

il Diabete

Vol. 36, N. 2, luglio 2024



– RASSEGNE

Lo screening del diabete di tipo 1 in Italia, il progetto propedeutico e le implicazioni pratiche

Alimenti e prevenzione delle malattie cardiovascolari

– EDITORIALI

I trigliceridi come fattore di rischio cardiovascolare

– AGGIORNAMENTI IN TEMA DI OBESITÀ

Lipodistrofie: quando magro non è sinonimo di metabolicamente sano

– AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA

Effetti benefici di un nuovo composto omega-3

– JOURNAL CLUB

– MEDICINA TRASLAZIONALE

Medicina rigenerativa e diabete di tipo 1: i progressi della bioingegneria applicati alla sostituzione della funzione beta-cellulare

– AGGIORNAMENTO IN TEMA DI TECNOLOGIE

Smartwatch, activity tracker e salute nella persona con diabete



il Diabete

Organo ufficiale della
Società Italiana di Diabetologia

Direttore Scientifico

Sebastiano Squatrito (Catania)

Co-direttori

Luca D'Onofrio (Roma, YoSID)

Carla Greco (Modena, YoSID)

Gloria Formoso (Chieti)

Lucia Frittitta (Catania)

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)

Responsabili di Redazione

Andrea Tumminia (Catania)

Agostino Milluzzo (Catania)

Rosario Le Moli (Catania)

CONSIGLIO DIRETTIVO SID

Presidente

Angelo Avogaro (Padova)

Presidente Eletto

Raffaella Buzzetti (Roma)

Tesoriere

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

Segretario

Saula Vigili de Kreutzenberg (Padova)

Consiglieri

Gloria Formoso (Chieti)

Mariangela Ghiani (Cagliari)

Luigi Laviola (Bari)

Giuseppe Lepore (Bergamo)

Maria Ida Maiorino (Napoli)

Raffaele Napoli (Napoli)

Andrea Natali (Pisa)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Salvatore Piro (Catania)

Sabrina Prudente (Roma)

Elena Succurro (Catanzaro)

UFFICIO DI PRESIDENZA SID 2022-2024

Angelo Avogaro (Padova)

Agostino Consoli (Chieti)

Raffaella Buzzetti (Roma)

Sommario

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

67 **Lo screening del diabete di tipo 1 in Italia, il progetto propedeutico e le implicazioni pratiche**

Valentina Tiberi, Umberto Agrimi, Riccardo Bonfanti, Emanuele Bosi, Dario Iafusco, Enza Mozzillo, Carlo Ripoli, Antonio D'Avino, Flavia Pricci, Olimpia Vincentini, Marco Silano, Valentino Cherubini

78 **Alimenti e prevenzione delle malattie cardiovascolari**

Olga Vaccaro, Annalisa Giosuè, Marilena Vitale

92 – **EDITORIALI** A CURA DI SEBASTIANO SQUATRITO

I trigliceridi come fattore di rischio cardiovascolare

Mario Luca Morieri

103 – **AGGIORNAMENTI IN TEMA DI OBESITÀ** A CURA DI LUCIA FRITTITTA

Lipodistrofie: quando magro non è sinonimo di metabolicamente sano

Lavinia Palladino, Giovanni Ceccarini, Donatella Gilio, Silvia Magno, Caterina Pelosini, Melania Paoli, Maria Rita Sessa, Ferruccio Santini

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

Effetti benefici di un nuovo composto omega-3

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

121 – **MEDICINA TRASLAZIONALE: APPLICAZIONI CLINICHE DELLA RICERCA DI BASE**

A CURA DI CARLA GRECO E LUCA D'ONOFRIO PER IL GRUPPO YoSID

Medicina rigenerativa e diabete di tipo 1: i progressi della bioingegneria applicati alla sostituzione della funzione beta-cellulare

Cataldo Pignatelli, Alessia Neroni, Francesco Campo, Matteo Monieri, Francesca Servidio, Alessia Nolli, Camilla Teruzzi, Sofia Cochi, Antonio Citro

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

Smartwatch, activity tracker e salute nella persona con diabete

Andrea Di Blasio, Leandro Ditali, Maria Pompea Antonia Baldassarre, Gloria Formoso

il Diabete

Vol. 36, N. 2, luglio 2024

Direzione Scientifica

Sebastiano Squatrito, Catania

Direttore Responsabile

Mattia Righi

Associato all'Unione Stampa Periodica Italiana



Copyright © 2024 SID

Società Italiana di Diabetologia

CC BY 4.0 License

ISBN online 979-12-5477-486-1

ISSN online 1720-8335

DOI 10.30682/ildia2402

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

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.

a cura di Carla Greco¹, Luca D'Onofrio² per il gruppo YoSID

¹Unità di Endocrinologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia; ²Unità di Diabetologia, AOU Policlinico Umberto I di Roma e Sapienza Università di Roma

Medicina rigenerativa e diabete di tipo 1: i progressi della bioingegneria applicati alla sostituzione della funzione beta-cellulare ♦ *Regenerative Medicine and Type 1 Diabetes: progress in the bioengineering of the beta cell replacement*

Cataldo Pignatelli¹, Alessia Neroni^{1,2},
Francesco Campo^{1,2}, Matteo Monieri¹,
Francesca Servidio¹, Alessia Nolli^{1,3},
Camilla Teruzzi², Sofia Cochi¹, Antonio Citro¹

¹Ospedale San Raffaele, Diabetes Research Institute,
IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano;

²Università Vita-Salute San Raffaele, Milano;

³Università degli Studi di Milano-Bicocca,
Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Milano

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2402f>

ABSTRACT

Intrahepatic islet transplantation holds promise for T1D treatment, yet faces challenges like inflammatory storms and graft revascularization delays. Endocrine pancreas bioengineering, especially with encapsulation technologies, aims to recreate vascular and endocrine compartments ex vivo to generate a functional device for successful in vivo application. This review explores the synergy of diverse encapsulation techniques and alternative cell sources in crafting a functional vascularized endocrine scaffold.

KEYWORDS

Type 1 diabetes, vascularized endocrine pancreas, bioengineering, beta cell replacement, biomaterials, regenerative medicine, extracellular matrix.

