1007/s11154-014-9289-5.

a cura di Marta Letizia Hribal

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università Magna Graecia di Catanzaro

ARTICOLI SELEZIONATI E COMMENTATI

Il Diabete n. 2/2022DOI: <https://doi.org/10.30682//ildia2202f>**Adipose-Derived Stem Cells from Type 2 Diabetic Rats Retain Positive Effects in a Rat Model of Erectile Dysfunction** ♦ *Il trapianto di cellule staminali nel trattamento della disfunzione erettile*

Quaade ML et al. Int J Mol Science 23(3): 1692, 2022

La disfunzione erettile rappresenta, come discusso anche nell'Editoriale presente in questo numero, una complicanza molto comune nei pazienti affetti da diabete di tipo 2 che non sempre viene identificata in modo tempestivo e adeguatamente trattata. In questo studio, Quaade e collaboratori hanno valutato la possibilità di utilizzare cellule mesenchimali di origine adipocitaria per il trattamento di questa complicanza in un modello di ratti diabetici. È importante sottolineare che, benché non siano certamente ancora di uso comune nella pratica clinica quotidiana, le cellule staminali sono state utilizzate con successo in alcuni trials di Fase 1 nell'uomo; i risultati di questo studio potrebbero quindi trovare applicazione pratica nel medio termine. Uno dei problemi da risolvere nell'applicazione degli approcci terapeutici basati sulla terapia cellulare è infatti rappresentato anche dalla necessità di chiarire se la presenza di diabete abbia un effetto negativo sulle cellule staminali, riducendone il potenziale proliferativo. In questo studio, gli autori hanno isolato e coltivato in vitro cellule adipose mesenchimali staminali (ASC) derivate da ratti diabetici Goto-Kakizaki (ASC-GK) e da ratti di controllo non diabetici (ASC-WT) e non hanno osservato differenze significative né in termini di morfologia cellulare né in termini di corredo proteico, analizzato tramite spettrometria di massa quantitativa. Sia le cellule derivate da animali diabetici sia quelle derivate da animali di controllo sono state successivamente iniettate in ratti nei quali era stata effettuata una resezione del nervo penieno per indurre una condizione di disfunzione erettile. In tutti gli animali analizzati, indipendentemente dall'origine delle cellule staminali infuse, si osservava un significativo miglioramento della funzione erettile dopo 28 giorni dal trattamento. Sia l'infusione delle ASC-GK che quella delle ASC-WT era associata ad un incremento dell'espressione dell'isoforma endoteliale della sintasi dell'ossido nitrico eNOS e ad una speculare riduzione dei livelli dell'isoforma neuronale nNOS. Sia le ASC-GK che le ASC-WT inducevano inoltre un aumento dei livelli del marker endoteliale Cd31, anche se l'incremento era significativamente maggiore con le ASC-WT.

Figura 1 ♦ Rappresentazione schematica del disegno sperimentale

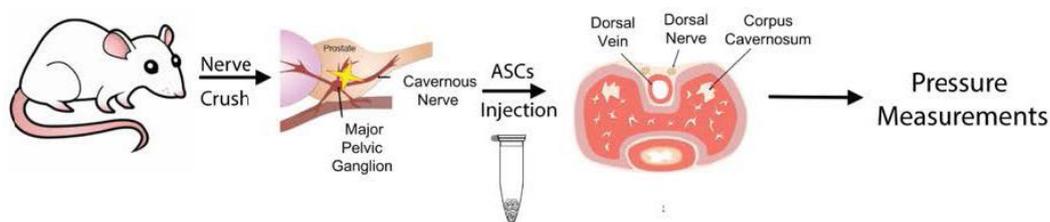
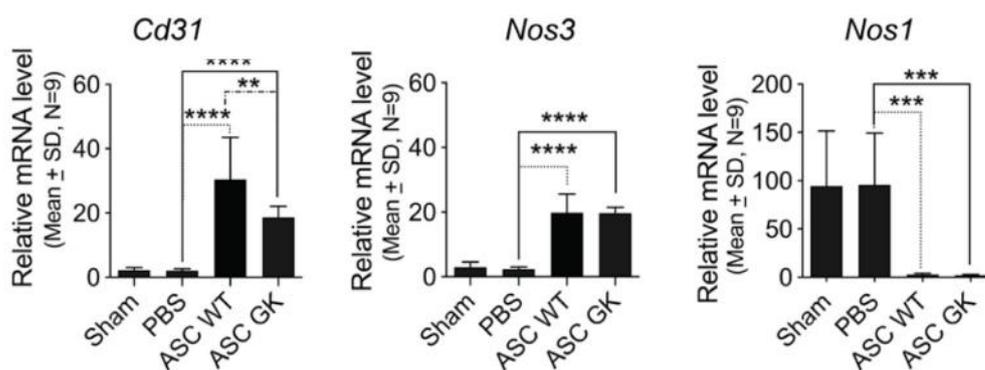


Figura 2 ♦ Livelli di espressione del marker endoteliale Cd31, delle isoforme endoteliale (eNOS/Nos3) e neuronale (nNOS/Nos1) della sintasi dell'ossido nitrico in animali di controllo (non iniettati=SHAM o iniettati con soluzione salina=PBS) ed in animali infusi con ASC-WT e ASC-GK



Complessivamente, questi risultati dimostrano che il trapianto di ASC rappresenta una terapia efficace per la disfunzione erettile; in futuro, quindi sarebbe possibile ipotizzare un trapianto autologo di ASC in pazienti diabetici per il trattamento di questa ed altre complicanze.

Con la selezione di questo numero annunciamo il debutto su Twitter della Rubrica Journal Club della SID ed invitiamo tutti i lettori a seguirla quotidianamente e a diffondere i contributi tra i loro contatti, se li ritengono interessanti. (SID Italia (@Sid_Italia) / Twitter).
A seguire i commenti che, per ciascuna categoria, hanno avuto il maggior numero di "Retwitt" e "Mi piace".

Altri aspetti patogenetici del diabete tipo 2

Quanto incidono i fattori di rischio sull'osso nel diabete tipo 1? - A cura di Giuseppe Defeudis

Schwartz AV, Backlund JYC, de Boer IH, et. al. Risk factors for lower bone mineral density in older adults with type 1 diabetes: a cross-sectional study. *Lancet Diabetes Endocrinol*, DOI: 10.1016/S2213-8587(22)00103-6

Link al commento del Journal Club Risk factors for lower bone mineral density in older adults with type 1 diabetes: a cross-sectional study (siditalia.it)

Twitter: SID Italia on Twitter: "Journal Club SID Quanto incidono i fattori di rischio sull'osso nel diabete tipo 1? - A cura di Giuseppe Defeudis <https://t.co/4kQxxvFVHW>" / Twitter

Automonitoraggio glicemico e microinfusori

Monitoraggio in continuo del glucosio nel paziente anziano: perché no? - A cura di Federico Boscarì e Sergio Di Molfetta

Miller KM, Kanapka LG, Rickels MR, et. al. Benefit of Continuous Glucose Monitoring in Reducing Hypoglycemia Is Sustained Through 12 Months of Use Among Older Adults with Type 1 Diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2022 Jun; 24(6):424-434

Link al commento del Journal Club: Benefit of Continuous Glucose Monitoring in Reducing Hypoglycemia Is Sustained Through 12 Months of Use Among Older Adults with Type 1 Diabetes (siditalia.it)

Twitter: SID Italia su Twitter: "Journal Club SID Monitoraggio in continuo del glucosio nel paziente anziano: perché no? - A cura di Federico Boscarì e Sergio Di Molfetta <https://t.co/fDjEJqs4ja>" / Twitter

Epidemiologia del diabete e suoi fattori di rischio

La remissione dei peccati... di gola - A cura di Roberto Miccoli e Max Petrelli

Holman N, Wild SH, Khunti K, Knighton P, O'Keefe J, Bakhai C, Young B, Sattar N, Valabhji J, Gregg EW. Incidence and Characteristics of Remission of Type 2 Diabetes in England: A Cohort Study Using the National Diabetes Audit. *Diabetes Care*. DOI: doi.org/10.2337/dc21-2136

Link al commento del Journal Club: Incidence and Characteristics of Remission of Type 2 Diabetes in England: A Cohort Study Using the National Diabetes Audit (siditalia.it)

Twitter: SID Italia on Twitter: "Journal Club SID La remissione dei peccati... di gola - A cura di Roberto Miccoli e Max Petrelli <https://t.co/mcWiBurO4G>" / Twitter

Nefropatia

Microbiota intestinale e danno renale nel diabete - A cura di Federica Barutta e Stefania Bellini

Linh H, Iwata Y, Senda Y, et. al. Intestinal Bacterial Translocation Contributes to Diabetic Kidney Disease. *JASN*-2021-06-0843.R1

Link al commento del Journal Club: Intestinal Bacterial Translocation Contributes to Diabetic Kidney Disease (siditalia.it)

Twitter: SID Italia on Twitter: "Journal Club SID Microbiota intestinale e danno renale nel diabete - A cura di Federica Barutta e Stefania Bellini <https://t.co/NlXgiaCIol>" / Twitter

Neuropatia

Il canagliflozin non modifica il rischio di neuropatia nel diabete di tipo 2 con nefropatia diabetica - A cura di Vincenza Spallone

Liao J, Kang A, Xia C, Young T, et. al. The impact of canagliflozin on the risk of neuropathy events: A post-hoc exploratory analysis of the CREDENCE trial. *Diabetes Metab.* 2022 Feb 13;48(4):101331. doi: 10.1016/j.diabet.2022.101331
Link al commento del Journal Club: The impact of canagliflozin on the risk of neuropathy events: A post-hoc exploratory analysis of the CREDENCE trial (siditalia.it)

Twitter: SID Italia su Twitter: "Journal Club SID Il canagliflozin non modifica il rischio di neuropatia nel diabete di tipo 2 con nefropatia diabetica - A cura di Vincenza Spallone <https://t.co/Di4JpADMFF> <https://t.co/k12eZAJ4h4>" / Twitter

Terapia del diabete dieta e farmaci

L'epidemiologia del diabete tipo 2 si sposta verso gli adolescenti? Le terapie dovranno fare lo stesso! - A cura di Mario Luca Morieri e Ilaria Dicembrini

Arslanian SA, Hannon T, Zeitler P, Chao LC, Boucher-Berry C, Barrientos-Pérez M, Bismuth E, Dib S, Cho JI, Cox D; AWARD-PEDS Investigators. Once-Weekly Dulaglutide for the Treatment of Youths with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2022 Jun 4. doi: 10.1056/NEJMoa2204601

Link al commento del Journal Club: Once-Weekly Dulaglutide for the Treatment of Youths with Type 2 Diabetes (siditalia.it)

Twitter: SID Italia su Twitter: "Journal Club SID L'epidemiologia del diabete tipo 2 si sposta verso gli adolescenti? Le terapie dovranno fare lo stesso! - A cura di Mario Luca Morieri e Ilaria Dicembrini <https://t.co/GAVgbNpqaE>" / Twitter

a cura di Giuseppe Defeudis

Policlinico Universitario Campus Bio-Medico di Roma

Fallimento β -cellulare nel diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2: esistono meccanismi comuni? *B-cell jamming in type 1 and type 2 diabetes: are there common mechanisms?*

Nicola Marrano, Giuseppina Biondi, Francesco Giorgino, Annalisa Natalicchio

Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organi, Università degli Studi di Bari Aldo Moro

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2202g>

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) and type 2 diabetes (T2D) are two distinct diseases, with different etiology and pathogenesis, but with a common outcome (hyperglycemia), caused by almost complete loss of or reduced β -cell functional mass, respectively. Although the causes that lead to β -cell failure are different (typically immune-mediated for T1D, while related to metabolic stress for T2D), the underlying molecular pathways are somewhat similar in both forms of diabetes. In this review we try to highlight common molecular mechanisms of β -cell damage in T1D and T2D, which could suggest new promising common therapeutic targets.

KEYWORDS

Pancreatic β -cell; type 1 diabetes; type 2 diabetes; β -cell dysfunction; β -cell functional mass.

INTRODUZIONE

Il Diabete Mellito di Tipo 1 (DMT1) e di Tipo 2 (DMT2) sono da sempre considerate due patologie distinte per eziologia e per patogenesi, ma accomunate da uno stesso fattore patogenetico che ne determina l'insorgenza e l'evoluzione: la progressiva perdita di massa e funzione delle β -cellule pancreatiche, che si verifica in seguito a processi di morte cellulare e difetti secretori, esitando nell'iperglicemia, outcome clinico comune. Se nel DMT1 questa perdita è mediata dal sistema immunitario ed è quasi totale, nel DMT2 essa è dovuta principalmente a uno stress di natura metabolica, di grado variabile e associata a insulino-resistenza periferica (1) (Fig. 1).

Il DMT1 è infatti una patologia autoimmune nella quale le cellule del sistema immunitario, riconoscendo come estranei antigeni presenti sulle β -cellule pancreatiche, si infiltrano nell'isola e secernono localmente citochine pro-infiammatorie, dando luogo ad un processo infiammatorio definito insulite, che inizia e sostiene la distruzione e la disfunzione delle β -cellule (2). Questi eventi si verificano in soggetti geneticamente predisposti e sono innescati o accelerati da agenti ambientali (ad esempio infezioni virali, dieta, tossine) (2-3). Nel DMT2, invece, il danno β -cellulare può essere determinato da diversi fattori metabolici, primi tra tutti l'infiammazione cronica sistemica di basso grado, l'iperglicemia e l'iperlipidemia che conseguono alle condizioni di obesità e insulino-resistenza (4-5). L'obesità, infatti, è caratterizzata dalla saturazione della normale capacità del tessuto adiposo di immagazzinare un eccesso di trigliceridi, colesterolo e acidi grassi liberi derivati dalla dieta. Questo determina un aumento dei livelli plasmatici di lipidi e il loro accumulo ectopico in diversi tessuti, compreso il pancreas (6). A seconda della diversa suscettibilità genetica esi-

stente tra gli individui, l'eccesso di grassi può portare all'accumulo di derivati metabolici tossici per le β -cellule (ad es. ceramidi, diacilglicerolo e acil-coA), una condizione definita lipotossicità (6). L'obesità è inoltre spesso caratterizzata da uno stato infiammatorio cronico di basso grado del tessuto adiposo, che favorisce l'insulino-resistenza e la produzione di citochine pro-infiammatorie (adipochine) che possono essere rilasciate in circolo e raggiungere il pancreas. D'altro canto, l'iperglicemia derivante dalla condizione di insulino-resistenza, legata o meno all'obesità, può essere a sua volta deleteria per le β -cellule pancreatiche (glucotossicità), in quanto in grado di alterare la produzione e la secrezione di insulina e causare perdita di massa β -cellulare (7-8). Glucotossicità e lipotossicità possono agire in maniera sinergica definendo il fenomeno della gluco-lipotossicità (9).

In questo articolo cercheremo di analizzare i diversi aspetti della disfunzione β -cellulare nel DMT1 e nel DMT2, cercando di individuare meccanismi comuni di danno che potrebbero suggerire nuovi promettenti target terapeutici comuni a entrambe le forme di diabete.

LA MASSA FUNZIONALE β -CELLULARE NEL DMT1 E NEL DMT2

Sezioni di pancreas provenienti da pazienti con DMT1 e analizzate in immunoistochimica mostrano isole pancreatiche caratterizzate da un numero ridotto di β -cellule, una importante riduzione dell'area β -cellulare totale e un aumento dei livelli di apoptosi (10). Le cellule insulino-positivo sono spesso disposte singolarmente o in piccoli gruppi all'interno del tessuto e non è raro osservare lobuli pancreatici che ne sono completamente privi (10). Analisi di *imaging* del pancreas in vivo, effettuate con l'uso di un agonista del recettore GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide 1*) radiomarcato, confermano la presenza di una ridotta massa insulare in soggetti con DMT1 (11). Il tasso di perdita di massa β -cellulare nel DMT1 è variabile, con alcuni pazienti che sperimentano una perdita rapida (in particolare i neonati e i bambini), mentre in altri pazienti la perdita è relativamente lenta (principalmente negli adulti) (12-13). Sebbene esista una notevole eterogeneità, probabilmente dovuta al fatto che la perdita di β -cellule non è omogenea nel pancreas ma lobulo-dipendente, è stato stimato che la perdita di massa β -cellulare nel DMT1 non è sempre assoluta. In media, il 20% della massa è ancora presente nei pazienti di nuova diagnosi (10, 14-16), mentre esiste un ampio consenso sul fatto che l'85-95% della massa β -cellulare venga persa nel DMT1 di lunga durata (17-18), sebbene molti individui conservino un numero modesto di cellule insulino-positivo residue per molti anni (15-16). A conferma di ciò, Campbell-Thompson et al. (18) hanno riportato la presenza di cellule insulino-positivo nella totalità dei donatori con DMT1 e insulite (associata a recente insorgenza di DMT1) e nell'8% dei donatori con DMT1 senza insulite, quindi verosimilmente in uno stadio più avanzato della patologia. Parallelamente, una sistematica valutazione all'interno del *biorepository Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes* (nPOD) ha riportato che, sebbene in generale la massa β -cellulare sia ridotta di circa il 90% nelle isole di pazienti con DMT1 rispetto ai controlli, essa è ancora presente in quantità residue nel 64% di donatori con durata media del diabete di 8 anni (19).