INTRODUZIONE

Il trapianto di isole pancreatiche è ampiamente considerato una delle alternative clinicamente approvate per curare quei pazienti affetti da diabete di tipo 1 (DMT1) soggetti a eventi severi di ipoglicemia. Sin dai primi anni 2000, con l'introduzione del protocollo di Edmonton, il trapianto di isole è stato notevolmente migliorato sia in termini di efficacia che efficienza (1). Infatti, i risultati clinici raccolti dal CTR (Collaborative Islet Transplant Registry, <https://citregistry.org/>) hanno dimostrato che dopo un anno dall'infusione, circa l'80% dei pazienti raggiunge l'insulino indipendenza, ma tale percentuale si abbassa al 45% dopo 5 anni. Tuttavia, nonostante la diminuzione della funzione, circa il 90% dei riceventi è stato protetto da gravi episodi di ipoglicemia. Ciò ha evidenziato che l'impianto è in grado di esercitare un controllo glicemico non completo ma efficace (emoglobina glicata <7% nel 60% dei soggetti) verso questo tipo di eventi nei 5 anni successivi al trapianto.

La causa principale dell'incapacità delle isole di mantenere un totale controllo glicemico nel lungo periodo è da ricercarsi nella graduale diminuzione della loro massa nel tempo, che porta al decadimento della funzionalità dell'impianto.

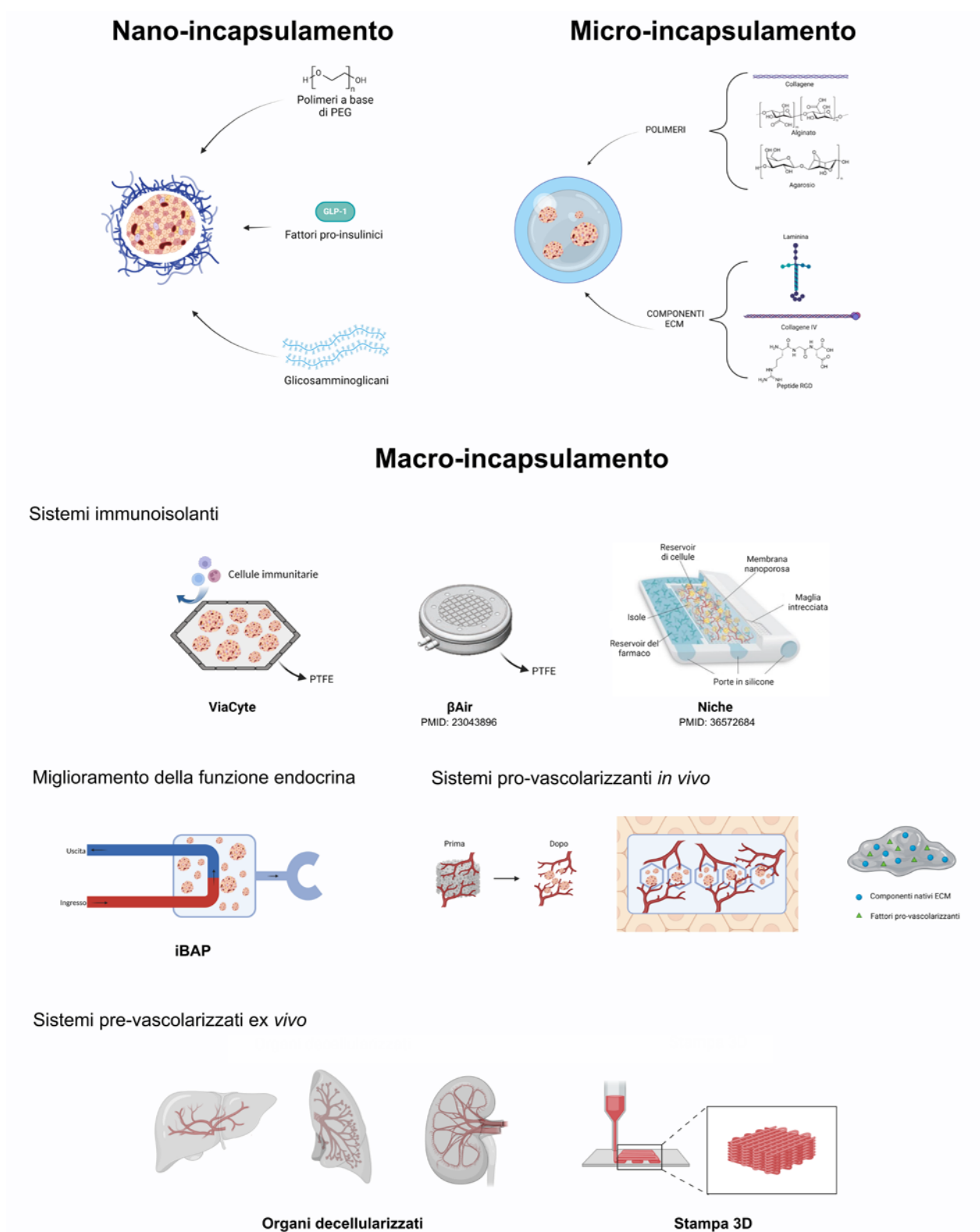
to endocrino pancreatico (3). Questa perdita graduale è dovuta a diversi eventi che avvengono sia durante le prime ore post trapianto che in una fase tardiva a causa di meccanismi immunologici. Infatti, nelle prime ore dopo il trapianto, le isole subiscono una serie di insulti infiammatori, tra cui la reazione infiammatoria mediata dal sangue (IBMIR) che causa la perdita di circa il 50%-70% della massa totale di isole pancreatiche trapiantate. Inoltre, l'infusione delle isole può danneggiare il parenchima epatico, aggravando ulteriormente lo stato infiammatorio del sito epatico e compromettendo l'attecchimento delle isole (4-5). In aggiunta a questo, le isole sono soggette a una fase avascolare dovuta al ritardo della ri-vascolarizzazione, esponendole a stress ipossico e carenza di nutrienti per circa due settimane dopo il trapianto, causando morte cellulare e apoptosi (6). Attualmente, per compensare la perdita di isole perse in seguito a questi eventi avversi, diminuendo l'efficienza di attecchimento, si ricorre all'infusione di un elevato numero di isole pancreatiche, solitamente pari ad almeno 10.000 isole equivalenti (IEQ)/kg, ottenuti da almeno due donatori di pancreas, aumentando, di conseguenza, anche la richiesta complessiva di organi (1, 7). Infine, in una fase più avanzata, le isole diventano bersaglio dell'immunità innata e adattativa, responsabile del rigetto, e della riattivazione dei fenomeni di autoimmunità legati al DM1. Pertanto, i pazienti che ricevono una infusione di isole devono essere sottoposti ad un trattamento immunosoppressivo per tutta la vita per prevenire il rigetto della massa insulare infusa (8-10). Tuttavia, questi trattamenti, sebbene specifici per la deplezione delle cellule T CD8, non eliminano completamente le cellule T CD4 della memoria, spiegando la recidiva causata da fenomeni autoimmuni (11-12). Inoltre, la somministrazione cronica di farmaci immunosoppressivi (es. tacrolimus e sirolimus) può causare diversi effetti collaterali risultando anche tossici per le stesse cellule beta (13).