Anche le isole pancreatiche dei pazienti con DMT2 mostrano un contenuto di insulina ridotto (20-21), sebbene esse non siano mai completamente prive di insulina, come invece si può osservare nel DMT1. Inoltre, i soggetti con DMT2 mostrano una riduzione del volume delle β -cellule pancreatiche e una maggiore frequenza di apoptosi β -cellulare rispetto ai soggetti non diabetici (22). Diversi gruppi di ricerca hanno riportato che la massa delle β -cellule è ridotta del 24-65% nei pazienti con DMT2 e che le isole di tali pazienti sono più piccole di circa il 50% rispetto ai controlli non diabetici (22-24).

Oltre alla ridotta massa, sia nel DMT1 che nel DMT2, le β -cellule pancreatiche sono caratterizzate anche da difetti di funzione, ossia ridotta capacità di produrre, immagazzinare e rilasciare insulina in concentrazioni sufficienti per garantire l'euglicemia (25). Un interessante lavoro pubblicato nella rivista *Diabetes* nel 2015 dimostra, ad esempio, che isole pancreatiche isolate da pazienti con DMT1 all'esordio sono caratterizzate da una ridotta capacità di secernere insulina in risposta al glucosio, rispetto a isole di soggetti non diabetici. È interessante sottolineare che le isole di alcuni pazienti con DMT1 possono recuperare la propria capacità secretoria se coltivate per alcuni giorni in vitro, al di fuori del *milieu* diabetico e quindi "libere" dall'infiltrazione del sistema immunitario (26).

Il calo della funzionalità β -cellulare e la conseguente secrezione anomala di insulina possono verificarsi molto prima della diagnosi di DMT1 (27-29) e possono essere già presenti in soggetti con normale tolleranza al glucosio orale (12, 30-33). Il declino della capacità secretoria β -cellulare è graduale: esso inizia almeno 2 anni prima della diagnosi, accelera in prossimità della stessa e nel primo periodo post-diagnostico e può continuare per anni dopo la diagnosi (33-36). Tuttavia, bassi livelli di insulina sono ancora rilevabili nella maggior parte dei pazienti anche dopo 30 anni di DMT1 (37). Analogamente, le isole di pazienti con DMT2 mostrano una alterata funzione secretoria, in particolare in risposta al glucosio, rispetto a isole di soggetti non diabetici (38). Tuttavia, diversamente dalle isole di soggetti con DMT1, le isole di pazienti con DMT2 sembrerebbero mantenere i difetti molecolari e funzionali anche quando rimosse dall'ambiente diabetogeno. La capacità funzionale delle β -cellule è già ridotta nei pazienti con intolleranza al glucosio (IGT) e ancor di più nei soggetti con DMT2 (39). Secondo lo studio *UK Prospective Diabetes Study* (40), la funzione delle β -cellule nei pazienti con DMT2 potrebbe essere ridotta del 50% alla diagnosi con un calo del 5% per ogni anno successivo, suggerendo che il deterioramento funzionale inizia diversi anni prima dell'insorgenza della malattia. Tuttavia, in specifici pazienti con DMT2, la progressione è inspiegabilmente più rapida, probabilmente a causa dell'eterogeneità genomica ed epigenomica tra gli individui, ad oggi non ancora ben definita.

PERDITA DELLA MASSA FUNZIONALE β -CELLULARE NEL DMT1 E NEL DMT2: QUALI SONO I FENOMENI BIOLOGICI ALLA BASE?

La massa β -cellulare è finemente regolata dall'equilibrio tra perdita di β -cellule e formazione di nuove β -cellule. Nella storia del fallimento β -cellulare, il deficit di massa è stato a lungo proposto come una conseguenza della morte delle β -cellule per apoptosi. Infatti, è stato dimostrato che l'apoptosi β -cellulare è aumentata nei pazienti con DMT1 (41-42) e nei pazienti con DMT2, mentre né la replicazione né la neogenesi delle β -cellule sono ridotte (22). Tuttavia, questo principio è stato recentemente messo in discussione da studi condotti principalmente su modelli animali, i quali suggeriscono che il deficit di massa potrebbe essere dovuto piuttosto al verificarsi di fenomeni di dedifferenziazione o transdifferenziazione delle β -cellule, come vie alternative per prevenire una perdita irreversibile di massa (43-44). Per dedifferenziazione si intende la regressione delle β -cellule ad uno stato meno maturo o addirittura simile a quello di precursore cellulare, che porta alla perdita di componenti chiave dei meccanismi molecolari responsabili della funzione ottimale delle β -cellule, in termini di secrezione di insulina (43). La dedifferenziazione è stata proposta come fattore di perdita di β -cellule funzionali sia nel DMT1 che nel DMT2 (45-48). Per transdifferenziazione si intende invece l'acquisizione, da parte delle β -cellule, delle caratteristiche fenotipiche di altri tipi di cellule endocrine del pancreas (principalmente β -cellule nell'uomo e β -cellule nei roditori) (43). Anche la transdifferenziazione è stata proposta come fattore di perdita di β -cellule funzionali sia nel DMT1 che nel DMT2 (46-47) e, in quest'ultimo caso, essa potrebbe spiegare l'aumento della massa delle α -cellule che di solito accompagna la diminuzione della massa β -cellulare. Non sono tuttavia noti l'entità con la quale tali eventi si verificano in ciascuna delle due condizioni patologiche e l'eventuale reversibilità degli stessi, con conseguente riacquisizione di funzione secretoria delle β -cellule pancreatiche. È stato stimato che la dedifferenziazione nel DMT2 possa essere responsabile di appena il 2% della perdita di β -cellule, mentre solo il 3-4% delle β -cellule transdifferenzia in α -cellule (47-49). Si tratta di una bassa percentuale rispetto a una riduzione della massa funzionale delle β -cellule di circa il 90% nel DMT1 e del 50-60% nel DMT2. Pertanto, resta da capire quanto siano cruciali questi processi nel fallimento β -cellulare durante il diabete. È verosimile che l'apoptosi contribuisca in modo preponderante alla perdita della restante percentuale di β -cellule. Tuttavia, l'apoptosi può essere difficile da rilevare in vivo poiché le cellule immunitarie vicine al sito di danno sono in grado di eliminare rapidamente le cellule apoptotiche, portando pertanto ad una sottostima dei livelli di apoptosi.

Un altro evento che porta alla compromissione della massa funzionale β -cellulare è la senescenza, ossia uno stato permanente di arresto del ciclo cellulare, che porta alla perdita dei marcatori specifici delle β -cellule e alla secrezione di citochine pro-infiammatorie (50). Sebbene marcatori di senescenza (come la β -galattosidasi e la proteina p16) siano stati osservati sia nelle isole di pazienti con DMT1 che con DMT2 (51-52), non è chiaro se essa contribuisca effettiva-

mente alla disfunzione delle β -cellule nel diabete (53-55). È tuttavia interessante notare che la clearance di β -cellule senescenti in modelli murini di DMT1 riduce l'incidenza di diabete (51).

Anche la perdita di funzione β -cellulare può dipendere da diversi fenomeni, quali l'alterata capacità delle β -cellule pancreatiche di produrre insulina, di immagazzinarla nei granuli secretori e/o di rilasciarla, in risposta a diversi secretagoghi (glucosio, incretine, amminoacidi) o, al contrario, l'alterata capacità di bloccare tali processi in risposta a stimoli inibitori (56-57). La compromissione di questi eventi potrebbe alterare la capacità delle β -cellule di funzionare in maniera armonica e di rilasciare in circolo insulina in concentrazioni adeguate al mantenimento dell'omeostasi glicemica.

PERDITA DI MASSA FUNZIONALE β -CELLULARE NEL DMT1 E NEL DMT2: DIFFERENZE E SOMIGLIANZE

Infiammazione

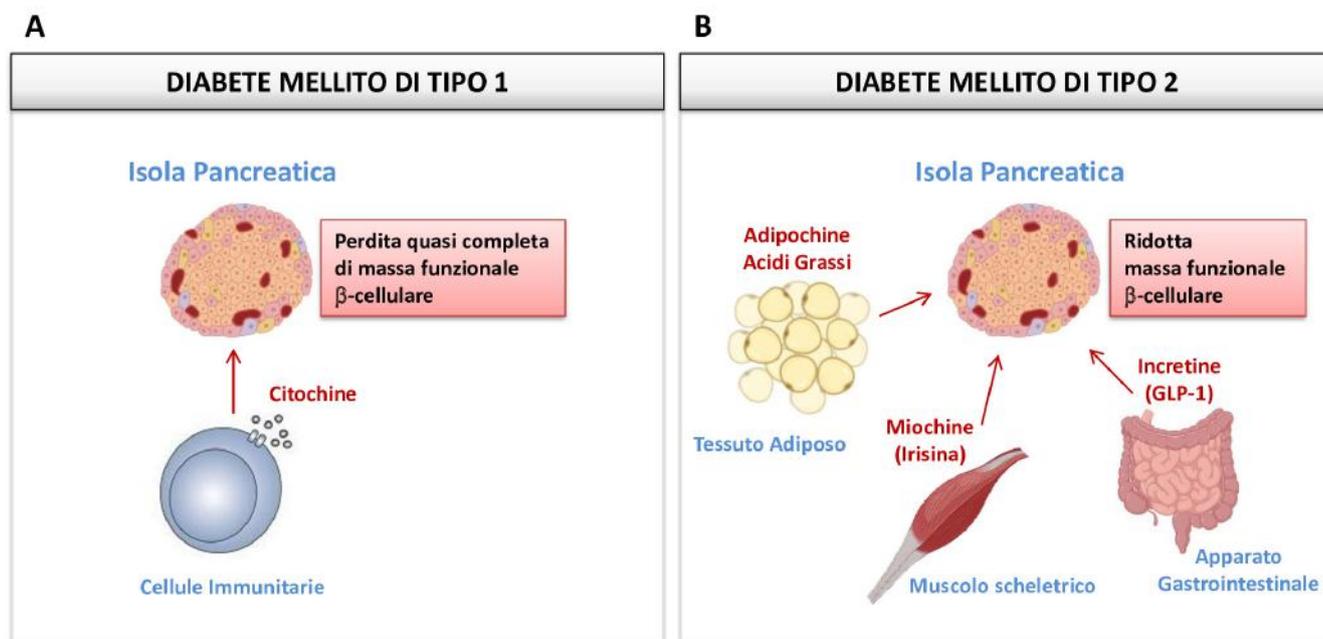
L'infiammazione è un meccanismo chiave nella patogenesi del danno β -cellulare che caratterizza il DMT1, essendo essa una patologia autoimmune, nella quale il sistema immunitario riconosce come estranei antigeni presenti sulla superficie delle β -cellule pancreatiche, e attiva sistemi di distruzione delle stesse cellule (Fig. 1).

Le isole di pazienti con DMT1 sono solitamente caratterizzate dalla presenza di insulite, un processo di infiltrazione di cellule immunitarie, soprattutto cellule T positive al CD8+ (*Cluster of Differentiation 8*), nell'isola pancreatica (58). Le cellule immunitarie che circondano le isole pancreatiche secernono citochine, come IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , in prossimità delle β -cellule e vengono reclutate e trattenute principalmente in risposta a fattori prodotti dalle stesse β -cellule. Infatti, durante la fase di inizio del danno β -cellulare, le isole esprimono livelli elevati di chemochine, ad esempio il (*C-X-C motif*) *ligand* (CXCL)₁₀ (CXCL10), richiamando cellule immunitarie esprimenti il corrispondente recettore delle chemochine, come il (*C-X-C motif*) *Receptor 3* (CXCR3) (59). Inoltre, nel DMT1, le β -cellule iper-esprimono antigeni HLA di classe I, che contribuiscono ulteriormente all'attivazione del sistema immunitario (58, 60). È interessante notare che l'IFN- α , una citochina pro-infiammatoria espressa nelle isole umane di individui affetti da DMT1, induce un'espressione di lunga durata di antigeni HLA di classe I nelle β -cellule del pancreas umano (61-62), suggerendo che la produzione locale di citochine pro-infiammatorie possa iniziare e sostenere la distruzione immuno-mediata delle β -cellule. Anche nelle isole dei pazienti con DMT2 è stato osservato un aumento del numero di alcune cellule del sistema immunitario, in particolare di macrofagi, tuttavia siamo molto lontani dai livelli di insulite osservati nelle isole dei pazienti con DMT1 (63). A conferma di questo, un recente confronto tra trascrittomi di β -cellule ottenute da donatori con DMT1 o DMT2, rispetto a trascrittomi di isole umane esposte alle citochine pro-infiammatorie IL-1 β e IFN- γ , mostra una forte sovrapposizione tra il trascrittoma di isole esposte a citochine e isole di pazienti con DMT1, ma nessuna o una marginale sovrapposizione tra il trascrittoma di isole esposte a citochine e isole di pazienti con DMT2. Questi dati confermano che la componente infiammatoria è evidente nel DMT1, mentre è marginale nel DMT2 (49).

Una differenza sostanziale nel danno β -cellulare indotto da citochine pro-infiammatorie nel DMT1 e nel DMT2 potrebbe risiedere nella sede di produzione di tali citochine e nella dinamica della loro secrezione. Infatti, mentre la produzione di citochine pro-infiammatorie è localizzata principalmente a livello pancreatico nel DMT1, nel DMT2 esse possono derivare dalle stesse cellule insulari, da macrofagi e altre cellule immunitarie all'interno dell'isola, ma anche dal tessuto adiposo attraverso la circolazione sistemica (adipochine) (64). È il caso, ad esempio, della citochina pro-infiammatoria TNF- α , che nel DMT1 è prodotta localmente nell'ambito dell'insulite, mentre nel DMT2 viene secreta dal tessuto adiposo e raggiunge le β -cellule mediante il flusso ematico. Inoltre, mentre nel DMT1 questa e altre citochine sono localmente e continuamente espresse e secrete nei pressi delle β -cellule, dove possono accumularsi in grandi quantità, nel DMT2 le citochine pro-infiammatorie provenienti dal tessuto adiposo potrebbero non raggiungere concentrazioni elevate e significative per un adeguato periodo di tempo a livello delle isole pancreatiche o non essere circondate da un *milieu* infiammatorio tale da renderle realmente dannose (64-65).

Figura 1 ♦ La perdita di massa funzionale β -cellulare rappresenta un evento necessario e precoce nella patogenesi del diabete mellito di tipo 1 e tipo 2. (A)

Le citochine pro-infiammatorie e l'insulto immunitario sono i principali responsabili della disfunzione e della morte delle β -cellule pancreatiche nel diabete mellito di tipo 1 e determinano la perdita quasi completa della massa β -cellulare. (B) Nel diabete mellito di tipo 2, la perdita di massa funzionale β -cellulare è un evento al quale concorrono processi eziologici multipli e potrebbe essere il risultato di un'alterazione multi-organo. Specificatamente, la disfunzione del tessuto adiposo (eccessivo rilascio di acidi grassi in circolo e alterazione del pattern secretorio delle adipochine) e del muscolo scheletrico (alterata secrezione di miochine, tra cui l'irisina), insieme ai difetti dell'asse incretinico (alterata azione insulinotropica del GLP-1) concorrono al danno β -cellulare. In questo caso, la riduzione della massa funzionale β -cellulare è parziale e di grado variabile



Stress del reticolo endoplasmatico

Lo stress del reticolo endoplasmatico (RE) ricopre un ruolo centrale nella disfunzione delle β -cellule pancreatiche sia nel DMT1 che nel DMT2, in quanto è in grado di determinare sia deficit secretorio che apoptosi β -cellulare (66). Esso si verifica quando la necessità di produrre ed elaborare nuove proteine eccede la fisiologica capacità di sintesi del RE, portando all'accumulo di proteine *unfolded* o *misfolded* che innesca una risposta adattiva chiamata *Unfolded Protein Response* (UPR) o risposta allo stress del RE (67). Lo scopo dell'UPR è quello di ripristinare il normale funzionamento del RE, riducendo il tasso di traduzione proteica della cellula, aumentando le dimensioni del RE, incrementando la produzione di *chaperon* molecolari e promuovendo la degradazione delle proteine mal ripiegate (49). Per via del loro peculiare ruolo di cellule secernenti insulina, le β -cellule pancreatiche sono caratterizzate da un'elevata capacità biosintetica e sono estremamente dipendenti dal corretto funzionamento del loro RE, dove viene sintetizzata la proinsulina. Infatti, per garantire la normoglicemia, la sintesi della proinsulina deve costantemente far fronte al fabbisogno oscillatorio di insulina; quando la richiesta di insulina supera la capacità delle β -cellule di sintetizzare proinsulina (per esempio in condizioni di stress metabolico o iperglicemia cronica), esse diventano estremamente suscettibili allo stress del RE. Le vie di segnale che portano all'attivazione dello stress del RE nelle β -cellule pancreatiche sono differenti nel DMT1 e nel DMT2 [per un approfondimento, fare riferimento a (66)]. In primo luogo, esso è innescato da una cronica esposizione delle β -cellule pancreatiche ad alti livelli di citochine pro-infiammatorie nel DMT1, e da stimoli gluco-lipotossici nel DMT2 (49). Nel primo caso, lo stress del RE viene attivato dall'azione delle citochine sui recettori *Inositol-Requiring protein-1* (IRE-1), mentre, nel DMT2, viene principalmente attivata la via mediata dall'asse *Protein Kinase RNA (PKR)-like ER kinase* (PERK) - *eukaryotic translation initiation factor 2* (eIF2) α (49). Tuttavia, queste due diverse vie di segnalazione conver-

gono nell'attivazione di mediatori comuni e possono essere interscambiabili tra loro. In due differenti pubblicazioni (68-69), abbiamo dimostrato che la stress chinasi *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), generalmente considerata un mediatore dell'apoptosi indotta dall'attivazione di IRE-1 da parte delle citochine (70), è attivata in egual misura dal TNF- α (68) e dall'acido grasso saturo palmitato (69), e che l'inibizione dell'attivazione di JNK (ottenuta mediante l'uso dell'inibitore chimico SP600125) previene l'apoptosi β -cellulare indotta da entrambi gli stimoli stressogeni (68-69).

L'importanza dello stress del RE nella patogenesi del danno β -cellulare è confermata dal fatto che numerose forme di diabete monogenico derivano da mutazioni in geni che codificano per proteine coinvolte nello stress del RE e/o nell'UPR (per esempio, ATF6, DNAJC3, EIF2AK3, EIF2S3, HNF1 α , IER3IP1, PPP1R15B, WSF1/2, XBP1) (66). Inoltre, i markers dello stress del RE (dei quali la proteina *C/EBP homologous protein* [CHOP] è il principale rappresentante) risultano iper-espressi nelle isole pancreatiche di pazienti con DMT1 (71) e DMT2 (72).

Oltre alla proinsulina, le β -cellule producono e secernono anche elevate quantità di polipeptide amiloide (*Islet Amyloid PolyPeptide*, IAPP), una proteina con importanti funzioni regolatorie a livello pancreatico (inibizione della secrezione di insulina e glucagone) ed extra-pancreatico (azione essenzialmente anoressizzante) (73). Un'incrementata biosintesi di insulina è solitamente associata a un'iper-espressione di IAPP. Poiché l'IAPP è un polipeptide con una spiccata tendenza a formare aggregati (depositi di amiloide), il suo accumulo nel RE rappresenta una delle principali cause di stress del RE (73). L'accumulo di aggregati di amiloide è generalmente considerato come una caratteristica tipica delle isole pancreatiche dei pazienti con DMT2 (22), nelle quali induce l'apoptosi β -cellulare mediata dal RE (72). Tuttavia, recentemente, accumuli di amiloide sono stati riscontrati anche in isole pancreatiche di pazienti affetti da DMT1, sebbene esso venga indicato come un evento non frequente e i riferimenti in letteratura siano ancora scarsi (74-75).

L'evidenza che lo stress del RE ricopre un ruolo cruciale nella disfunzione e nell'apoptosi β -cellulare è confermata dal fatto che alcune nuove molecole o farmaci già in commercio, in grado di prevenirlo, si sono rivelate efficaci nel trattamento del diabete mellito (49). È il caso degli *chaperon* molecolari *taurine-conjugated ursodeoxycholic acid derivative* (TUDCA, già usato per il trattamento delle patologie epatiche) e *sodium phenylbutyrate*, per i quali è stata dimostrata la capacità di proteggere le β -cellule pancreatiche dal danno indotto dalle citochine pro-infiammatorie e dalla lipotossicità, rispettivamente (49, 66). Tuttavia, queste molecole sembrerebbero poter agire solo in uno stato di prediabete, senza possibilità di azione nel diabete conclamato.

Stress ossidativo

Le β -cellule pancreatiche sono tra le cellule metabolicamente più attive dell'organismo e sono particolarmente dipendenti dal metabolismo ossidativo per la sintesi di ATP, in particolare a elevate concentrazioni di glucosio (76). Inoltre, ad alti livelli di glucosio, un elevato consumo di ossigeno è fondamentale per la corretta stimolazione della secrezione insulinica (77). Nonostante l'elevata attività metabolica, che inevitabilmente porta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) come sottoprodotto della respirazione mitocondriale, nelle β -cellule gli enzimi coinvolti nella difesa antiossidante sono presenti a livelli insolitamente bassi (78). Questo squilibrio rende le β -cellule altamente suscettibili a danni indotti dallo stress ossidativo.

Lo stress ossidativo è un meccanismo di danno β -cellulare ampiamente documentato nel DMT2 (79). L'infiammazione cronica associata all'obesità, la gluco-lipotossicità, l'insulino-resistenza sono infatti tutti fattori che sovraccaricano di lavoro la β -cellula e pertanto promuovono e sostengono lo stress ossidativo (80). Tuttavia, lo stress ossidativo svolge un ruolo importante anche nella patogenesi del DMT1 (79). I radicali liberi e i ROS, secreti dalle cellule del sistema immunitario oppure prodotti direttamente dalle β -cellule in risposta all'esposizione alle citochine pro-infiammatorie, contribuiscono alla distruzione delle β -cellule nel DMT1 (81-82). Infatti, l'utilizzo di molecole antiossidanti o di *scavengers* preserva la massa funzionale β -cellulare in modelli murini di DMT1 (82-83). È interessante sottolineare che l'iper-espressione di geni antiossidanti in topi NOD impedisce la distruzione immuno-mediata delle β -cellule senza però ridurre l'infiltrazione delle isole pancreatiche da parte del sistema immunitario (84).

P66^{shc} è una proteina ampiamente coinvolta nella regolazione dello stress ossidativo, nell'apoptosi cellulare e nella regolazione della longevità (85). Il suo ruolo è stato studiato in diversi sistemi cellulari, in relazione a patologie correlate

allo stress ossidativo e all'età. La sua attivazione, ottenuta mediante la fosforilazione del residuo aminoacidico Ser³⁶, risulta determinante nella disfunzione cellulare indotta da vari stimoli, in diversi organi e tessuti (86-87), inclusi il pancreas endocrino e in particolare le β -cellule pancreatiche (88). In un nostro lavoro (88), abbiamo dimostrato che il palmitato determina un aumento dell'espressione genica e proteica di p66^{Shc}, mediata dall'attivazione del fattore di trascrizione p53, così come un aumento della fosforilazione di p66^{Shc} a livello della Ser³⁶, mediata dall'attivazione della proteina JNK, sia in isole pancreatiche umane e murine che in cellule insulino-secerenti di ratto INS-1E; l'incremento dell'espressione e dell'attivazione di p66^{Shc} indotta dagli acidi grassi saturi provoca un aumento dell'apoptosi β -cellulare, parzialmente mediata da un incremento della produzione dei ROS intracellulari. Allo stesso modo, in cellule INS-1E, livelli cronicamente elevati di glucosio aumentano l'espressione proteica di p66^{Shc} e la sua attivazione, determinando apoptosi β -cellulare. A conferma del ruolo pro-apoptotico di p66^{Shc} nelle β -cellule esposte ad acidi grassi, l'espressione genica di p66^{Shc} aumenta significativamente nelle isole pancreatiche di topi nutriti con una dieta ad alto contenuto di grassi, rispetto a topi nutriti con dieta standard, e in isole pancreatiche di pazienti obesi rispetto a soggetti magri. L'aumento dell'espressione di p66^{Shc} nelle isole di pazienti obesi correla con l'incrementata espressione dei principali marker di apoptosi (BAX, caspasi 3 e citocromo c) (88). Inoltre, abbiamo recentemente dimostrato che p66^{Shc} è in grado non solo di provocare danno di vitalità, ma anche danno di funzione β -cellulare: essa infatti media l'insulino-resistenza β -cellulare indotta dall'eccesso di acidi grassi saturi, con effetti sulla capacità dell'insulina di promuovere la propria biosintesi e secrezione (89).

Oltre che dalla gluco-lipotossicità, tipica del DMT2, diversi studi hanno dimostrato che l'attivazione di p66^{Shc} può essere mediata anche da altri stimoli stressogeni che concorrono alla patogenesi sia del DMT1 che del DMT2. Tra questi stimoli ritroviamo le citochine pro-infiammatorie, l'infiammazione (90-92) e l'accumulo di amiloide (93-94). Questi dati, sebbene da confermare in β -cellule pancreatiche in quanto ottenuti in sistemi cellulari diversi, suggerirebbero che l'attivazione di p66^{Shc} possa rappresentare un mediatore di disfunzione β -cellulare in entrambe le forme di diabete.

Incretino-resistenza

Il GLP-1 e il GIP (*Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*) sono i principali ormoni incretinici secreti dalle cellule endocrine dell'intestino in risposta all'ingestione di nutrienti. Essi svolgono importanti ruoli fisiologici e in particolare esercitano un'azione diretta sulle β -cellule pancreatiche, determinando un potenziamento della secrezione insulinica glucosio-stimolata. In numerosi studi della letteratura è stato dimostrato che, nelle β -cellule pancreatiche, l'attivazione del recettore del GLP-1 determina una maggiore sensibilità al glucosio, attiva processi di neogenesi e proliferazione β -cellulare, promuove la trascrizione del gene della proinsulina, mentre riduce i livelli di apoptosi delle β -cellule (95). Diversi studi condotti ex vivo su isole pancreatiche umane esposte a diversi stimoli dannosi (lipotossicità, glucotossicità, citochine pro-infiammatorie) hanno confermato che il GLP-1 e i suoi analoghi sono in grado di ripristinare e preservare la massa funzionale delle β -cellule pancreatiche (95). Per esempio, in uno studio pubblicato nel 2013 (69), abbiamo dimostrato che l'analogo del GLP-1, *exendin-4*, è in grado di prevenire l'apoptosi indotta dall'esposizione a elevati livelli di palmitato, inibendo la capacità dell'acido grasso di attivare le stress chinasi JNK e p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), attraverso una riduzione del recettore degli acidi grassi a media/lunga catena GPR40 (*G-Protein-coupled Receptor 40*).

Alla luce di questi dati, un meccanismo di danno β -cellulare tipico del DMT2 è rappresentato dall'incertino-resistenza indotta dall'esposizione cronica ad alti livelli di acidi grassi saturi e/o glucosio. I pazienti con obesità e/o DMT2 generalmente mostrano una azione incretinica alterata (96-98), sebbene la secrezione di GLP-1 e GIP non sempre sia significativamente ridotta (99, 100), suggerendo l'esistenza di alterazioni a livello di segnale intracellulare. Infatti, l'esposizione cronica di β -cellule ad alti livelli di acido grasso saturo palmitato è in grado di ridurre la capacità dell'*exendin-4* di promuovere la biosintesi e la secrezione di insulina attraverso una ridotta espressione del recettore del GLP-1 sulla superficie delle β -cellule pancreatiche (101).

Sebbene studi recenti suggeriscano la possibilità di utilizzare gli analoghi del GLP-1 come terapia adiuvante anche nel DMT1 (102), al meglio delle nostre conoscenze non esistono studi che individuino nella ridotta azione degli ormoni incretinici sulle β -cellule pancreatiche un possibile meccanismo di danno β -cellulare nel DMT1.

Irisina

L'irisina è una miochina di 112 aminoacidi (~12 KDa), derivante dal clivaggio della porzione extracellulare N-terminale della proteina di membrana *fibronectin type III domain containing protein 5* (FNDC5), secreta principalmente dal muscolo scheletrico in seguito ad attività fisica e in grado di favorire il *browning* del tessuto adiposo bianco e la termogenesi (103). Numerosi studi hanno esplorato le proprietà pleiotropiche dell'irisina, dimostrando il suo ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo energetico, agendo su diversi tessuti e intervenendo in numerose vie biochimiche (104). In particolare, l'irisina promuove l'assorbimento e l'utilizzo/immagazzinamento del glucosio nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo, riduce la produzione epatica di glucosio, la glicogenolisi, la lipogenesi e l'adipogenesi, mentre promuove la lipolisi e l'ossidazione degli acidi grassi (104). Inoltre, l'irisina esercita effetti cardiovascolari benefici e favorisce il dimagrimento, probabilmente attraverso un'azione diretta sulla regolazione ipotalamica del *food intake* (104-105).

In un precedente lavoro, abbiamo dimostrato che l'irisina protegge le β -cellule pancreatiche e le isole pancreatiche murine e umane dall'apoptosi indotta dall'palmitato, attraverso un meccanismo che coinvolge la via di segnale anti-apoptotica AKT/Bcl-2 (*Protein Kinase B/B-cell lymphoma-2*) (106). Inoltre, l'irisina migliora la biosintesi e la secrezione dell'insulina, in modo PKA/CREB (*Protein Kinase A/cAMP Response Element-Binding protein*)-dipendente, e promuove la proliferazione delle β -cellule attraverso l'attivazione della via di ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*)-1/2 (106). Quando somministrata in vivo, l'irisina migliora la secrezione di insulina stimolata dal glucosio e aumenta il contenuto di insulina, la massa β -cellulare e la proliferazione in topi sani (106). È importante sottolineare che l'irisina stimola la secrezione di insulina solo in condizioni di alto glucosio, riducendo al minimo il rischio di ipoglicemia (106). Allo stesso modo, Liu et al. hanno dimostrato che l'irisina aumenta significativamente la proliferazione delle cellule INS-1 tramite l'attivazione di ERK e p38 MAPK, protegge le cellule dall'apoptosi indotta da glucotossicità e migliora la funzione delle β -cellule pancreatiche in un modello di ratto di DMT2 (107). Inoltre, nelle cellule INS-1E e nelle isole isolate da topi C57BL/6 esposti a condizioni gluco-lipotossiche, l'irisina migliora l'espressione dei geni correlati alla sopravvivenza e alla funzione delle β -cellule, prevenendo così l'apoptosi indotta dalla gluco-lipotossicità e ripristinando la capacità secretoria dell'insulina (108). Questi effetti dipendono dall'attivazione dell'AMPK (*Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase*), dalla soppressione dell'espressione di geni lipogenici e dalla conseguente ridotta sintesi e accumulo intracellulare di acidi grassi/trigliceridi (108).

È importante sottolineare che i livelli di irisina sono più alti in corso di obesità (109-110) e correlano positivamente con i marker di adiposità (111-112), probabilmente riflettendo una un aumento compensatorio in risposta alle anomalie metaboliche e all'insulino-resistenza. Al contrario, numerosi studi, comprese diverse meta-analisi, hanno dimostrato che i livelli di irisina sono significativamente ridotti nei pazienti con DMT2 (110, 113-116), probabilmente a causa di una perdita della risposta compensatoria dovuta a una maggiore compromissione metabolica. D'altronde, la somministrazione esogena di irisina migliora la tolleranza al glucosio e la sensibilità all'insulina e aumenta il dispendio energetico sia nei topi obesi che in quelli diabetici (104).

Se la riduzione dei livelli circolanti di irisina può rappresentare un nuovo meccanismo di disfunzione β -cellulare nel DMT2, lo stesso non si può dire per il DMT1. A tal proposito, diversi lavori hanno dimostrato che i livelli di irisina possono essere aumentati nei pazienti con DMT1 (117-119). Sebbene non si conoscano i reali motivi di tale aumento, questi dati sembrano confermare che mentre la perdita della massa funzionale nel DMT2 è influenzata dall'azione di fattori provenienti da diversi organi e tessuti (Fig. 1), nel DMT1 i meccanismi di danno sembrerebbero essere circoscritti al microambiente insulare.

CONCLUSIONI

La perdita della massa funzionale β -cellulare rappresenta l'evento centrale nella patogenesi sia del DMT1 che del DMT2. Sebbene le cause che portano a questa disfunzione siano diverse nelle due forme di diabete (mediata dal sistema immunitario e dalle citochine pro-infiammatorie nel DMT1; prevalentemente associata allo stress metabolico, e in mi-

Figura 2 ♦ Sebbene le cause che portano al fallimento β -cellulare siano diverse (immuno- e citochine-mediate per il diabete mellito di tipo 1, legate allo stress metabolico, e in misura minore alle citochine pro-infiammatorie, per il diabete mellito di tipo 2), le vie che portano alla perdita di massa funzionale β -cellulare, tramite fenomeni di apoptosi, senescenza, alterata differenziazione e deficit secretori, sono simili in entrambe le forme di diabete e includono accumulo di amiloide, stress del reticolo endoplasmatico e stress ossidativo. RE, reticolo endoplasmatico



sura minore alle citochine pro-infiammatorie, nel DMT2), le risposte molecolari messe in atto dalla β -cellula possono essere molto simili e comprendono l'infiammazione, lo stress del RE, l'accumulo intra-insulare di amiloide e lo stress ossidativo. Questi eventi biologici portano a deficit secretorio e perdita di massa β -cellulare (apoptosi, trans e dedifferenziamento, senescenza) (Fig. 2). Altri meccanismi di danno, fra cui l'alterata azione di ormoni extra insulari sulla β -cellula pancreatica (ridotta azione degli ormoni incretinici e dell'irisina) sono tipici del DMT2 e, ad oggi, non riscontrati nel DMT1.