Nonostante i limiti che si riscontrano durante la procedura di trapianto di isole, essa ha la potenzialità di ripristinare il controllo fisiologico dell'omeostasi del glucosio, cosa che la sola insulina esogena non riesce a mimare completamente. A tal proposito, numerosi studi stanno cercando di mitigare tutte le problematiche relative alla procedura attualmente utilizzata in clinica. Idealmente, una strategia definitiva per la risoluzione di queste problematiche deve mirare a 1) ridurre la perdita di isole durante il trapianto; 2) favorire il loro attecchimento e funzionalità e 3) ridurre l'uso dei farmaci immunosoppressori. Oltre a questo, la strategia ideale deve poter garantire anche il monitoraggio dell'impianto. Inizialmente, si è cercato di individuare altri siti di impianto adatti ad accogliere le isole. Diversi sono stati i siti oggetto di studio in trial clinici, tuttavia, ad oggi, non si è ancora trovata un'alternativa che porti a risultati migliori rispetto al sito di trapianto intraepatico di isole. Per questo motivo il fegato resta, comunque il sito di elezione nella pratica clinica (14). Sebbene, nell'organismo umano, non vi sia un sito di impianto con un microambiente più favorevole rispetto al fegato, alcuni studi hanno ipotizzato che sarebbe preferibile ricreare un microambiente ex novo attraverso le nuove tecniche di ingegneria tissutale. Bioingegnerizzare un tessuto endocrino dà la possibilità di ricreare un ambiente più favorevole alle cellule endocrine che devono essere impiantate (14). I due principali approcci di bioingegneria includono strategie che considerano di incapsulare le isole in sistemi immuno-protettivi o in dispositivi in grado di supportare la ri-vascularizzazione dopo il trapianto. A seconda del metodo di incapsulamento, i dispositivi sono suddivisi in nano-, micro- e macro-incapsulamento (15-16).

STRATEGIE DI NANO-INCAPSULAMENTO

Nano-incapsulare i cluster di cellule endocrine consiste nell'applicazione di un sottile strato polimerico, nell'ordine dei nanometri, sulla loro superficie con l'obiettivo di proteggere la componente cellulare dal sistema immunitario del paziente (17-19). I nano-rivestimenti consentono di trapiantare volumi ridotti di materiale cellulare e da un punto di vista biologico permettono un facile scambio di ormoni, nutrienti ed ossigeno grazie alle ridotte dimensioni del rivestimento (17). I polimeri utilizzati in questo ambito sono principalmente a base di poli-etilen-glicole (PEG) o suoi derivati, polisaccaridi cationici o anionici, come chitosano e alginato, oppure materiali zwitterionici (18, 20-22) i quali hanno mostrato di abbattere la formazione di fibrosi dell'impianto (18, 23). Questi materiali, pur non essendo biologicamente attivi, sono biocompatibili e possiedono una buona resistenza e durabilità nel tempo (16). Il vantaggio di nano-incapsulare i cluster di cellule endocrine porta ad avere un rivestimento di spessore fisso, indipendentemen-

Figura 1 ♦ I sistemi di incapsulamento che ad oggi sono stati utilizzati per migliorare la sostituzione della funzione beta-cellulare



La figura illustra i tre principali approcci di incapsulamento:

le strategie di **nano-incapsulamento** consistono nel rivestire la componente endocrina, racchiudendola in uno strato di dimensioni nanometriche, offrendo protezione immunitaria e un'elevata superficie di scambio di nutrienti. Il rivestimento è per lo più

costituito da materiali sintetici, a cui vengono aggiunti componenti pro-insulinici o derivati da componenti nativi della matrice extra-cellulare (ECM).

Le strategie di **micro-incapsulamento** impiegano microcapsule, tipicamente a base di alginato, per incapsulare uno o più cluster di cellule, migliorando la biocompatibilità e la permeabilità selettiva. Dal momento che l'alginato è un materiale inerte, alla formulazione polimerica delle microcapsule vengono aggiunti componenti che si trovano nella ECM, in modo da aumentare la funzionalità della componente endocrina incapsulata.

I sistemi di **macro-incapsulamento** utilizzano dispositivi più grandi, capaci di incapsulare una massa insulare più grande e sono più facili da rimuovere in caso di problemi correlati all'impianto stesso. Questi dispositivi possono essere di diversa natura a seconda dello scopo per cui sono progettati. I **sistemi immuno-isolanti** sono delle camere a membrana che limitano l'accesso a cellule e molecole del sistema immunitario, ma permettono il passaggio di nutrienti, ossigeno ed ormoni per diffusione. Uno di questi è stato integrato con sistemi di rilascio di ossigeno nella camera contenenti le cellule per limitare la carenza di ossigeno (β Air). Un altro dispositivo (NICHE) è stato progettato per rilasciare farmaci immunosoppressori a livello topico. I **sistemi progettati per migliorare la funzionalità endocrina** (sistemi intravascolari di pancreas bioartificiale, iBAP) e per migliorare l'attecchimento (pro-vascolarizzanti e pre-vascolarizzati) hanno lo scopo di ripristinare la connessione con la rete vascolare dell'ospite. iBAP tendono a limitarsi a collegare alla rete vascolare la componente endocrina al flusso sanguigno, senza che queste vengano direttamente a contatto con la parte cellulare di esso, ma solo con il plasma. I secondi, tendono a ripristinare una rete vascolare, in grado di riprodurre l'organizzazione della nicchia endocrina nativa. I **sistemi provascolarizzanti** tendono a modellare il sito di trapianto con diverse strategie. I **sistemi pre-vascolarizzati**, invece, ricreano de novo un tessuto bioingegnerizzato vascolarizzato endocrino ex vivo, grazie all'utilizzo di supporti composti da materiali altamente organizzati tridimensionalmente basati sulla ECM, permettendo l'attecchimento ex vivo della componente endocrina. Ciò favorisce una rapida integrazione del sistema prevascolarizzato con la rete vascolare del ricevente, che permette di rilevare dopo pochi giorni dal trapianto la funzione dell'impianto.