La presenza di meccanismi condivisi nel fallimento β -cellulare nel DMT1 e DMT2 suggerisce la possibilità di individuare nuovi target e nuove strategie farmacologiche comuni a entrambe le forme di diabete (come nel caso dei nuovi farmaci che mirano a inibire lo stress del RE).

In conclusione, la disfunzione β -cellulare nel DMT1 e nel DMT2 presenta sicuramente molte differenze, ma anche numerosi punti in comune (Fig. 2).

BIBLIOGRAFIA

1. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care* 45(Suppl 1): S17-S38, 2022.
2. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* (London, England) 358(9277): 221-29, 2001.
3. Gale EAM. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 51(12): 3353-61, 2002.

4. Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, Powers AC, Rhodes CJ, Sussel L, Weir GC. β -Cell failure in type 2 diabetes: Postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *Diabetes Care* 37(6): 1751-58, 2014.
5. Poitout V, Robertson RP. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143(2): 339-42, 2002.
6. Ye R, Onodera T, Scherer PE. Lipotoxicity and β Cell Maintenance in Obesity and Type 2 Diabetes. *J Endocr Soc* 3(3): 617-31, 2019.
7. Solomon T, Knudsen S, Karstoft K, Winding K, Holst J, Pedersen B. Examining the effects of hyperglycemia on pancreatic endocrine function in humans: evidence for in vivo glucotoxicity. *J Clin Endocrinol Metab* 97(12): 4682-91, 2012.
8. Federici M, Hribal M, Perego L, Ranalli M, Caradonna Z, Perego C, Usellini L, Nano R, Bonini P, Bertuzzi F, Marlier LN, Davalli AM, Carandente O, Pontiroli AE, Melino G, Marchetti P, Lauro R, Sesti G, Folli F. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes* 50(6): 1290-301, 2001.
9. Lytrivi M, Castell A-L, Poitout V, Cnop M. Recent Insights Into Mechanisms of β -Cell Lipo- and Glucolipotoxicity in Type 2 Diabetes. *J Mol Biol* 2019. doi: 10.1016/j.jmb.2019.09.016.
10. Butler AE, Galasso R, Meier JJ, Basu R, Rizza RA, Butler PC. Modestly increased beta cell apoptosis but no increased beta cell replication in recent-onset type 1 diabetic patients who died of diabetic ketoacidosis. *Diabetologia* 50(11): 2323-31, 2007.
11. Brom M, Woliner-Van Der Weg W, Joosten L, Frielink C, Bouckennooghe T, Rijken P, Andralojc K, Göke BJ, De Jong M, Eizirik DL, Béhé M, Lahoutte T, Oyen WJG, Tack CJ, Janssen M, Boerman OC, Gotthardt M. Non-invasive quantification of the beta cell mass by SPECT with ¹¹¹In-labelled exendin. *Diabetologia* 57(5): 950-9, 2014.
12. Bogun MM, Bundy BN, Goland RS, Greenbaum CJ. C-Peptide Levels in Subjects Followed Longitudinally Before and After Type 1 Diabetes Diagnosis in TrialNet. *Diabetes Care* 43(8): 1836-42, 2020.
13. Greenbaum CJ, Beam CA, Boulware D, Gitelman SE, Gottlieb PA, Herold KC, Lachin JM, McGee P, Palmer JP, Pescovitz MD, Krause-Steinrauf H, Skyler JS, Sosenko JM. Fall in C-peptide during first 2 years from diagnosis: evidence of at least two distinct phases from composite Type 1 Diabetes TrialNet data. *Diabetes* 61(8): 2066-73, 2012.
14. Rodriguez-Calvo T, Suwandi JS, Amirian N, Zapardiel-Gonzalo J, Anquetil F, Sabouri S, von Herrath MG. Heterogeneity and Lobularity of Pancreatic Pathology in Type 1 Diabetes during the Prediabetic Phase. *J. Histochem. Cytochem* 63(8): 626-36, 2015.
15. Yu MG, Keenan HA, Shah HS, Frodsham SG, Pober D, He Z, Wolfson EA, D'Eon S, Tinsley LJ, Bonner-Weir S, Pezzolesi MG, King GL. Residual β cell function and monogenic variants in long-duration type 1 diabetes patients. *J Clin Invest* 129(8): 3252-63, 2019.
16. Keenan HA, Sun JK, Levine J, Doria A, Aiello LP, Eisenbarth G, Bonner-Weir S, King GL. Residual insulin production and pancreatic β -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. *Diabetes* 59(11): 2846-53, 2010.
17. Oram RA, Sims EK, Evans-Molina C. Beta cells in type 1 diabetes: mass and function; sleeping or dead? *Diabetologia* 62(4): 567-77, 2019.
18. Campbell-Thompson M, Fu A, Kaddis JS, Wasserfall C, Schatz DA, Pugliese A, Atkinson MA. Insulinitis and β -Cell Mass in the Natural History of Type 1 Diabetes. *Diabetes* 65(3): 719-31, 2016.
19. Lam CJ, Jacobson DR, Rankin MM, Cox AR, Kushner JA. β Cells Persist in T1D Pancreata Without Evidence of Ongoing β -Cell Turnover or Neogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 102(8): 2647-59, 2017.
20. Lyon J, Manning Fox JE, Spigelman AF, Kim R, Smith N, O'Gorman D, Kin T, Shapiro AMJ, Rajotte R V., MacDonald PE. Research-Focused Isolation of Human Islets From Donors With and Without Diabetes at the Alberta Diabetes Institute IsletCore. *Endocrinology* 157(2): 560-9, 2016.
21. Marchetti P, Suleiman M, De Luca C, Baronti W, Bosi E, Tesi M, Marselli L. A direct look at the dysfunction and pathology of the β cells in human type 2 diabetes. *Semin Cell Dev Biol* 103: 83-93, 2020.
22. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52(1): 102-10, 2003.

23. Christensen AA, Gannon M. The Beta Cell in Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* 19(9), 2019. doi: 10.1007/s11892-019-1196-4.
24. Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, Bozsak R, Speier S. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Metab* 6(9): 943-57, 2017.
25. Hannon TS, Kahn SE, Utzschneider KM, Buchanan TA, Nadeau KJ, Zeitler PS, Ehrmann DA, Arslanian SA, Caprio S, Edelstein SL, Savage PJ, Mather KJ. Review of methods for measuring β -cell function: Design considerations from the Restoring Insulin Secretion (RISE) Consortium. *Diabetes. Obes Metab* 20(1): 14-24, 2018.
26. Krogvold L, Skog O, Sundström G, Edwin B, Buanes T, Hanssen KF, Ludvigsson J, Grabherr M, Korsgren O, Dahl-Jørgensen K. Function of Isolated Pancreatic Islets From Patients at Onset of Type 1 Diabetes: Insulin Secretion Can Be Restored After Some Days in a Nondiabetogenic Environment In Vitro: Results From the DiViD Study. *Diabetes* 64(7): 2506-12, 2015.
27. Vardi P, Crisa L, Jackson RA, Dumont Herskowitz R, Wolfsdorf JI, Einhorn D, Linarelli L, Dolinar R, Wentworth S, Brink SJ, Starkman H, Soeldner JS, Eisenbarth GS. Predictive value of intravenous glucose tolerance test insulin secretion less than or greater than the first percentile in islet cell antibody positive relatives of type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 34(2): 93-102, 1991.
28. Chase HP, Voss MA, Butler-Simon N, Hoops S, O'Brien D, Dobersen MJ. Diagnosis of pre-type I diabetes. *J Pediatr* 111(6 Pt 1): 807-812, 1987.
29. Galderisi A, Moran A, Evans-Molina C, Martino M, Santoro N, Caprio S, Cobelli C. Early Impairment of Insulin Sensitivity, β -Cell Responsiveness, and Insulin Clearance in Youth with Stage 1 Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 106(9): 2660-2669, 2021.
30. Keskinen P, Korhonen S, Kupila A, Veijola R, Erkkilä S, Savolainen H, Arvilommi P, Simell T, Ilonen J, Knip M, Simell O. First-phase insulin response in young healthy children at genetic and immunological risk for Type I diabetes. *Diabetologia* 45(12): 1639-48, 2002.
31. Evans-Molina C, Sims EK, DiMeglio LA, Ismail HM, Steck AK, Palmer JP, Krischer JP, Geyer S, Xu P, Sosenko JM. β Cell dysfunction exists more than 5 years before type 1 diabetes diagnosis. *JCI insight* 3(15), 2018. doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.120877.
32. Ismail HM, Cleves MA, Xu P, Libman IM, Becker DJ, Marks JB, Skyler JS, Palmer JP, Sosenko JM. The Pathological Evolution of Glucose Response Curves During the Progression to Type 1 Diabetes in the TrialNet Pathway to Prevention Study. *Diabetes Care* 43(11): 2668-74, 2020.
33. Ferrannini E, Mari A, Nofrate V, Sosenko JM, Skyler JS. Progression to diabetes in relatives of type 1 diabetic patients: mechanisms and mode of onset. *Diabetes* 59(3): 679-85, 2010.
34. Sosenko JM, Skyler JS, Beam CA, Krischer JP, Greenbaum CJ, Mahon J, Rafkin LE, Matheson D, Herold KC, Palmer JP. Acceleration of the loss of the first-phase insulin response during the progression to type 1 diabetes in diabetes prevention trial-type 1 participants. *Diabetes* 62(12): 4179-83, 2013.
35. Sosenko JM, Palmer JP, Rafkin LE, Krischer JP, Cuthbertson D, Greenbaum CJ, Eisenbarth G, Skyler JS. Trends of earlier and later responses of C-peptide to oral glucose challenges with progression to type 1 diabetes in diabetes prevention trial-type 1 participants. *Diabetes Care* 33(3): 620-625, 2010.
36. Sosenko JM, Palmer JP, Rafkin-Mervis L, Krischer JP, Cuthbertson D, Matheson D, Skyler JS. Glucose and C-peptide changes in the perionset period of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care* 31(11): 2188-92, 2008.
37. Oram RA, Jones AC, Besser REJ, Knight BA, Shields BM, Brown RJ, Hattersley AT, McDonald TJ. The majority of patients with long-duration type 1 diabetes are insulin microsecretors and have functioning beta cells. *Diabetologia* 57(1): 187-91, 2014.
38. Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, Doliba N, Lian MM, Frank A, Velidedeoglu E, Desai NM, Koeberlein B, Wolf B, Barker CF, Naji A, Matschinsky FM, Markmann JF. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 53(3): 624-32, 2004.
39. DeFronzo RA, Eldor R, Abdul-Chani M. Pathophysiologic approach to therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Care* 36(Suppl 2): S127-38, 2013.
40. U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes* 44(11): 1249-58, 1995.

41. Kurrer MO, Pakala S V, Hanson HL, Katz JD. Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 94(1): 213-18, 1997.
42. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54(Suppl 2), 2005. doi: 10.2337/DIABETES.54.SUPPL_2.S97.
43. Talchai C, Xuan S, Lin H V, Sussel L, Accili D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell* 150(6): 1223-34, 2012.
44. Accili D, Talchai SC, Kim-Muller JY, Cinti F, Ishida E, Ordelheide AM, Kuo T, Fan J, Son J. When β -cells fail: lessons from dedifferentiation. *Diabetes. Obes Metab* 18(Suppl 1): 117-22, 2016.
45. Cinti F, Bouchi R, Kim-Muller J, Ohmura Y, Sandoval P, Masini M, Marselli L, Suleiman M, Ratner L, Marchetti P, Accili D. Evidence of β -Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 101(3): 1044-54, 2016.
46. Hunter CS, Stein RW. Evidence for Loss in Identity, De-Differentiation, and Trans-Differentiation of Islet β -Cells in Type 2 Diabetes. *Front Genet* 8(MAR), 2017. doi: 10.3389/FGENE.2017.00035.
47. Moin ASM, Butler AE. Alterations in Beta Cell Identity in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* 19(9), 2019. doi: 10.1007/S11892-019-1194-6.
48. Marselli L, Suleiman M, Masini M, Campani D, Bugliani M, Syed F, Martino L, Focosi D, Scatena F, Olimpico F, Filipponi F, Masiello P, Boggi U, Marchetti P. Are we overestimating the loss of beta cells in type 2 diabetes? *Diabetologia* 57(2): 362-65, 2014.
49. Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nat Rev Endocrinol* 16(7): 349-62, 2020.
50. Aguayo-Mazzucato C, Andle J, Lee TB, Midha A, Talemal L, Chipashvili V, Hollister-Lock J, van Deursen J, Weir G, Bonner-Weir S. Acceleration of β Cell Aging Determines Diabetes and Senolysis Improves Disease Outcomes. *Cell Metab* 30(1): 129-142.e4, 2019.
51. Thompson PJ, Shah A, Ntranos V, Van Gool F, Atkinson M, Bhushan A. Targeted Elimination of Senescent Beta Cells Prevents Type 1 Diabetes. *Cell Metab* 29(5): 1045-1060.e10, 2019.
52. Sone H, Kagawa Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* 48(1): 58-67, 2005.
53. Imai J. β -Cell senescence in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J. Diabetes Investig* 11(2): 284-86, 2020.
54. Tian Y, Zhang Y, Fu X. β Cell Senescence as a Common Contributor to Type 1 and Type 2 Diabetes. *Trends Mol Med* 25(9): 735-37, 2019.
55. Murakami T, Inagaki N, Kondoh H. Cellular Senescence in Diabetes Mellitus: Distinct Senotherapeutic Strategies for Adipose Tissue and Pancreatic β Cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 13, 2022. doi: 10.3389/FENDO.2022.869414.
56. Holman RR, Clark A, Rorsman P. β -cell secretory dysfunction: a key cause of type 2 diabetes. *Lancet. Diabetes Endocrinol* 8(5): 370, 2020.
57. Rorsman P, Braun M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol* 75: 155-79, 2013.
58. Morgan NG, Richardson SJ. Fifty years of pancreatic islet pathology in human type 1 diabetes: insights gained and progress made. *Diabetologia* 61(12): 2499-506, 2018.
59. Roep BO, Kleijwegt FS, Van Halteren AGS, Bonato V, Boggi U, Vendrame F, Marchetti P, Dotta F. Islet inflammation and CXCL10 in recent-onset type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol* 159(3): 338-43, 2010.
60. Richardson SJ, Rodriguez-Calvo T, Gerling IC, Mathews CE, Kaddis JS, Russell MA, Zeissler M, Leete P, Krogvold L, Dahl-Jørgensen K, von Herrath M, Pugliese A, Atkinson MA, Morgan NG. Islet cell hyperexpression of HLA class I antigens: a defining feature in type 1 diabetes. *Diabetologia* 59(11): 2448-58, 2016.
61. Coomans de Brachène A, Dos Santos RS, Marroqui L, Colli ML, Marselli L, Mirmira RC, Marchetti P, Eizirik DL. IFN- α induces a preferential long-lasting expression of MHC class I in human pancreatic beta cells. *Diabetologia* 61(3): 636-40, 2018.