Tabella 1 ♦ Vantaggi e svantaggi dei sistemi di incapsulamento

Strategia di incapsulamento	Vantaggi	Svantaggi
Nano-incapsulamento	- Volume da trapiantare ridotto - Adatto a diversi siti di impianto - Ridotta distanza per diffusione - Possibilità di introdurre componenti nativi per migliorare la vitalità e funzione endocrina	- Stabilità dei materiali a lungo termine - Rischio di coating incompleto - Difficoltà del recupero degli impianti - Vitalità dipendente dalla diffusione di ossigeno
Micro-incapsulamento	- Migliore diffusione rispetto ai sistemi macro-incapsulanti - Possibilità di introdurre componenti nativi per migliorare la vitalità e funzione endocrina - Possibilità di permettere il rilascio di immunosoppressivi dalla capsula - Una microcapsula danneggiata non compromette l'intero trapianto	- Stabilità dei materiali a lungo termine - Tecniche di produzione non ancora standardizzate - Aggregazione delle microcapsule - Difficoltà del recupero degli impianti - Vitalità dipendente dalla diffusione di ossigeno - Fibrosi
<i>Immuno-protettivi</i>	- Protezione fisica della componente endocrina - Buona stabilità dei materiali - No immunosoppressione - Facilmente recuperabile - Integrabile con sistemi di rilascio topico di immunosoppressivi	- Minima massa trapiantabile - Alto rischio di ipossia - Ostacola la formazione di vasi sanguigni e permettere l'attecchimento - Fibrosi - Il danneggiamento della macrocapsula compromette l'intero impianto
<i>Aumento funzione cellule β</i>	- Anastomosi con sistema vascolare - Buona stabilità dei materiali - No immunosoppressione	- Necessità di intervento di anastomosi per l'impianto - Formazione di trombi e coagula - Sistemi di filtrazione del sangue rallenta il <i>sensing</i> del glucosio
Macro-incapsulamento		
<i>Pro-vascolarizzante in vivo</i>	- Buona stabilità dei materiali - Facilmente recuperabile - Possibilità di rivascularizzare l'impianto endocrino (7-14 giorni) - Possibilità di introdurre componenti native o cellule proangiogeniche per migliorare la rivascularizzazione, la vitalità e la funzione endocrina - Assenza di fibrosi	- Minima massa trapiantabile - Necessità di immunosoppressione sistemica o locale - Fase avascolare ancora presente
<i>Pre-vascolarizzati ex vivo</i>	- Materiali nativi - Ricrea ex vivo la vascolarizzazione - Fase avascolare ridotta o quasi assente - Ricrea l'architettura nativa - Attecchimento ex vivo - Assenza di fibrosi - Possibilità di introdurre componenti native o cellule proangiogeniche per migliorare la rivascularizzazione, la vitalità e la funzione endocrina	- Necessità di immunosoppressione sistemica o locale - Standardizzazione dei processi di produzione e su larga scala

te dalle dimensioni dell'isola (20). I polimeri che costituiscono la capsula nanometrica possono essere funzionalizzati con fattori pro-insulinici (come il glucagon-like peptide 1, GLP1) (24-26), proteine, sequenze peptidiche o glicosaminoglicani presenti a livello nativo nella matrice extracellulare (ECM) (26-29) per supportare la vitalità e funzionalità delle cellule (16-30) (Fig. 1). L'uso di nano-rivestimenti tuttavia presenta degli svantaggi, tra cui il non completo rivestimento della superficie di ogni cluster endocrino che accenderebbe la risposta immunitaria verso l'impianto (31). In aggiunta, date le ridotte dimensioni dei cluster nano-incapsulati, essi risultano difficili da recuperare qualora insorgessero complicanze legate all'impianto (16, 31). Di conseguenza, questa strategia non è ancora usata nella pratica clinica (Tab. 1). Tuttavia, in uno studio clinico (NCT00260234) 16000IEQ/kg isole umane sono state incapsulate mediante un nano-rivestimento di PEG e trapiantate nel sottocute di due riceventi (16000IEQ/kg) in assenza di terapia immunosoppressiva. Sebbene, i riceventi non abbiano raggiunto l'indipendenza insulinica dopo quattro mesi dal trapianto, è stata registrata una diminuzione del numero di eventi iperglicemici e ipoglicemici, dimostrando la parziale sopravvivenza della massa insulare ad un eventuale risposta allogenica. Tuttavia, a causa dei livelli di C-peptide insoddisfacenti lo studio è stato interrotto (31-32).

STRATEGIE DI MICRO-INCAPSULAMENTO

Il micro-incapsulamento consente di racchiudere singole o piccole quantità di cellule endocrine all'interno di microcapsule realizzate con polimeri sotto forma di idrogeli aventi diametri compresi tra 100 e 1000 μm (17, 32). Tuttavia, le dimensioni delle microcapsule devono essere attentamente controllate poiché diametri superiori a 400 μm possono compromettere la vitalità e la funzionalità delle cellule endocrine a causa della limitata diffusione di ossigeno e nutrienti all'interno della capsula (33-34). Inoltre, i materiali utilizzati possono indurre la formazione di tessuto fibrotico attorno al dispositivo, limitando ulteriormente la sopravvivenza cellulare a causa della limitata diffusione di nutrienti (35). Una delle più importanti preoccupazioni in merito a questa tecnologia riguarda la durata nel tempo dei materiali utilizzati nelle microcapsule e la necessità di sviluppare metodi per il tracciamento e il recupero delle stesse una volta nel corpo dell'ospite. In aggiunta, l'incapsulamento incompleto rappresenta uno dei più grandi rischi, in quanto esporrebbe le cellule impiantate al sistema immunitario ospite con conseguente attivazione dei meccanismi di infiammazione e rigetto (36-37). Un'altra sfida riguarda l'omogeneità del prodotto finale. Infatti, diverse esperienze riportano come uno svantaggio della metodica, l'incapacità di controllare finemente il numero di cluster di cellule che possono essere contenuti in una capsula (Tab. 1).