62. Marroqui L, Dos Santos RS, Op de beeck A, Coomans de Brachène A, Marselli L, Marchetti P, Eizirik DL. Interferon- α mediates human beta cell HLA class I overexpression, endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes. *Diabetologia* 60(4): 656-67, 2017.
63. Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetologia* 52(8): 1686-88, 2009.
64. Biondi G, Marrano N, Borrelli A, Rella M, Palma G, Calderoni I, Siciliano E, Lops P, Giorgino F, Natalicchio A. Adipose Tissue Secretion Pattern Influences β -Cell Wellness in the Transition from Obesity to Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci* 23(10): 5522, 2022.
65. Nunemaker CS. Considerations for Defining Cytokine Dose, Duration, and Milieu That Are Appropriate for Modeling Chronic Low-Grade Inflammation in Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res* 2016. doi: 10.1155/2016/2846570.
66. Cnop M, Toivonen S, Igoillo-Esteve M, Salpea P. Endoplasmic reticulum stress and eIF2 α phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic β cells. *Mol Metab* 6(9): 1024-39, 2017.
67. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 519-29, 2007.
68. Natalicchio A, De Stefano F, Orlando MR, Melchiorre M, Leonardini A, Cignarelli A, Labarbuta R, Marchetti P, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Exendin-4 prevents c-Jun N-terminal protein kinase activation by Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) and inhibits TNF α -induced apoptosis in insulin-secreting cells. *Endocrinology* 151(5): 2019-29, 2010.
69. Natalicchio A, Labarbuta R, Tortosa F, Biondi G, Marrano N, Peschechera A, Carchia E, Orlando MR, Leonardini A, Cignarelli A, Marchetti P, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Exendin-4 protects pancreatic beta cells from palmitate-induced apoptosis by interfering with GPR40 and the MKK4/7 stress kinase signalling pathway. *Diabetologia* 56(11), 2013. doi: 10.1007/s00125-013-3028-4.
70. Brozzi F, Eizirik DL. ER stress and the decline and fall of pancreatic beta cells in type 1 diabetes. *Ups. J Med Sci* 121(2): 133-39, 2016.
71. Marhfour I, Lopez XM, Lefkaditis D, Salmon I, Allagnat F, Richardson SJ, Morgan NG, Eizirik DL. Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 55(9): 2417-20, 2012.
72. Huang CJ, Lin CY, Haataja L, Gurlo T, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes* 56(8): 2016-27, 2007.
73. Westermark P, Andersson A, Westermark GT. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev* 91(3): 795-826, 2011.
74. Westermark GT, Krogvold L, Dahl-Jørgensen K, Ludvigsson J. Islet amyloid in recent-onset type 1 diabetes-the DiViD study. *Ups J Med Sci* 122(3): 201-3, 2017.
75. Beery ML, Jacobsen LM, Atkinson MA, Butler AE, Campbell-Thompson M. Islet amyloidosis in a child with type 1 diabetes. *Islets* 11(2): 44-9, 2019.
76. Gerber PA, Rutter GA. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxid. Redox Signal* 26(10): 501-18, 2017.
77. Rutter GA, Pullen TJ, Hodson DJ, Martinez-Sanchez A. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. *Biochem J* 466(2): 203-18, 2015.
78. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20(3): 463-66, 1996.
79. Ikegami H, Babaya N, Noso S. β -Cell failure in diabetes: Common susceptibility and mechanisms shared between type 1 and type 2 diabetes. *J Diabetes Invest* 12(9): 1526-39, 2021.
80. Yaribeygi H, Sathyapalan T, Atkin SL, Sahebkar A. Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxid. Med Cell Longev* 2020. doi: 10.1155/2020/8609213.
81. Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Wogensen LD, Molvig J, Pociot F, Johannesen J, Nerup J. Cytokine and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic beta cells. *Curr Top Microbiol. Immunol* 164: 169-93, 1990.

82. Horio F, Fukuda M, Katoh H, Petruzzelli M, Yano N, Rittershaus C, Bonner-Weir S, Hattori M. Reactive oxygen intermediates in autoimmune islet cell destruction of the NOD mouse induced by peritoneal exudate cells (rich in macrophages) but not T cells. *Diabetologia* 37(1): 22-31, 1994.
83. Fukuda M, Ikegami H, Kawaguchi Y, Sano T, Ogihara T. Antioxidant, probucol, can inhibit the generation of hydrogen peroxide in islet cells induced by macrophages and prevent islet cell destruction in NOD mice. *Biochem. Biophys. Res Commun* 209(3): 953-58, 1995.
84. Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, Yodoi J, Miyazaki JI. Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J Exp Med* 188(8): 1445-51, 1998.
85. Migliaccio E, Goglio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402(6759): 309-13, 1999.
86. Natalicchio A, Tortosa F, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. p66Shc, a multifaceted protein linking Erk signalling, glucose metabolism, and oxidative stress. *Arch. Physiol. Biochem* 117(3): 116-24, 2011.
87. Natalicchio A, De Stefano F, Perrini S, Laviola L, Cignarelli A, Caccioppoli C, Quagliara A, Melchiorre M, Leonardini A, Conserva A, Giorgino F. Involvement of the p66Shc protein in glucose transport regulation in skeletal muscle myoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(2), 2009. doi: 10.1152/AJPENDO.90347.2008.
88. Natalicchio A, Tortosa F, Labarbuta R, Biondi G, Marrano N, Carchia E, Leonardini A, Cignarelli A, Bugliani M, Marchetti P, Fadini GP, Giorgio M, Avogaro A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. The p66^{Shc} redox adaptor protein is induced by saturated fatty acids and mediates lipotoxicity-induced apoptosis in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 58(6), 2015. doi: 10.1007/s00125-015-3563-2.
89. Biondi G, Marrano N, Dipaola L, Borrelli A, Rella M, D'Oria R, Genchi VA, Caccioppoli C, Porreca I, Cignarelli A, Perrini S, Marchetti P, Vincenti L, Laviola L, Giorgino F, Natalicchio A. The p66Shc Protein Mediates Insulin Resistance and Secretory Dysfunction in Pancreatic Beta-Cells Under Lipotoxic Conditions. *Diabetes*, 2022. doi: 10.2337/DB21-1066.
90. Cong XD, Ding MJ, Dai DZ, Wu Y, Zhang Y, Dai Y. ER stress, p66shc, and p-Akt/Akt mediate adjuvant-induced inflammation, which is blunted by argirein, a supermolecule and rhein in rats. *Inflammation* 35(3): 1031-40, 2012.
91. Cattaneo F, Patrussi L, Capitani N, Frezzato F, D'Elios MM, Trentin L, Semenzato G, Baldari CT. Expression of the p66Shc protein adaptor is regulated by the activator of transcription STAT4 in normal and chronic lymphocytic leukemia B cells. *Oncotarget* 7(35): 57086-98, 2016.
92. Yang J, Yu HM, Zhou XD, Huang HP, Han Z, Kolosov VP, Perelman JM. Cigarette smoke induces mucin hypersecretion and inflammatory response through the p66shc adaptor protein-mediated mechanism in human bronchial epithelial cells. *Mol Immunol* 69: 86-98, 2016.
93. Bashir M, Parray AA, Baba RA, Bhat HF, Bhat SS, Mushtaq U, Andrabi KI, Khanday FA. β -Amyloid-evoked apoptotic cell death is mediated through MKK6-p66shc pathway. *Neuromolecular Med* 16(1): 137-49, 2014.
94. Smith WW, Norton DD, Gorospe M, Jiang H, Nemoto S, Holbrook NJ, Finkel T, Kusiak JW. Phosphorylation of p66Shc and forkhead proteins mediates Abeta toxicity. *J Cell Biol* 169(2): 331-39, 2005.
95. Marrano N, Biondi G, Cignarelli A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F, Natalicchio A. Functional loss of pancreatic islets in type 2 diabetes: how can we halt it? *Metabolism* 2020: 154304.
96. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29(1): 46-52, 1986.
97. Tura A, Muscelli E, Gastaldelli A, Ferrannini E, Mari A. Altered pattern of the incretin effect as assessed by modelling in individuals with glucose tolerance ranging from normal to diabetic. *Diabetologia* 57(6): 1199-1203, 2014.
98. Muscelli E, Mari A, Casolaro A, Camastra S, Seghieri G, Gastaldelli A, Holst JJ, Ferrannini E. Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 57(5): 1340-48, 2008.
99. Nauck MA, Vardarli I, Deacon CF, Holst JJ, Meier JJ. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? *Diabetologia* 54(1): 10-18, 2011.

100. Lee S, Yabe D, Nohtomi K, Takada M, Morita R, Seino Y, Hirano T. Intact glucagon-like peptide-1 levels are not decreased in Japanese patients with type 2 diabetes. *Endocr J*; 57(2): 119-26, 2010.
101. Natalicchio A, Biondi G, Marrano N, Labarbuta R, Tortosa F, Spagnuolo R, D’Oria R, Carchia E, Leonardini A, Cignarelli A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Long-term exposure of pancreatic β -cells to palmitate results in SREBP-1C-dependent decreases in GLP-1 receptor signaling via CREB and AKT and insulin secretory response. *Endocrinology* 157(6), 2016. doi: 10.1210/en.2015-2003.
102. Lane K, Freeby M. Adjunctive therapies in type 1 diabetes mellitus. *Curr. Opin Endocrinol Diabetes Obes* 28(1): 8-13, 2021.
103. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481(7382): 463-68, 2012.
104. Marrano N, Biondi G, Borrelli A, Cignarelli A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F, Natalicchio A. Irisin and Incretin Hormones: Similarities, Differences, and Implications in Type 2 Diabetes and Obesity. *Biomolecules* 11(2): 286, 2021.
105. Natalicchio A, Marrano N, Biondi G, Dipaola L, Spagnuolo R, Cignarelli A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Irisin increases the expression of anorexigenic and neurotrophic genes in mouse brain. *Diabetes. Metab Res Rev*, 2019. doi: 10.1002/dmrr.3238.
106. Natalicchio A, Marrano N, Biondi G, Spagnuolo R, Labarbuta R, Porreca I, Cignarelli A, Bugliani M, Marchetti P, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. The myokine irisin is released in response to saturated fatty acids and promotes pancreatic β -cell survival and insulin secretion. *Diabetes* 66(11), 2017. doi: 10.2337/db17-0002.
107. Liu S, Du F, Li X, Wang M, Duan R, Zhang J, Wu Y, Zhang Q. Effects and underlying mechanisms of irisin on the proliferation and apoptosis of pancreatic β cells. *PLoS One* 12(4): e0175498, 2017.
108. Zhang D, Xie T, Leung PS. Irisin ameliorates glucolipotoxicity-associated β -cell dysfunction and apoptosis via AMPK signaling and anti-inflammatory actions. *Cell Physiol Biochem* 51(2): 924-37, 2018.
109. Cao RY, Zheng H, Redfearn D, Yang J. FNDC5: A novel player in metabolism and metabolic syndrome. *Biochimie* 158: 111-16, 2019.
110. Shoukry A, Shalaby SM, El-Arabi Bdeer S, Mahmoud AA, Mousa MM, Khalifa A. Circulating serum irisin levels in obesity and type 2 diabetes mellitus. *IUBMB Life* 68(7): 544-56, 2016.
111. Park KH, Zaichenko L, Brinkoetter M, Thakkar B, Sahin-Efe A, Joung KE, Tsoukas MA, Geladari E V., Huh JY, Dincer F, Davis CR, Crowell JA, Mantzoros CS. Circulating irisin in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 98(12): 4899-907, 2013.
112. Stengel A, Hofmann T, Goebel-Stengel M, Elbelt U, Kobelt P, Klapp BF. Circulating levels of irisin in patients with anorexia nervosa and different stages of obesity--correlation with body mass index. *Peptides* 39(1): 125-30, 2013.
113. Liu JJ, Wong MDS, Toy WC, Tan CSH, Liu S, Ng XW, Tavintharan S, Sum CF, Lim SC. Lower circulating irisin is associated with type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Complications* 27(4): 365-69, 2013.
114. Du XL, Jiang WX, Lv ZT. Lower Circulating Irisin Level in Patients with Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Horm. Metab Res* 48(10): 644-52, 2016.
115. Zhang C, Ding Z, Lv G, Li J, Zhou P, Zhang J. Lower irisin level in patients with type 2 diabetes mellitus: A case-control study and meta-analysis. *J Diabetes* 8(1): 56-62, 2016.
116. Song R, Zhao X, Zhang D, Wang R, Feng Y. Lower levels of irisin in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 2021: 108788.
117. Espes D, Lau J, Carlsson PO. Increased levels of irisin in people with long-standing Type 1 diabetes. *Diabet Med* 32(9): 1172-76, 2015.
118. Faienza MF, Brunetti G, Sanesi L, Colaianni G, Celi M, Piacente L, D’Amato G, Schipani E, Colucci S, Grano M. High irisin levels are associated with better glycemic control and bone health in children with Type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 141: 10-17, 2018.
119. Ates I, Arıkan MF, Erdogan K, Kaplan M, Yuksel M, Topcuoglu C, Yilmaz N, Guler S. Factors associated with increased irisin levels in the type 1 diabetes mellitus. *Endocr Regul* 51(1): 1-7, 2017.

a cura di Gloria Formoso

Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento;
Center for Advanced Studies and Technology-CAST, Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti-Pescara

Verso una nuova fonte di β -cellule per la cura del diabete mellito di tipo 1 • Towards a new source of β -cells for the cure of type 1 diabetes

Valentina Zamarian, Silvia Pellegrini,
Valeria Sordi

Diabetes Research Institute, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2202h>

ABSTRACT

Pluripotent stem cells are the best candidates for a renewable and infinite source of β -cells suitable for a future application in cell therapy for type 1 diabetes. Obtaining a cellular product that is safe and functional is becoming urgent, as the first clinical trials using stem cell-derived β cells are ongoing. This review summarizes the current strategies applied in the field of stem cell derived- β cells to improve in vitro differentiation and to solve the problems of tumorigenicity and immune rejection for a future stem cell based cell therapy.

KEYWORDS

iPSC, ESC, β -cell, differentiation, type 1 diabetes, cell therapy.

INTRODUZIONE

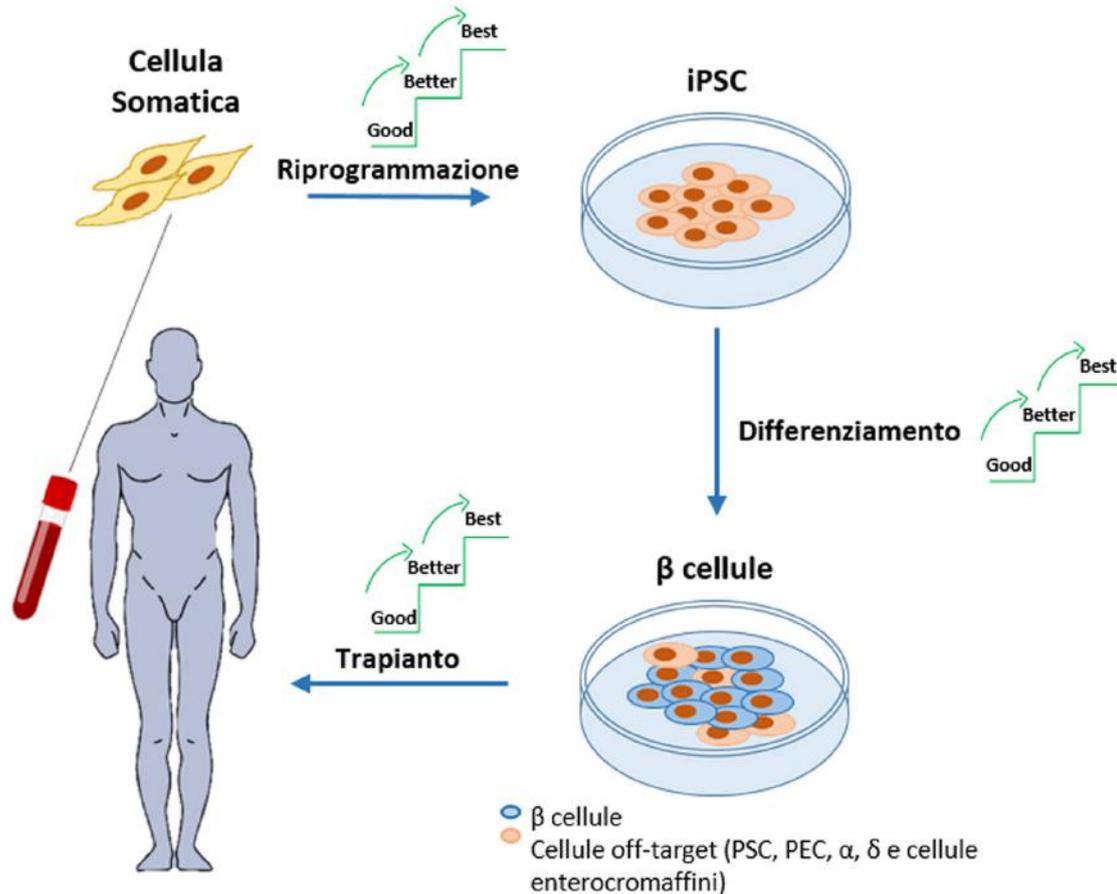
Il Diabete Mellito di Tipo 1 (DMT1) è una malattia autoimmune che porta alla completa perdita delle β -cellule produttrici di insulina a causa di un attacco da parte del sistema immunitario. La terapia insulinica associata all'utilizzo dei più moderni sensori di monitoraggio continuo del glucosio permette un controllo fine della glicemia (1), ma non protegge il paziente da complicanze a lungo termine quali nefropatia, angiopatia, retinopatia, ictus e infarto (2). Il trapianto di pancreas o di isole da donatore d'organo è un approccio che permette di riportare i livelli di glicemia nella norma e ridurre il rischio di complicanze (3). Nel trapianto di isole, il pancreas del donatore viene digerito e le isole vengono disgregate (4) per

poi essere trapiantate, tramite infusione in vena porta, nel paziente ricevente. Questo approccio è però limitato dalla scarsità dei donatori d'organo e dalla necessità di sottoporre il paziente a una terapia immunosoppressiva a vita (5-6).