I biomateriali utilizzati per la fabbricazione delle microcapsule includono collagene, agarosio, chitosano, gelatina e alginato (17, 38-41). Tra questi, l'alginato è il materiale più comunemente utilizzato poiché, relativamente economico, biologicamente inerte e facilita, durante la fase di produzione, la generazione di microcapsule in condizioni fisiologiche. Tuttavia, l'alginato non è sufficientemente selettivo in termini di permeabilità alle molecole o alle cellule, aumentando così il rischio di danni alle cellule incapsulate da parte del sistema immunitario o di altri fattori che possono attraversare la capsula (31, 42). Per migliorare la stabilità meccanica e la capacità di isolamento immunitario dell'alginato, quest'ultimo è stato utilizzato in combinazione a polimeri (42). Tali rivestimenti sintetici, però, possono compromettere la biocompatibilità delle microcapsule di alginato, aumentando il rischio di fibrosi (31, 43-45). Alla luce di ciò, per limitare la formazione di una capsula fibrotica, sono state percorse due strategie. La prima consiste nell'aggiunta di composti immunosoppressivi come il desametasone o modificando il rivestimento con il recettore Toll 2 al fine di ridurre la reazione immunitaria contro la capsula (40, 46). Il secondo consiste, invece, nel combinare l'alginato con polimeri e molecole presenti nella ECM, come collagene di tipo IV, laminina 5 o peptide RGD (37, 47-52). L'aggiunta di materiale nativo della ECM ha dimostrato che con il diminuire dello stress infiammatorio, veniva limitata l'intensità del processo fibrotico. Inoltre, è stata notata una aumentata vitalità e funzionalità delle isole in vivo in modelli preclinici diabetici in assenza di terapia immunosoppressiva ad un anno dall'impianto (50-51) (Fig. 1).

Tuttavia, volgendo lo sguardo all'applicabilità clinica, un grosso ostacolo è implementare i metodi di produzione delle microcapsule su larga scala ed ottenere sistemi incapsulanti clinicamente rilevanti. Gli attuali metodi di produzione

richiedono tempi prolungati di produzione che potrebbero compromettere la vitalità delle cellule endocrine incapsulate, portando a stress ipossico e quindi alla perdita di funzionalità e vitalità delle stesse (16). Recentemente, grazie allo sviluppo delle tecniche di produzione di emulsioni utilizzando sistemi microfluidici o basati su fenomeni di elettro-idrodinamica, è stato dimostrato come sia possibile produrre microcapsule uniformi in dimensioni, con maggiore riproducibilità, scalabilità e capacità di produzione in serie (53-57). Tuttavia, dato il recente sviluppo di questa tecnologia, ulteriori studi sono necessari per valutare attentamente la compatibilità delle cellule con questi nuove metodologie di produzione (15).

Nonostante queste problematiche, sono stati condotti degli studi clinici per valutare la sicurezza ed efficacia del trapianto intraperitoneale di isole micro-incapsulate in pazienti con DM1, mostrando risultati eterogenei (58-62) (NCT00940173). Sebbene gli studi preclinici avessero fornito risultati promettenti, gli esiti di questi primi test sull'uomo sono stati meno consistenti. Infatti, nonostante la presenza di C-peptide, nessun paziente ha raggiunto l'indipendenza insulinica (8, 16). Il principale motivo di fallimento è stato l'aggregazione delle microcapsule nel sito di impianto e la formazione di fibrosi intorno ad esse, che ha aumentato il rischio di ipossia e attivazione del sistema immunitario dell'ospite (16, 58-60). Per superare queste difficoltà, le future strategie di incapsulamento dovranno concentrarsi sulla generazione di microcapsule che favoriscano una rapida vascolarizzazione e controllino il processo fibrotico, integrando materiali derivanti dall'ambiente nativo. Inoltre, sarà essenziale sviluppare tecniche di produzione su larga scala compatibili con la vitalità delle cellule endocrine.

STRATEGIE DI MACRO-INCAPSULAMENTO

I sistemi macro-incapsulanti consentono di incorporare una grossa massa insulare (da 100 a 100.000 isole pancreatiche) (16). Uno dei loro principali vantaggi è che permettono il facile recupero dell'impianto in caso di suo esaurimento funzionale o complicazioni legato ad esso. Nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi dispositivi di questo tipo che si suddividono in base alla loro funzione finale: essi, infatti, possono essere progettati per immuno-proteggere le cellule incapsulate oppure possono migliorare il processo di rivascolarizzazione dell'impianto nel sito di trapianto (14).

Sistemi macro-incapsulanti immuno-protettivi

I sistemi macro-incapsulanti immuno-isolanti prevedono, in genere, la presenza di una barriera immuno-protettiva semipermeabile (Fig. 1). Essa deve limitare il passaggio di macro-proteine, come gli anticorpi, e cellule del sistema immunitario dell'ospite; allo stesso tempo, deve permettere la diffusione di nutrienti, ossigeno ed ormoni e consentire alle cellule endocrine di svolgere la loro funzione mediante il rilascio di insulina in relazione alla concentrazione sistemica di glucosio (14, 63). In questo modo, questi sistemi nascondono fisicamente le cellule allogene al sistema immunitario del ricevente. Viacyte è stata una delle prime aziende che ha proposto in un trial clinico (NCT02239354) il macro-dispositivo sintetico chiamato VC-01, capace di incapsulare cluster di cellule derivate da cellule staminali embrionali in un doppio strato di membrana semipermeabile in politetrafluoroetilene (PTFE) (64). Tuttavia, il trial è stato sospeso sia a causa di una bassa sopravvivenza delle cellule endocrine all'interno, sia per il mancato attecchimento del dispositivo dovuto alla formazione di fibrosi intorno all'impianto, che ostruiva la membrana e limitava lo scambio di di ossigeno e nutrienti. Dato il fallimento del primo trial, un secondo trial (NCT03163511) è stato avviato usando una seconda versione del dispositivo VC-02, privo di membrana immuno-protettiva e permissiva alla vascolarizzazione, essenzialmente per indagare se il dispositivo fosse capace di sostenere la produzione di C-peptide (65-66).

Altri dispositivi come il sistema Encellin cell encapsulation (67-68) (CED) e MailPan (69) sono stati progettati con lo stesso concetto ma fabbricati in maniera differente. Il CED è composto da una sottile pellicola nanoporosa di policaprolattone (PCL). In studi preclinici CED ha mostrato di supportare la sopravvivenza delle cellule incapsulate per 90 giorni, con una limitata formazione di fibrosi e una rapida rivascolarizzazione (67-68). Il MailPan, progettato da Defymed, è stato sviluppato per accogliere isole pancreatiche tra due membrane in poliestere per prevenire l'ingresso delle cellule immunitarie nel dispositivo, consentendo al contempo la diffusione di ossigeno, nutrienti, glucosio e insulina. In stu-

di preclinici, il MailPan ha mostrato di avere un buon grado di ossigenazione, con un guadagno di funzione che però si è presentato solo dopo 2 mesi dall'impianto (69).

Tuttavia, nonostante la protezione fisica garantita alle isole dal dispositivo, la loro elevata densità all'interno può portare alla morte cellulare a causa della formazione di un gradiente ipossico (70). Inoltre, la maggior parte dei biomateriali peggiorano questo aspetto poiché spesso inducono una risposta immunitaria fibrotica in cui l'impianto è gradualmente coperto da uno strato di tessuto fibroso connettivo, aumentando la distanza di diffusione per ossigeno e nutrienti verso le isole incapsulate, così come è avvenuto nel caso del VC-01 (64, 70). Tuttavia, la possibilità di recupero dei dispositivi di macro-incapsulamento li rende particolarmente interessanti, specialmente nel caso di cellule beta derivanti da cellule staminali (SC), che attualmente si ritiene abbiano un potenziale staminale elevato in grado, qualora non controllato, di sviluppare potenziali formazioni neoplastiche (71).

Per aggirare il problema della carenza di ossigeno all'interno dei dispositivi macro-incapsulanti, l'azienda O2 aveva sviluppato il dispositivo β Air, in grado di fornire ossigeno molecolare alle isole incapsulate (72-73) (Fig. 1). Questo è costituito da tre componenti principali: uno strato di un idrogel di alginato contenente isole, una camera per rilasciare l'ossigeno, con portelli di ingresso e uscita, e una membrana di PTFE spessa 25 μ m che separa lo strato di alginato dal tessuto ospite (73) (Fig. 1). Il dispositivo, impiantato nel sottocute di un paziente affetto da DM1, è stato testato in uno studio clinico (NCT02064309), dimostrando che il sistema è in grado di sostenere la vitalità e la funzione delle isole per 10 mesi, con una modesta riduzione dell'apporto di insulina esogena. Tuttavia, lo scambio di nutrienti o ormoni avveniva sempre per fenomeni diffusivi, non garantendo una risposta immediata da parte delle isole incapsulate (74-75). Le recenti strategie di macro-incapsulamento, come il dispositivo TRAFFIC (76) (Thread-Reinforced Alginate Fiber For Islets enCapsulation) e la sua più recente evoluzione NICE (77) (Nanofiber-Integrated Cell Encapsulation), hanno dimostrato promettenti risultati nell'ambito del trapianto di isole pancreatiche per il trattamento del diabete. Utilizzando idrogeli rinforzati con fibre sintetiche, questi dispositivi offrono una maggiore stabilità meccanica, che è cruciale soprattutto durante il processo di impianto e recupero. Il dispositivo NICE, in particolare, è composto all'interno da un idrogel di alginato contenente le cellule endocrine e presenta un rivestimento esterno poroso composto da nanofibre. Il sistema ha dimostrato una notevole efficacia nel ripristinare la normoglicemia fino a 200 giorni in modelli preclinici diabetici immuno-competenti (77). Tuttavia, ci sono alcune sfide da affrontare. Ad esempio, la densità di cellule endocrine che possono essere inserite nel dispositivo è relativamente bassa, il che significa che per ottenere un numero sufficiente di aggregati di cellule staminali, il dispositivo deve essere estremamente lungo. Nel caso di 300.000 aggregati di cellule staminali, il dispositivo NICE potrebbe superare i 20 metri di lunghezza, rendendolo clinicamente impegnativo da impiantare e potenzialmente suscettibile a complicazioni come aderenze diffuse o restrizioni degli organi. Gli studi futuri, soprattutto su animali diabetici di grandi dimensioni, saranno cruciali per valutare l'idoneità clinica di questi dispositivi e comprendere meglio le sfide pratiche associate al loro utilizzo su larga scala (16).

Un sistema differente che cerca di risolvere il problema di immuno-proteggere le isole è quello sviluppato dal lavoro di Paez-Mayorga et al. (78) (Fig. 1). Il dispositivo, chiamato NICHE, è composto da una camera centrale chiusa superiormente e inferiormente da una coppia di griglie, la prima aventi aperture di 300 μ m, l'altra di 100 μ m, progettata per accogliere le cellule. Su 3 dei lati della camera vi è un reservoir chiuso ma in contatto attraverso una membrana semi-permeabile (avente pori di 100nm) solo con la camera interna in cui vengono alloggiare le cellule. L'ultimo lato ha tre fori: uno centrale comunicante con la camera contenente le cellule, gli altri due comunicanti con il reservoir. Inizialmente il sistema è stato riempito con un idrogel di pluronic F127 caricato di cellule mesenchimali staminali (MSC), ed impiantato in modo da permettere e facilitare l'angiogenesi all'interno della camera stessa. Successivamente le isole possono essere impiantate a più ripetizioni nella camera centrale. Il reservoir esterno viene quindi caricato con composti immunosoppressori, che vengono rilasciati in maniera dipendente dalla porosità verso la camera con le la componente endocrina. Il sistema NICHE pre-vascularizzato ha mostrato di sostenere la vitalità e la funzionalità della componente endocrina caricata due volte nella camera centrale, raggiungendo un efficace controllo glicemico entro 40 giorni e mantenendolo per 150 giorni, in modelli preclinici diabetici immunocompetenti (78). Lo sviluppo di questo dispositivo deriva dalle esperienze ottenute dai dispositivi immunoisolanti "puri", i quali isolavano fisicamente la