Queste limitazioni potrebbero essere superate utilizzando le cellule staminali come una nuova fonte infinita di β -cellule. Una cellula staminale pluripotente (PSC) ha il potere di auto-rinnovarsi e di poter diventare qualsiasi cellula somatica del corpo, compresa la β -cellula. Ci sono due principali fonti di cellule staminali pluripotenti, le cellule staminali embrionali (ESC) e le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC). Mentre le ESC derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti, le iPSC derivano dalla riprogrammazione di cellule somatiche adulte tramite l'espressione forzata di quattro fattori di trascrizione (7). I vantaggi principali dell'utilizzo delle iPSC rispetto alle ESC, è che non hanno implicazioni etiche che ne limitino l'utilizzo e che, derivando da cellule somatiche adulte, potrebbero essere utilizzate per una terapia autologa (7). Idealmente infatti, le iPSC potrebbero essere generate da una cellula somatica adulta (del sangue, della pelle) di un paziente con DMT1, differenziate poi in cellule produttrici di insulina e trapiantate nello stesso soggetto (Fig. 1). In questo articolo andremo a trattare le attuali criticità presenti nei protocolli di differenziazione per la produzione di β -cellule mature e funzionali da ESC e iPSC, parleremo inoltre della loro possibile appli-

Figura 1 ◆ Schema di terapia autologa con iPSC.

Le cellule somatiche del paziente vengono riprogrammate in iPSC e differenziate in vitro in β -cellule per poi essere trapiantate nello stesso paziente. Si stanno apportando continui miglioramenti al processo di riprogrammazione, di differenziamento e nell'ottenimento di un prodotto cellulare migliore e più sicuro per il trapianto. iPSC=cellula staminale pluripotente; PEC=precursore pancreatico



cazione in una terapia cellulare per il DMT1 affrontando i problemi relativi alla sicurezza del prodotto cellulare finale e del rigetto immunitario. L'ottenimento di un prodotto cellulare il più possibile sicuro e funzionale sta diventando impellente considerando lo sviluppo dei primi studi clinici (NCT03163511, NCT02239354 e NCT04786262) condotti trapiantando le β -cellule derivate da ESC in pazienti con DMT1 (8-9). Nel 2006, la scoperta delle iPSC ha aperto nuove possibilità per l'utilizzo di cellule pluripotenti nelle terapie cellulari (10). iPSC e ESC hanno molte caratteristiche comuni, tra cui morfologia, pluripotenza, auto-rinnovamento e profili di espressione genica. Dal punto di vista del potenziale di differenziamento, sia le ESC sia le iPSC hanno la capacità di differenziarsi in cellule appartenenti ai tre foglietti embrionali, ectoderma, mesoderma ed endoderma. Le due tipologie di staminali

pluripotenti presentano entrambe svantaggi e vantaggi, rendendo difficile la previsione su quale sarà la fonte di cellule pluripotenti migliore per una futura applicazione nella terapia cellulare del diabete (11). Ad oggi, nessun studio clinico è stato ancora condotto con β -cellule derivate da iPSC nel campo del diabete.

DIFFERENZIAMENTO IN VITRO DI CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI IN β -CELLULE PANCREATICHE

I protocolli di differenziamento pancreatico descritti fino ad oggi mimano in vitro le fasi dello sviluppo del pancreas embrionale passando dagli stadi di endoderma definitivo, intestino primitivo, endoderma pancreatico (o progenitore endocrino) fino allo stadio di β -cellula matura (Fig. 2).

I primi tentativi di differenziamento verso lo stadio di endoderma definitivo sono stati condotti da D'Amour e colleghi, che nel 2005 per la prima volta sono stati in grado di ottenere cellule di endoderma definitivo da ESC, utilizzando l'Activina A, un membro della superfamiglia TGF- β , che come Nodal è essenziale per il differenziamento in endoderma (12). Nel 2006 fu ottenuta per la prima volta una cellula insulina positiva differenziata in vitro da ESC (13) e due anni più tardi, nel 2008, furono ottenute le prime cellule in grado di secernere insulina in vivo (14). Ogni protocollo di differenziamento si basa sull'utilizzo di specifiche citochine e modulatori del segnale che vanno ad attivare o inibire *pathways* chiave dello sviluppo del pancreas embrionale, come per esempio *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *WNT*, *Fibroblast Growth Factors* (FGF), *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) e *Notch* (13, 15-16). Nel 2014 Melton e colleghi riportano per la prima volta un protocollo di differenziazione 3D in vitro in larga scala, in grado di generare centinaia di milioni di β -cellule da ESC. Queste nuove β -cellule (denominate SC- β) esprimono marcatori tipici delle β -cellule mature (PDX1, NKX6.1, C-Peptide), immagazzinano correttamente l'insulina in granuli secretori e secernono quantità di insulina in risposta al glucosio paragonabili alle β -cellule adulte. Inoltre, queste cellule trapiantate in un modello murino sono in grado di secernere insulina, migliorando l'iperglicemia nei topi diabetici entro 2 settimane dal trapianto (15). L'efficienza del protocollo di differenziamento è in continua ottimizzazione per riuscire ad ottenere una percentuale sempre maggiore di β -cellule avente una funzione il più simile possibile a una β -cellula matura, questo anche perché i primi protocolli di differenziamento condotti su linee di ESC portavano ad un differenziamento meno efficiente quando applicato alle iPSC (17). Ancora oggi, infatti, si sta lavorando sull'efficienza di differenziamento in quanto risulta ancora molto variabile fra laboratori e linee cellulari diverse, con un'efficienza massima descritta del 70% di cellule C-peptide positive (18). Inoltre va tenuto conto che queste cellule possono includere sia cellule funzionali (NKX6.1+/C-Peptide+) sia cellule poliormonali non funzionali (Glucagone+/C-Peptide+ e Somatostatina+/C-Peptide+) (17). Tra gli altri prodotti cosiddetti *off-target* del differenziamento sono state identificate anche cellule endocrine mature come cellule α e δ , cellule enterocromaffini (19) e cellule progenitrici

pancreatiche che non hanno raggiunto la completa maturazione.

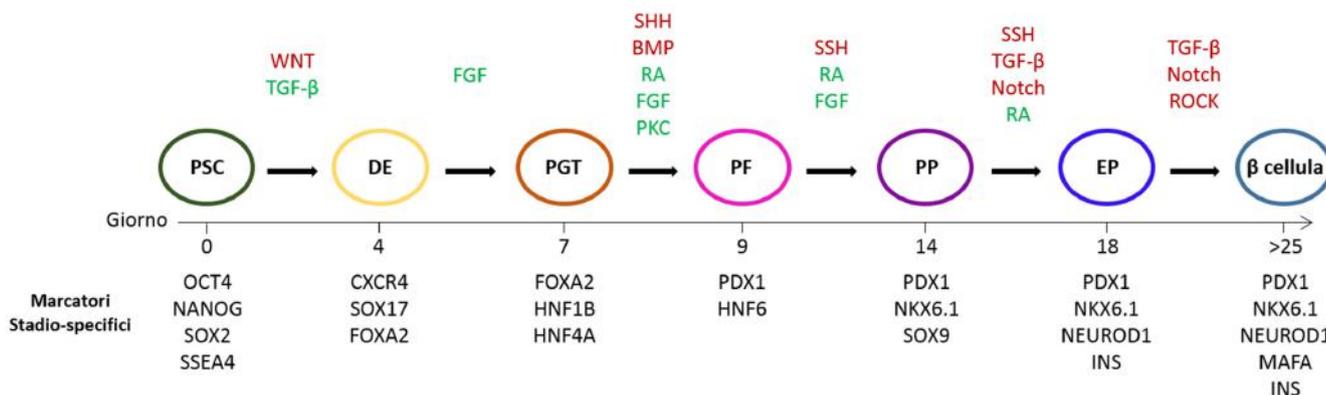
Gli studi sulle cellule progenitrici pancreatiche derivate da ESC e iPSC hanno dimostrato come queste possano ultimare la loro maturazione in vivo, una volta trapiantate in topi immunodeficienti diabetici (20-21). Ciononostante, il miglioramento dell'efficienza del differenziamento per generare percentuali più elevate di β -cellule in vitro, rimane una sfida importante al fine di poter trapiantare cellule sempre più pure mature e, di conseguenza, sicure. Per migliorare gli attuali protocolli di differenziamento si sta lavorando su diversi approcci, tra cui l'utilizzo di proteine della matrice extracellulare quali laminina, collagene e fibronectina come base di coltura per le cellule in differenziamento (22) o l'utilizzo di cellule di supporto come le cellule endoteliali (23) o le cellule mesenchimali (24): i fattori del microambiente pancreatico possono imitare le condizioni in vivo per promuovere il differenziamento in vitro.

Un altro campo di studio è la ricerca di nuove molecole che favoriscano il differenziamento o la maturazione della β -cellula. Un recente studio ha ad esempio portato alla luce l'importanza di una corretta attivazione del *pathway* di mTOR, fondamentale per istruire le β -cellule a rispondere in modo corretto al glucosio. Infatti, un'iperattivazione costante nel tempo di questo *pathway* porta a secrezione di insulina difettosa, stress del reticolo endoplasmatico e ridotta sopravvivenza delle β -cellule. Perciò, l'inibizione di questo *pathway* negli ultimi stadi del differenziamento, utilizzando molecole come il Tacrolimus e la Rapamicina, potrebbe migliorare la sopravvivenza e la funzionalità delle β -cellule (25). Un altro *pathway* importante per la generazione e la maturazione delle β -cellule è quello di ROCKII, un inibitore della chinasi associata a Rho; è stato infatti dimostrato come l'inibizione di ROCKII con la molecola H1152 porti ad ottenere delle β -cellule derivate da PSC con una migliore capacità di risposta allo stimolo di glucosio e in grado di normalizzare la glicemia dopo trapianto in un topo diabetico (26).

Attualmente, sono sempre più diffusi la coltura e il differenziamento di ESC e iPSC in tre dimensioni (3D) all'interno di bioreattori, con lo scopo di mimare l'architettura e la morfologia delle isole (27) e ottenere un maggior numero di β -cellule. Il differenziamento delle PSC può essere condotto completamente in 3D (15) oppure può essere condotto in piastre 2D fino allo stadio di precursori

Figura 2 ♦ Protocollo di differenziamento che segue le fasi dello sviluppo del pancreas embrionale da PSC in cellula insulino positiva.

Il protocollo è suddiviso in 7 stadi nei quali vengono aggiunte specifiche citochine e modulatori del segnale coinvolti nell'attivazione (verde) o nell'inibizione (rosso) di specifici pathways. PSC=cellula staminale pluripotente; DE=endoderma definitivo; PGT=primitive gut tube, intestino primitivo; PF= posterior foregut, intestino anteriore posteriore; PP=pancreatic progenitor, precursore pancreatico; EP=endocrine progenitor, progenitore endocrino; WNT=Wingless/Integrated signaling pathway; TGF- β =transforming growth factor β ; SHH=sonic hedgehog; FGF=fibroblast growth factor; BMP=bone morphogenic protein; RA=retinoic acid; PKC=protein kinase C; Notch= Notch signaling pathway; ROCK=Rho-associated protein kinase



pancreatici per poi essere trasferito in 3D nell'ultima fase del differenziamento in β -cellule (28).

LA SICUREZZA DELLE β -CELLULE DERIVATE DA CELLULE STAMINALI NELL'UOMO

La terapia cellulare con β -cellule derivate da PSC si sta già applicando nei primi studi clinici. La sicurezza relativa al prodotto cellulare finale prima dell'impianto assume quindi un'importanza cruciale. Uno dei potenziali ostacoli da superare è quello legato alla tumorigenicità delle PSC (29-30). Caratteristica intrinseca delle cellule pluripotenti infatti è la capacità di generare teratomi in seguito a trapianto, quindi la presenza anche solo di una cellula non completamente differenziata all'interno della popolazione cellulare da trapiantare potrebbe esporre al rischio di formazione di teratomi in vivo (29-30). Al fine di aumentare la sicurezza delle β -cellule derivate da iPSC dal punto di vista del loro potenziale tumorale si sta lavorando su diversi potenziali approcci:

1. *Metodo di riprogrammazione più sicuro delle cellule somatiche in iPSC.* Le iPSC possono essere riprogrammate da qualunque cellula somatica adulta e questo processo è stato inizialmente ottenuto mediante l'over-espressione di quattro fattori di trascrizione (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc, i "fattori di Yamanaka") mediante l'utilizzo

di vettori retrovirali (10,31). Il grande svantaggio di questo metodo è che i vettori retrovirali si integrano casualmente nel genoma della cellula, portando a un potenziale rischio di mutagenesi inserzionale e di instabilità genomica (32-33). Negli anni questo problema è stato superato utilizzando metodi alternativi di espressione dei fattori di Yamanaka che non prevedono l'integrazione dei fattori di riprogrammazione all'interno del genoma. Attualmente, i migliori metodi per ottenere iPSC in maniera efficiente e sicura sono i vettori episomali (efficienza dello 0.0006-0.02%) e il Sendai virus (efficienza dello 0.5-1.4%) (34,35). Recentemente è stata anche messa a punto una tecnica di riprogrammazione chimica di cellule somatiche in iPSC che potrebbe permettere la loro applicazione in clinica senza i rischi legati all'utilizzo di vettori o plasmidi, anche se non integranti (36).

2. *Selezione di cellule pancreatiche differenziate.* Un'altra possibilità per aumentare la sicurezza delle β -cellule ottenute da iPSC consiste nella selezione delle cellule differenziate o nella selezione negativa delle cellule pluripotenti residue che si vogliono eliminare. La selezione positiva utilizza anticorpi che legano proteine specifiche espresse sulla superficie delle cellule pancreatiche e può avvenire a diversi stadi del

differenziamento, dai progenitori dell'endoderma pancreatico (PE) alle β -cellule mature, ma attualmente non sono ancora stati trovati dei marcatori di superficie universalmente condivisi. Negli ultimi anni sono stati proposti molti marcatori, tra cui CD24(37), CD200 e CD318 (38) per le cellule endocrine mature, e CD142 per i progenitori pancreatici, ma nessuno di questi ha avuto seguito in studi successivi. Uno dei marcatori di superficie più promettenti è la glicoproteina 2 (zymogen granule membrane GP2), identificata tramite analisi di espressione genica (39) e di proteomica (40). La selezione tramite GP2 è stata utilizzata per l'isolamento dei progenitori pancreatici PDX1⁺/NKX6-1⁺ derivati da PSC (40). Il differenziamento dei progenitori pancreatici GP2⁺ è correlato ad una migliore efficienza di differenziamento e alla formazione di cellule insulino positive più responsive al glucosio (39). Nel 2019 Veres e colleghi hanno identificato mediante analisi di trascrittomica il marcatore di superficie CD49a/ITGA1. La selezione delle cellule CD49⁺ e loro riaggregazione ha permesso di ottenere aggregati che contenevano fino all'80% di β -cellule derivate da PSC. Queste cellule erano più funzionali e reattive allo stimolo di glucosio in vitro rispetto a quelle non selezionate per il CD49a (41). In ultimo, un recente lavoro ha riportato l'utilizzo di tre anticorpi monoclonali, denominati 4-2B2, 4-5C8 e 4-5G9, specifici per l'identificazione delle cellule positive all'insulina derivate da PSC. Questo approccio ha permesso di ottenere cluster di cellule simili a isole con una migliore capacità di risposta al glucosio (42). Queste strategie potrebbero permettere la produzione su larga scala di β -cellule derivate da PSC più pure, funzionali e potenzialmente sicure.

3. *Eliminazione delle PSC contaminanti dal prodotto finale.* La strategia di selezione mediante anticorpi diretti contro marcatori specifici può essere utilizzata anche in negativo, andando a sfruttare l'espressione di marcatori specifici delle cellule pluripotenti per eliminarle dal prodotto finale. Anticorpi contro l'antigene (TRA)-1-60 e TRA-1-81 o gli antigeni embrionali specifici (SSEA), come SSEA-3, SSEA-4 (43) e SSEA-5 (44) sono stati utilizzati per selezionare negativamente le PSC all'interno di popolazioni cellulari di cellule differenziate, ma la selezione mediante citometria a flusso non assicura una completa eliminazione

delle PSC e la procedura di selezione potrebbe impattare sulla vitalità delle cellule differenziate. Per questo motivo l'utilizzo di anticorpi è stato associato ad agenti citotossici che in seguito al legame dell'anticorpo portano alla morte delle PSC direttamente nelle piastre di coltura (45-49). Anche se gli approcci presenti in letteratura si sono dimostrati più o meno efficaci nell'eliminazione delle PSC, quasi nessuno è stato sperimentato sulle β -cellule derivate da PSC per la terapia cellulare del diabete. Recentemente è stato pubblicato uno studio interessante riguardante un nuovo metodo utilizzato per eliminare le PSC residue da una coltura di cardiomiociti differenziati. Nello specifico, il coniugato anticorpo-farmaco anti-CD30 Brentuximab Vedotin è stato utilizzato per uccidere selettivamente le cellule iPSC, che esprimono alti livelli di CD30 (50). Recentemente abbiamo applicato questa strategia nel campo del diabete, confermando che il trattamento con Brentuximab Vedotin induce efficacemente la morte cellulare nelle iPSC residue dopo il processo di differenziamento, non intaccando l'identità e la funzionalità delle β -cellule differenziate. L'efficacia di questa strategia è stata confermata anche in vivo, infatti il trapianto di β -cellule derivate da iPSC trattate con Brentuximab Vedotin prima del trapianto non ha portato alla formazione di teratomi. Questi risultati dimostrano come strategie di eliminazione selettiva delle cellule pluripotenti possano ridurre il potenziale tumorale delle PSC contaminanti, migliorando la sicurezza delle β -cellule (51).