componente endocrina, nascondendola al sistema immunitario del ricevente. In questo lavoro invece, si è optato di tenere aperto il dispositivo ed inibire il sistema immunitario localmente rilasciando molecole immunosoppressorie. Tuttavia, la funzione endocrina è stata osservata solo dopo 40 giorni negli studi preclinici, dimostrando come il processo di rivascolarizzazione della componente endocrina sia lento, e rischi di mettere sotto stress ipossico le cellule, inducendo una perdita di funzione. Difatti, nel lavoro, per ovviare a ciò, viene effettuata una successiva infusione di cellule endocrine 30 giorni dopo la prima (78). Seguendo la stessa linea, i sistemi macro-incapsulanti che si stanno più largamente sviluppando negli ultimi anni, sono quelli che cercano di aumentare la rivascolarizzazione dell'impianto endocrino per aumentare l'efficienza di attecchimento delle isole, e diminuire il ritardo di guadagno di funzione (14).

Sistemi macro-incapsulanti per migliorare la funzionalità endocrina

Sebbene i sistemi immuno-isolanti abbiano il potenziale di ridurre gli effetti collaterali degli immunosoppressori, essi limitano l'integrazione delle isole con il tessuto ospite, compromettendo la vitalità e la funzione delle cellule endocrine incapsulate. Per questo motivo sono stati sviluppati e proposti altri sistemi macro-incapsulanti con l'obiettivo di migliorare l'efficienza di integrazione delle cellule endocrine con il sistema vascolare ospite, favorendone l'anastomosi e quindi la funzione dell'impianto.

Tra questi, inizialmente erano stati proposti i sistemi intravascolari di pancreas bioartificiale (iBAPs), concepiti per fornire un ambiente vascolarizzato alle cellule endocrine, prevenendo la necrosi delle isole e riducendo il ritardo nella risposta insulinica, problema spesso riscontrato con altre strategie di macro-incapsulamento (79-81) (Fig. 1). Inizialmente, iBAPs erano anastomizzati con un'arteria e/o una vena, con le isole separate dal flusso sanguigno mediante una membrana porosa che filtrava il sangue, permettendo il passaggio solo di ossigeno e nutrienti (79). Tuttavia, tali approcci hanno incontrato difficoltà a causa della necessità di interventi chirurgici per il posizionamento di shunt vascolari e della predisposizione ad eventi trombotici sia nel sito di anastomosi che nel punto di giunzione con l'impianto (79-80, 82-83) (Tab. 1). I recenti progressi tecnologici hanno permesso la generazione di membrane nanoporose al silicio (SNM), favorendo lo sviluppo di iBAP basati su SNM che hanno dimostrato di sostenere in vitro una vitalità delle isole relativamente elevata e consentire una rapida risposta insulinica utilizzando una densità di isole clinicamente significativa (81). Uno studio condotto su suini ha confermato che il trapianto di isole con un dispositivo iBAP basato su SNM ha portato ad una buona vitalità delle isole, con livelli di C-peptide rilevabili. Questi risultati indicano che i dispositivi iBAP potrebbero essere ulteriormente ingranditi e testati in modelli animali di dimensioni maggiori (81).

Sistemi macro-incapsulanti pro-vascolarizzanti in vivo

Tra i sistemi macro-incapsulanti si possono anche inserire quelli progettati per migliorare l'attecchimento, favorendo la rivascolarizzazione delle cellule endocrine (14-15). Questo tipo di sistemi sono progettati in modo che il microambiente in cui vengono impiantati, possa interagire con essi in modo da promuovere un rimodellamento vascolare atto a supportare la vitalità e la funzionalità della componente cellulare veicolata (63, 84-85). Più nello specifico, con questi sistemi, non ci si limita ad "incapsulare" in maniera passiva la componente cellulare, ma soprattutto si cerca di conferire alle cellule endocrine da trapiantare il miglior ambiente possibile per aumentare l'efficienza di attecchimento, migliorando la loro funzione e limitandone la perdita (14-15). Questa idea si basa sulla necessità di fornire alla componente endocrina una fitta rete vascolare, in modo da permettere ad essa di integrarsi con la circolazione sistemica del ricevente e controllare fisiologicamente l'omeostasi del glucosio (84). Difatti, a livello nativo, la nicchia endocrina è composta, oltre che dalla componente endocrina, anche da una componente vascolare, caratterizzata da una fitta rete di capillari, e dalla componente strutturale basata su matrice extracellulare che conferisce al microambiente endocrino una architettura e struttura che ne permette il corretto funzionamento (14). Al momento della digestione del pancreas e del conseguente isolamento delle isole questa organizzazione viene persa insieme al supporto nutritivo e di ossigeno dato dal flusso sanguigno. Pertanto, le isole una volta isolate, sono sottoposte ad un periodo di ipossia che dura fintantoché esse non vengono nuovamente interconnesse in maniera funzionale ad una rete vascolare (14). Un si-

stema macro-incapsulante che è stato progettato per ottenere una tasca sottocutanea iper-vascolarizzata per poter impiantarci la componente endocrina è Cell Pouch ideato da Sernova, che è stato anche testato in uno studio clinico (14, 86) (NCT03513939) (Fig. 1). Esso permette la vascolarizzazione in vivo nel sottocute dei riceventi, in modo da fornire alle cellule un microambiente vascolarizzato. La componente endocrina, in questo caso isole umane, è micro-incapsulata in sfere polimeriche. I pazienti che hanno ricevuto il trapianto di isole pancreatiche nei Cell Pouch, hanno raggiunto l'insulino indipendenza per un periodo fino a tre anni. Da sottolineare che, in una fase successiva durante la sperimentazione, essi hanno dovuto ricevere altre due infusioni di isole pancreatiche, sia nel Cell Pouch, sia un'infusione intraportale con un numero marginale di isole. In futuro, è stato annunciato che verranno utilizzate cellule beta derivate da SC per poter avviare un altro studio clinico (14, 86).

Il processo di vascolarizzazione indotto da questi sistemi è una conseguenza della risposta da corpo estraneo, ma senza che si arrivi alla formazione di un tessuto cicatriziale. Difatti, attorno al materiale si forma una tasca iper-vascolarizzata che idealmente può aumentare la probabilità di attecchimento delle isole posizionate all'interno di essa. Tuttavia, questi dispositivi non sono progettati per guidare la rivascolarizzazione anche da un punto di vista strutturale. Pertanto, a causa del mancato controllo strutturale di rivascolarizzazione, la formazione di nuovi vasi si può definire passiva e non organizzata (14).