4. *Controllo delle cellule tumorali tramite l'editing genetico con l'inserimento di un gene suicida.* L'editing genetico è una nuova strategia utilizzata per controllare il prodotto cellulare finale, anche dopo il trapianto, dotando le cellule di un gene suicida in grado di eliminare al bisogno le PSC residue e le cellule differenziate che potrebbero subire una trasformazione maligna in vivo (52). In generale, per l'editing delle PSC, deve essere scelto un vettore in grado di fornire un inserimento stabile ed efficiente del costrutto, in quanto il gene inserito deve poter essere mantenuto nello stato pluripotente, nella progenie, durante il differenziamento e nello stadio finale. Inoltre, non deve andare incontro a silenziamento, riduzione dell'espressione o modifiche dovute a mutazioni. I geni suicidio più comunemente usati svolgono la loro funzione attra-

verso un'attività enzimatica di conversione di un farmaco in un composto tossico. Qadir e colleghi hanno applicato questo approccio nel campo delle β -cellule derivate da PSC tramite un doppio approccio "fail-safe", in grado sia di uccidere la frazione residua di PSC, sia di selezionare le cellule produttrici di insulina. In particolare, hanno utilizzato come gene suicida la timidina chinasi del virus herpes simplex (HSV-TK) posta sotto il promotore della trascrittasi inversa della telomerasi (*hTERT*), altamente espresso solo dalle cellule staminali e dalle cellule tumorali. Questo ha permesso la morte selettiva delle PSC dopo l'esposizione al Ganciclovir (GCV). Allo stesso tempo, la nitroreductasi associata a *E. Coli* (NTR) è stata utilizzata per selezionare le cellule positive all'insulina. Poiché questo costrutto è affiancato da siti *loxP*, ed è eliminato dall'espressione di Cre posto sotto il controllo del promotore dell'insulina umana, le cellule che esprimono l'insulina sono rese insensibili al profarmaco CB1954. Utilizzando questo metodo solo le cellule insulino-positive e non proliferanti sopravvivono alla selezione, e le cellule che possono de-differenziarsi dopo il trapianto possono ancora essere selettivamente uccise in vivo dal GCV (53). Un'altra possibilità consiste nella possibilità di indurre l'apoptosi specificatamente nelle PSC, sfruttando l'espressione di geni legati all'apoptosi specifici delle PSC (54) oppure utilizzando promotori altamente espressi nelle PSC come *TERT*, *OCT4*, *TERF1* o *NANOG* (55-58). In conclusione, l'editing genetico è un approccio promettente per controllare i prodotti cellulari derivati dalla PSC, in particolare per l'eliminazione di cellule con potenziale tumorale in vitro e per poter intervenire tempestivamente in caso di insorgenza di tumori in vivo. Tuttavia, va tenuto presente che l'editing genetico può causare mutazioni o il silenziamento di geni endogeni, e che questo potrebbe portare alla morte della cellula o promuovere la sua trasformazione tumorale (59).

IMMUNITÀ

Un altro grande limite da superare prima di potere applicare efficacemente in clinica la terapia con β -cellule derivate da PSC consiste nel rigetto delle cellule trapiantate, dovuto all'incompatibilità HLA delle β -cellule deri-

vanti da PSC di un donatore. Inoltre, poiché le tecniche di riprogrammazione e la coltura prolungata in vitro potrebbero portare all'acquisizione di nuovi antigeni, le β -cellule potrebbero suscitare una risposta di rigetto indipendentemente dalla compatibilità HLA iniziale (60-61). Va inoltre considerato che nel campo del diabete di tipo 1 il problema del rigetto persisterebbe anche nel caso di una terapia autologa di β -cellule derivate da iPSC dello stesso donatore, per via della risposta autoimmune. Attualmente il problema del rigetto viene controllato con farmaci immunosoppressori, che però presentano tossicità diretta sulla β -cellula e possono avere effetti collaterali anche gravi nei riceventi (62). Di seguito verranno descritti i principali potenziali approcci utilizzati per prevenire il rigetto immunitario dopo il trapianto.

1. *Tecniche di incapsulamento del prodotto cellulare per prevenire la risposta immunitaria.* I sistemi di incapsulamento sono stati proposti come soluzione per proteggere fisicamente le cellule dal sistema immunitario, ma possono essere sfruttati anche come sistema di sicurezza, in quanto possono essere rimossi in caso di formazione di tumori. L'incapsulamento consiste nella protezione fisica delle cellule con una struttura semi-permeabile in grado di proteggere le cellule dal sistema immunitario, ma nello stesso tempo consentire il passaggio di nutrienti, ossigeno e insulina. Diversi studi hanno applicato il metodo dell'incapsulamento nel trapianto di isole per la cura del DM1 ed esistono due metodi principali, il micro- e il macro-incapsulamento. Il micro-incapsulamento consiste nel racchiudere le isole in capsule, solitamente di alginato, in rapporto 1:1, mentre nel macro-incapsulamento si include tutto il preparato cellulare in un unico dispositivo; nel primo caso lo scambio di nutrienti e ossigeno è migliore grazie ad un rapporto superficie/volume più elevato (63-64). Tra i sistemi di macro-incapsulamento (65-67), il dispositivo TheraCyte™ è composto da una membrana esterna che facilita la vascolarizzazione e una membrana immunoprotettiva interna ed è stato utilizzato per studiare la risposta allogenica inizialmente nel modello sperimentale di ratto. Ai ratti è stato impiantato sottocute il dispositivo vuoto, dopo 3 mesi dall'impianto è stato indotto il diabete e all'interno del dispositivo sono state inserite 1000 isole di ratto da donatore. I dati hanno mostrato che il dispositivo è in grado di

proteggere le isole dalla risposta immune a 6 mesi dopo il trapianto. Un aspetto negativo del dispositivo è che a 6 mesi dal trapianto ha mostrato segni di fibrosi al suo interno, che può portare a una perdita del graft a lungo termine. Un sistema di macro-incapsulamento molto simile a Theracyte, denominato Encaptra, è quello attualmente utilizzato nelle sperimentazioni cliniche di β -cellule derivate da ESC (8-9). L'alternativa è l'utilizzo di sistemi di micro-incapsulamento, una tecnologia applicata per la prima volta 42 anni fa, quando è stato dimostrato che le isole incapsulate e trapiantate in un modello di ratto diabetico erano in grado di migliorare il diabete per 2-3 settimane (68). I dispositivi di incapsulamento tuttavia, possono portare allo sviluppo di una risposta da corpo estraneo, alla formazione di una capsula fibrotica attorno al trapianto e alla conseguente morte delle isole per ipossia (69). Successive modifiche alle dimensioni delle capsule e l'utilizzo di nuovi biomateriali hanno migliorato la biocompatibilità prolungando la durata e la funzionalità del trapianto (70-72). Vegas e colleghi hanno mostrato come β -cellule derivate da PSC incapsulate in alginato di biossido di triazolo-tiomorfina siano in grado di ripristinare la glicemia in topi diabetici immunocompetenti in assenza di immunosoppressione e 174 giorni dopo il trapianto le β -cellule mostravano ancora reattività al glucosio (72). Tuttavia, ulteriori miglioramenti sono necessari per permettere una stabilità e una funzionalità a lungo termine del prodotto trapiantato.

2. *Editing delle cellule per renderle meno immunogene.* Una strategia su cui si sta investendo tantissimo nel campo in questi ultimi anni è cercare di modificare l'espressione delle proteine di superficie delle cellule in modo da renderle invisibili al sistema immunitario. Uno degli approcci più utilizzati consiste nella delezione del gene beta-2-microglobulina (B2M) che permette di generare cellule che non esprimono l'HLA di classe I, in modo da renderle meno immunogeniche in quanto non riconoscibili dalle cellule dell'immunità adattativa (73). Un'ulteriore modifica può essere fatta eliminando anche il gene CIITA che codifica per l'HLA di classe II (74). La rimozione dell'HLA protegge le cellule dall'attacco dei linfociti T CD8+, ma l'assenza di espressione di HLA determina l'attivazione delle cellule dell'immunità innata, in particolare le

cellule NK. A questo scopo molti gruppi stanno lavorando sull'introduzione di fattori immunomodulatori quali PD-L1 (75), HLA-E (76) o HLA-G (77), che inducono tolleranza contro le cellule NK, oppure molecole come CD47, che impedisce la fagocitosi della cellula da parte del macrofago (78).

In un recente studio è stato dimostrato come le β -cellule derivate da PSC in un ambiente infiammatorio sovra esprimano l'HLA-I come accade nelle β -cellule umane e come queste siano in grado di innescare una risposta HLA-I che stimola i linfociti T CD8+ contro le β -cellule. L'editing delle β -cellule derivanti da PSC ha dimostrato come l'assenza di espressione in membrana dell'HLA-I e la sovra espressione di PDL-1 fossero in grado di ridurre la risposta immunitaria CD8+ specifica (79).

PRIMI STUDI CLINICI CON β -CELLULE DERIVATE DA ESC

Grazie ai suoi studi pionieristici sul differenziamento di ESC in β -cellule, i ricercatori di Viacyte Inc (<https://viacyte.com/>) sono stati i primi a condurre studi clinici trapiantando dei precursori pancreatici (PEC, cellule PDX1+/NKX6.1+) derivati dal differenziamento di ESC in pazienti con T1D. L'approccio utilizzato da Viacyte è stato quello di trapiantare sottocute in assenza di immunosoppressione un prodotto, denominato PEC Encap, o VC-01) composto da delle cellule progenitrici pancreatiche incapsulate in un dispositivo (Encaptra) che permettesse lo scambio di nutrienti, glucosio, ossigeno e ormoni, e consentisse la maturazione in vivo dei progenitori in β -cellule funzionali. Sfortunatamente, questo metodo di incapsulamento ha portato allo sviluppo di una forte reazione fibrotica intorno al dispositivo che ha determinato un'elevata morte delle cellule pancreatiche al suo interno, nella maggior parte dei pazienti trapiantati. Per questo motivo Viacyte ha deciso di sviluppare un secondo prodotto (PEC-Direct, VC-02) composto da PEC e un dispositivo di incapsulamento che presenta dei microfori che permettono la vascolarizzazione delle cellule incapsulate per migliorarne l'attecchimento; di conseguenza questa strategia necessita di una terapia immunosoppressiva. I due studi che riportano i dati ottenuti su 15 e 17 pazienti con T1D in seguito al trapianto di VC-02 nel sottocute hanno dimostrato la presenza, a 6 e 12 mesi dal trapianto, di una piccola quantità (5-30 pM) di C-peptide in circo-

lo in risposta al pasto. Anche se la quantità di C-peptide rilevata era bassa rispetto alla quantità che servirebbe ad ottenere l'insulino indipendenza (1000-1500 pM), questi dati sono la prima evidenza riportata di secrezione di insulina regolata dai pasti da parte di cellule staminali differenziate nei pazienti. L'analisi istologica dei dispositivi ha rivelato la presenza, di α e β -cellule mature (8-9). Inoltre le cellule sono stati ben tollerate e non si è osservata alcuna formazione di teratomi o eventi avversi gravi correlati al trapianto. L'ultimo trial clinico che Viacyte sta conducendo in collaborazione con CRISPR Therapeutics (PEC-QT, VCTX210), prevede l'utilizzo di cellule geneticamente modificate per essere meno immunogene, incapsulate nel dispositivo senza la necessità di una terapia immunosoppressiva.

Un'altra realtà è approdata in clinica nel 2021 con una strategia diversa da quella di Viacyte. La company Vertex sta infatti conducendo uno studio clinico in fase 1/2, con un prodotto denominato VX-880 (NCT04786262). VX-880 consiste in β -cellule derivanti da ESC completamente differenziate in vitro e trapiantate nel fegato tramite infusione in vena porta accoppiata a una terapia immunosoppressiva. Questo approccio è volto a valutare le β -cellule mature derivate da ESC come fonte alternativa rispetto alle isole da donatore, ma mantiene tutte le altre caratteristiche (sito di impianto, tipologia riceventi, immunosoppressione) del trapianto di isole. Gli stessi scienziati stanno comunque lavorando a un dispositivo di macroincapsulamento che consentirà a breve di sperimentare queste β -cellule in assenza di immunosoppressione. I risultati di questi studi saranno tappe fondamentali nel percorso verso la cura del diabete di tipo 1 con la terapia cellulare e indirizzeranno le scelte future in termini di differenziamento da cellule staminali pluripotenti, protezione dal rischio di tumori e dal rigetto.

CONCLUSIONE

Una nuova fonte infinita di β -cellule derivante da cellule staminali pluripotenti rappresenta un traguardo importante per la terapia cellulare del T1D. Studi clinici sono già in corso utilizzando β -cellule derivanti da ESC e stanno mettendo alla prova la vera potenzialità delle cellule staminali. Tra le cellule staminali, le iPSC stanno suscitando un grade interesse poiché potrebbero essere utilizzate come fonte di cellule autologhe per il trattamento del

diabete. Tuttavia, è necessario un sistema di coltura più efficiente per generare β -cellule funzionali per applicazioni cliniche. Inoltre, poiché l'utilizzo in clinica di β -cellule derivate da iPSC si sta avvicinando, la risoluzione delle criticità legate alla sicurezza e al rigetto immunitario stanno diventando di essenziale importanza. Un'iPSC migliore può essere ottenuta utilizzando la riprogrammazione chimica o vettori non integranti. Inoltre, un miglior prodotto cellulare finale può essere ottenuto tramite purificazione di β -cellule utilizzando marcatori di superficie specifici, tramite l'eliminazione della frazione residua di PSC o il controllo della formazione di teratomi in vivo tramite l'editing genetico con l'inserimento di un gene suicida. Infine, si sta cercando di controllare il rigetto tramite tecniche di incapsulamento e di editing delle cellule per renderle meno immunogeniche.

BIBLIOGRAFIA

- Vettoretti M, Cappon G, Acciaroli G, Facchinetti A, Sparacino G. Continuous Glucose Monitoring: Current Use in Diabetes Management and Possible Future Applications. *J Diabetes Sci Technol* 12: 1064-71, 2018. doi: 10.1177/1932296818774078.
- Schwartz SS, Epstein S, Corkey BE, Grant SFA, Gavin JR, Aguilar RB, et al. A Unified Pathophysiological Construct of Diabetes and its Complications. *Trends Endocrinol Metab* 28: 645-55, 2017. doi: 10.1016/j.tem.2017.05.005.
- Meloche RM. Transplantation for the treatment of type 1 diabetes. *World J Gastroenterol* 13:6347-55, 2007. doi: 10.3748/WJG.V13.I47.6347.
- Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37: 413-20, 1988. doi: 10.2337/DIAB.37.4.413.
- Hering BJ, Clarke WR, Bridges ND, Eggerman TL, Alejandro R, Bellin MD, et al. Phase 3 Trial of Transplantation of Human Islets in Type 1 Diabetes Complicated by Severe Hypoglycemia. *Diabetes Care* 39: 1230-40, 2016. doi: 10.2337/DC15-1988.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54: 2060-9, 2005. doi: 10.2337/DIABETES.54.7.2060.
- Bourgeois S, Sawatani T, Van Mulders A, De Leu N, Heremans Y, Heimberg H, et al. Towards a Functional Cure for Diabetes Using Stem Cell-Derived Beta Cells: Are We There Yet? *Cells* 10: 1-24, 2021. doi: 10.3390/CELLS10010191.

10. Shapiro AMJ, Thompson D, Donner TW, Bellin MD, Hsueh W, Pettus J, et al. Insulin expression and C-peptide in type 1 diabetes subjects implanted with stem cell-derived pancreatic endoderm cells in an encapsulation device. *Cell Reports Med* 2, 2021. doi: 10.1016/J.XCRM.2021.100466/ATTACHMENT/A67DE154-950D-4CD3-B868-340DoCAE7BoB/MMC2.XLSX.
11. Ramzy A, Thompson DM, Ward-Hartstonge KA, Iverson S, Cook L, Garcia R V., et al. Implanted pluripotent stem-cell-derived pancreatic endoderm cells secrete glucose-responsive C-peptide in patients with type 1 diabetes. *Cell Stem Cell* 28: 2047-61.e5, 2021. doi: 10.1016/J.STEM.2021.10.003.
12. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-76, 2006. doi: 10.1016/J.CELL.2006.07.024.
13. Puri MC, Nagy A. Concise review: Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on. *Stem Cells* 30: 10-4, 2012. doi: 10.1002/STEM.788.
14. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23: 1534-41, 2005. doi: 10.1038/NBT1163.
15. D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24: 1392-401, 2006. doi: 10.1038/NBT1259.
16. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26: 443-52, 2008. doi: 10.1038/NBT1393.
17. Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Der vort A, Ryu JH, et al. Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell* 159: 428-39, 2014. doi: 10.1016/J.CELL.2014.09.040.
18. Pellegrini S, Manenti F, Chimienti R, Nano R, Ottoboni L, Ruffini F, et al. Differentiation of Sendai Virus-Reprogrammed iPSC into β Cells, Compared with Human Pancreatic Islets and Immortalized β Cell Line. *Cell Transplant* 27: 1548-60, 2018. doi: 10.1177/0963689718798564.
19. Maxwell KG, Millman JR. Applications of iPSC-derived beta cells from patients with diabetes. *Cell Reports Med* 2:100238, 2021. doi: 10.1016/J.XCRM.2021.100238.
20. Velazco-Cruz L, Song J, Maxwell KG, Goedegebuure MM, Augsornworawat P, Hogrebe NJ, et al. Acquisition of Dynamic Function in Human Stem Cell-Derived β Cells. *Stem Cell Reports* 12: 351-65, 2019. doi: 10.1016/J.STEMCR.2018.12.012.
21. Augsornworawat P, Maxwell KG, Velazco-Cruz L, Millman JR. Single-Cell Transcriptome Profiling Reveals β Cell Maturation in Stem Cell-Derived Islets after Transplantation. *Cell Rep* 32, 2020. doi: 10.1016/J.CELREP.2020.108067.
22. Rezanian A, Bruin JE, Riedel MJ, Mojibian M, Asadi A, Xu J, et al. Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes* 61: 2016-29, 2012. doi: 10.2337/DB11-1711.
23. Bruin JE, Rezanian A, Xu J, Narayan K, Fox JK, O'Neil JJ, et al. Maturation and function of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors in macroencapsulation devices following transplant into mice. *Diabetologia* 56: 1987-98, 2013. doi: 10.1007/S00125-013-2955-4.
24. Singh R, Cottle L, Loudovaris T, Xiao D, Yang P, Thomas HE, et al. Enhanced structure and function of human pluripotent stem cell-derived beta-cells cultured on extracellular matrix. *Stem Cells Transl Med* 10: 492-505, 2021. doi: 10.1002/SCTM.20-0224.
25. Augsornworawat P, Velazco-Cruz L, Song J, Millman JR. A hydrogel platform for in vitro three dimensional assembly of human stem cell-derived islet cells and endothelial cells. *Acta Biomater* 97: 272-80, 2019. doi: 10.1016/J.ACTBIO.2019.08.031.
26. Chmielowiec J, Szlachcic WJ, Yang D, Scavuzzo MA, Wamble K, Sarrion-Perdigones A, et al. Human pancreatic microenvironment promotes β -cell differentiation via non-canonical WNT5A/JNK and BMP signaling. *Nat Commun* 13: 1-18, 2022. doi: 10.1038/s41467-022-29646-1.
27. Helman A, Cangelosi AL, Davis JC, Pham Q, Rothman A, Faust AL, et al. A Nutrient-Sensing Transition at Birth Triggers Glucose-Responsive Insulin Secretion. *Cell Metab* 31: 1004-16, 2020. doi: 10.1016/J.CMET.2020.04.004.
28. Ghazizadeh Z, Kao DI, Amin S, Cook B, Rao S, Zhou T, et al. ROCKII inhibition promotes the maturation of human pancreatic beta-like cells. *Nat Commun* 8, 2017. doi: 10.1038/S41467-017-00129-Y.
29. Ribeiro D, Kvist AJ, Wittung-Stafshede P, Hicks R, Forslöw A. 3D-Models of Insulin-Producing β -Cells: from Primary Islet Cells to Stem Cell-Derived Islets.

- Stem Cell Rev Reports 14: 177-88, 2018. doi: 10.1007/S12015-017-9783-8.
30. Du Y, Liang Z, Wang S, Sun D, Wang X, Liew SY, et al. Human pluripotent stem-cell-derived islets ameliorate diabetes in non-human primates. *Nat Med* 28: 272-82, 2022. doi: 10.1038/S41591-021-01645-7.
 31. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 11: 268-77, 2011. doi: 10.1038/NRC3034.
 32. Lee AS, Tang C, Rao MS, Weissman IL, Wu JC. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat Med* 19: 998-1004, 2013. doi: 10.1038/NM.3267.
 33. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 86-72, 2007. doi: 10.1016/J.CELL.2007.11.019.
 34. Belviso I, Romano V, Nurzynska D, Castaldo C, Meglio F Di. Non-integrating Methods to Produce Induced Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine: An Overview. *Biomech Funct Tissue Eng* 2020. doi: 10.5772/INTECHOPEN.95070.
 35. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol* 3, 2015. doi: 10.3389/FCELL.2015.00002.
 36. Rao MS, Malik N. Assessing iPSC reprogramming methods for their suitability in translational medicine. *J Cell Biochem* 113: 3061-8, 2012. doi: 10.1002/JCB.24183.
 37. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiramami Y, Morinaga C, Daimon T, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 376: 1038-46, 2017. doi: 10.1056/NEJMOA1608368.
 38. Guan J, Wang G, Wang J, Zhang Z, Fu Y, Cheng L, et al. Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. *Nature* 605, 2022. doi: 10.1038/S41586-022-04593-5.
 39. Jiang W, Sui X, Zhang D, Liu M, Ding M, Shi Y, et al. CD24: a novel surface marker for PDX1-positive pancreatic progenitors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 29: 609-17, 2011. doi: 10.1002/STEM.608.
 40. Kelly OG, Chan MY, Martinson LA, Kadoya K, Ostertag TM, Ross KG, et al. Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 29: 750-6, 2011. doi: 10.1038/NBT.1931.
 41. Ameri J, Borup R, Prawiro C, Ramond C, Schachter KA, Scharfmann R, et al. Efficient Generation of Glucose-Responsive Beta Cells from Isolated GP2 + Human Pancreatic Progenitors. *Cell Rep* 19: 36-49, 2017. doi: 10.1016/J.CELREP.2017.03.032.
 42. Cogger KF, Sinha A, Sarangi F, McCaugh EC, Saunders D, Dorrell C, et al. Glycoprotein 2 is a specific cell surface marker of human pancreatic progenitors. *Nat Commun* 8, 2017. doi: 10.1038/S41467-017-00561-0.
 43. Veres A, Faust AL, Bushnell HL, Engquist EN, Kenty JHR, Harb G, et al. Charting cellular identity during human in vitro β -cell differentiation. *Nature* 569: 368-73, 2019. doi: 10.1038/S41586-019-1168-5.
 44. Parent A V., Ashe S, Nair GG, Li M-L, Chavez J, Liu JS, et al. Development of a scalable method to isolate subsets of stem cell-derived pancreatic islet cells. *Stem Cell Reports* 17: 979-92, 2022. doi: 10.1016/J.STEMCR.2022.02.001.
 45. Fong CY, Peh GSL, Gauthaman K, Bongso A. Separation of SSEA-4 and TRA-1-60 labelled undifferentiated human embryonic stem cells from a heterogeneous cell population using magnetic-activated cell sorting (MACS) and fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Stem Cell Rev Reports* 5: 72-80, 2009. doi: 10.1007/S12015-009-9054-4.
 46. Tang C, Lee AS, Volkmer JP, Sahoo D, Nag D, Mosley AR, et al. An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nat Biotechnol* 29: 829-34, 2011. doi: 10.1038/NBT.1947.
 47. Choo AB, Tan HL, Ang SN, Fong WJ, Chin A, Lo J, et al. Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem Cells* 26: 1454-63, 2008. doi: 10.1634/STEMCELLS.2007-0576.
 48. Lim DYX, Ng YH, Lee J, Mueller M, Choo AB, Wong VVT. Cytotoxic antibody fragments for eliminating undifferentiated human embryonic stem cells. *J Biotechnol* 153: 77-85, 2011. doi: 10.1016/J.JBIOTECH.2011.03.017.
 49. Tateno H, Onuma Y, Ito Y, Minoshima F, Saito S, Shimizu M, et al. Elimination of tumorigenic human pluripotent stem cells by a recombinant lectin-toxin fusion protein. *Stem Cell Reports* 4: 811-20, 2015. doi: 10.1016/J.STEMCR.2015.02.016.
 50. Ben-David U, Nudel N, Benvenisty N. Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Clau-

- din-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 4, 2013. doi: 10.1038/NCOMMS2992.
51. Park J, Lee NG, Oh M, Song J, Kim W, Kwon MG, et al. Selective elimination of human pluripotent stem cells by Anti-Dsg2 antibody-doxorubicin conjugates. *Biomaterials* 259, 2020. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2020.120265.
 52. Sougawa N, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura A, Yokoyama J, Ito E, et al. Immunologic targeting of CD30 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells, allowing safer clinical application of hiPSC-based cell therapy. *Sci Rep* 8, 2018. doi: 10.1038/S41598-018-21923-8.
 53. Zamarian V, Pellegrini S, Landi E, Manenti F, Schiavoleona M, Citro A, et al. 209.3: Treating iPSC-derived β Cells With Monoclonal Antibody Brentuximab Reduces the Risk of Teratoma Upon Transplantation. *Transplantation* 105: S14, 2021. doi: 10.1097/01.TP.0000804348.54160.6B.
 54. Kimura Y, Shofuda T, Higuchi Y, Nagamori I, Oda M, Nakamori M, et al. Human Genomic Safe Harbors and the Suicide Gene-Based Safeguard System for iPSC-Based Cell Therapy. *Stem Cells Transl Med* 8: 627-38, 2019. doi: 10.1002/SCTM.18-0039.
 55. Qadir MME, Álvarez-Cubela S, Belle K, Sapir T, Messaggio F, Johnson KB, et al. A Double Fail-Safe Approach to Prevent Tumorigenesis and Select Pancreatic β Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 12: 611-23, 2019. doi: 10.1016/J.STEMCR.2019.01.012.
 56. Kiuru M, Boyer JL, O'Connor TP, Crystal RG. Genetic control of wayward pluripotent stem cells and their progeny after transplantation. *Cell Stem Cell* 4: 289-300, 2009. doi: 10.1016/J.STEM.2009.03.010.
 57. Chen F, Cai B, Gao Y, Yuan X, Cheng F, Wang T, et al. Suicide gene-mediated ablation of tumor-initiating mouse pluripotent stem cells. *Biomaterials* 34: 1701-11, 2013. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.11.018.
 58. Hara A, Aoki H, Taguchi A, Niwa M, Yamada Y, Kunisada T, et al. Neuron-like differentiation and selective ablation of undifferentiated embryonic stem cells containing suicide gene with Oct-4 promoter. *Stem Cells Dev* 17: 619-27, 2008. doi: 10.1089/SCD.2007.0235.
 59. Stewart R, Yang C, Anyfantis G, Przyborski S, Hole N, Strachan T, et al. Silencing of the expression of pluripotent driven-reporter genes stably transfected into human pluripotent cells. *Regen Med* 3: 505-22, 2008. doi: 10.2217/17460751.3.4.505.
 60. Naujok O, Kaldrack J, Taivankhuu T, Jörns A, Lenzen S. Selective removal of undifferentiated embryonic stem cells from differentiation cultures through HSV1 thymidine kinase and ganciclovir treatment. *Stem Cell Rev Reports* 6: 450-61, 2010. doi: 10.1007/S12015-010-9148-Z.
 61. Sadelain M, Papapetrou EP, Bushman FD. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer* 12: 51-8, 2011. doi: 10.1038/NRC3179.
 62. Yoshihara M, Murakawa Y. An update on clinical applications of iPSCs from a genomic point of view. *Curr Top IPSCs Technol*: 147-75, 2022. doi: 10.1016/B978-0-323-99892-5.00001-3.
 63. Liu X, Li W, Fu X, Xu Y. The Immunogenicity and Immune Tolerance of Pluripotent Stem Cell Derivatives. *Front Immunol* 8, 2017. doi: 10.3389/FIMMU.2017.00645.
 64. Ryan EE, Paty BW, Senior PA, Shapiro AMJ. Risks and side effects of islet transplantation. *Curr Diab Rep* 4: 304-9, 2004. doi: 10.1007/S11892-004-0083-8.
 65. Desai T, Shea LD. Advances in islet encapsulation technologies. *Nat Rev Drug Discov* 16: 338-50, 2017. doi: 10.1038/NRD.2016.232.
 66. Song S, Roy S. Progress and challenges in macroencapsulation approaches for type 1 diabetes (T1D) treatment: Cells, biomaterials, and devices. *Biotechnol Bioeng* 113: 1381-402, 2016. doi: 10.1002/BIT.25895.
 67. Kumagai-Braesch M, Jacobson S, Mori H, Jia X, Takahashi T, Wernerson A, et al. The TheraCyte™ device protects against islet allograft rejection in immunized hosts. *Cell Transplant* 22: 1137-46, 2013. doi: 10.3727/096368912X657486.
 68. Motté E, Szepessy E, Suenens K, Stangé G, Bomans M, Jacobs-Tulleneers-Thevissen D, et al. Composition and function of macroencapsulated human embryonic stem cell-derived implants: comparison with clinical human islet cell grafts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307: E838-46, 2014. doi: 10.1152/AJPENDO.00219.2014.
 69. Boettler T, Schneider D, Cheng Y, Kadoya K, Brandon EP, Martinson L, et al. Pancreatic Tissue Transplanted in TheraCyte Encapsulation Devices Is Protected and Prevents Hyperglycemia in a Mouse Model of Immune-Mediated Diabetes. *Cell Transplant* 25: 609-14, 2016. doi: 10.3727/096368915X688939.
 70. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210: 908-10, 1980. doi: 10.1126/SCIENCE.6776628.
 71. De Groot M, Schuur TA, Van Schilfgaarde R. Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic

- islet grafts. *J Surg Res* 121: 141-50, 2004. doi: 10.1016/J.JSS.2004.02.018.
72. Ludwig B, Reichel A, Steffen A, Zimmerman B, Schally AV, Block NL, et al. Transplantation of human islets without immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 19054-58, 2013. doi: 10.1073/PNAS.1317561110.
73. Veiseh O, Doloff JC, Ma M, Vegas AJ, Tam HH, Bader AR, et al. Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. *Nat Mater* 14: 643-51, 2015. doi: 10.1038/NMAT4290.
74. Vegas AJ, Veiseh O, Gürtler M, Millman JR, Pagliuca FW, Bader AR, et al. Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. *Nat Med* 22: 306-11, 2016. doi: 10.1038/NM.4030.
75. Mandal PK, Ferreira LMR, Collins R, Meissner TB, Boutwell CL, Friesen M, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* 15: 643-52, 2014. doi: 10.1016/J.STEM.2014.10.004.
76. Mattapally S, Pawlik KM, Fast VG, Zumaquero E, Lund FE, Randall TD, et al. Human Leukocyte Antigen Class I and II Knockout Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cells: Universal Donor for Cell Therapy. *J Am Heart Assoc* 7, 2018. doi: 10.1161/JAHA.118.010239.
77. Yoshihara E, O'Connor C, Gasser E, Wei Z, Oh TG, Tseng TW, et al. Immune-evasive human islet-like organoids ameliorate diabetes. *Nature* 586: 606-11, 2020. doi: 10.1038/S41586-020-2631-Z.
78. Gornalusse GG, Hirata RK, Funk SE, Riobobos L, Lopes VS, Manske G, et al. HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol* 35: 765-72, 2017. doi: 10.1038/NBT.3860.
79. Shi L, Li W, Liu Y, Chen Z, Hui Y, Hao P, et al. Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells via expression of membrane-bound and secreted β 2m-HLA-G fusion proteins. *Stem Cells* 38: 1423-37, 2020. doi: 10.1002/STEM.3269.
80. Han X, Wang M, Duan S, Franco PJ, Kenty JHR, Hedrick P, et al. Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 116: 10441-6, 2019. doi: 10.1073/PNAS.1902566116.
81. Castro-Gutierrez R, Alkanani A, Mathews CE, Michels A, Russ HA. Protecting Stem Cell Derived Pancreatic Beta-Like Cells From Diabetogenic T Cell Recognition. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12, 2021. doi: 10.3389/FENDO.2021.707881.