Per migliorare la vascolarizzazione in vivo, uno studio clinico ha utilizzato il dispositivo BioHub, un sistema formato da un gel di fibrina, che a livello nativo è coinvolta nella formazione di vasi, e limita gli eventi fibrotici (Fig. 1). Dopo aver ottenuto risultati promettenti nei modelli preclinici su piccoli animali e primati, è stato condotto uno studio clinico (NCT02213003). Tuttavia, nonostante si fosse rilevata una funzione, si è osservato nel lungo periodo una graduale perdita. Gli autori attribuiscono la perdita di indipendenza insulinica nel tempo al cambio nel regime immunosoppressivo, passando dall'uso di tacrolimus alla somministrazione di sirolimus (86-88). Inoltre, seppur una efficace vascolarizzazione fosse avvenuta, questo approccio, non ha permesso di riprodurre la formazione di una rete vascolare altamente organizzata, che rispecchiasse quella della nicchia endocrina.

Per fare in modo di ottenere una rivascolarizzazione più organizzata, alcuni studi hanno cercato di sviluppare dei sistemi macro-incapsulanti generati sia con materiali sintetici che naturali, in grado di rilasciare, una volta impiantati, fattori di crescita oppure pro-angiogenici al fine di stimolare una rivascolarizzazione mimando i processi fisiologici (63) (Fig. 1). Diversi studi hanno valutato l'uso di fattori di crescita come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), l'angiopoietina-1 e 2 (Ang1 e Ang2), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)-BB e il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF)-2. Il rilascio controllato e sostenuto di questi fattori, da parte dei sistemi macro-incapsulanti, ha dimostrato essere più efficace rispetto alla somministrazione sistemica degli stessi sia da soli che in combinazione. Ad esempio, il rilascio sostenuto di VEGF da diverse tipologie di dispositivi ha sempre portato ad un miglioramento dell'attecchimento delle isole pancreatiche, grazie alla formazione di nuovi capillari (89-93). In alternativa, il rilascio sequenziale di diversi fattori pro-angiogenici ha anche dimostrato di favorire una maggiore maturazione dei vasi sanguigni rispetto al trattamento con un solo fattore di crescita (94).

Altri tentativi per ottenere una rivascolarizzazione fisiologica, integravano diversi tipi di cellule che potessero sia indurre sia partecipare direttamente ai processi angiogenici. Tra queste, MSC, fibroblasti e cellule endoteliali, come quelle derivate da cordone ombelicale (HUVEC) sono state utilizzate in sistemi macro-incapsulanti basati su componenti della ECM. MSC e/o fibroblasti incapsulati in un idrogel di collagene e fibrina impiantato in topi diabetici dimostrava il loro ruolo nel promuovere una maggiore vascolarizzazione, inducendo un rapido guadagno di funzione e un miglior controllo della omeostasi del glucosio rispetto alle isole trapiantate singolarmente (95). Allo stesso modo, le HUVEC e le isole di ratto incorporate in idrogeli di collagene di tipo I hanno dimostrato di ripristinare la normoglicemia entro 8 giorni, mostrando una maggiore presenza di cellule endoteliali e macrofagi con fenotipo pro-angiogenico (M2) rispetto a quando le isole venivano trapiantate senza idrogel e HUVEC (96-97).

Questi sistemi, tuttavia, non considerano l'aspetto strutturale della nicchia endocrina (Tab. 1). Difatti, nonostante si cerchi di ricreare il processo di rivascolarizzazione in maniera fisiologica aggiungendo componenti native (fattori di crescita e/o cellule), esso non è completamente controllato e la generazione dei nuovi vasi avviene in maniera rando-

mica e non organizzata, allungando i tempi di attecchimento. Questo aspetto si ripercuote sull'allungamento delle tempistiche per il raggiungimento della normoglicemia oppure provoca l'assenza di funzione dell'impianto. Difatti, ciò comporta la perdita di componente endocrina nel periodo che va dal trapianto del sistema e il consolidarsi di una rete vascolare, impattando negativamente sulla funzione a lungo termine dell'impianto.

Sistemi macro-incapsulanti pre-vascolarizzati ex-vivo

Una nuova strategia che recentemente ha preso piede è quella di ricreare ex vivo un tessuto bioingegnerizzato vascolarizzato endocrino. Il vantaggio di utilizzare questi sistemi è quello di fornire alla componente endocrina un sistema pre-vascolarizzato prima del trapianto simile alla nicchia insulare che permetta di 1) aggirare gli eventi immunologici caratterizzanti la prima fase del trapianto intraportale, e 2) limitare la fase avascolare ed ipossica a cui le isole vengono sottoposte nei giorni che seguono il trapianto (84, 98-99). In questo modo, la componente endocrina riesce ad integrarsi funzionalmente con il tessuto bioingegnerizzato, massimizzando l'efficienza di attecchimento. Il tessuto bioingegnerizzato pre-vascolarizzato progettato in questo modo, pertanto, una volta impiantato, garantisce un processo controllato di anastomosi della rete vascolare creata ex vivo, con quella del ricevente, favorendo un rapido guadagno di funzione e controllo dell'omeostasi del glucosio. Questi vantaggi offerti dai sistemi macro-incapsulanti pre-vascolarizzati provengono dalle peculiari proprietà dei supporti utilizzati. Essi consistono in macro e micro-strutture che riproducono la microarchitettura vascolare endocrina nativa. Alla base di questo approccio ci sono le numerose evidenze degli effetti positivi che le strutture tridimensionali hanno nel ricreare un tessuto vascolarizzato che possa integrarsi con il tessuto dell'ospite, facendo funzionare al meglio la componente endocrina (84, 98-99). In particolare, i supporti utilizzati per questo scopo, sono per lo più organi decellularizzati. Il processo di decellularizzazione consiste nel perfondere gli organi attraverso gli accessi arteriosi con detergenti in grado di rimuovere la componente cellulare, preservando le sue nanostrutture, le componenti della ECM e l'architettura della rete vascolare nativa dell'organo selezionato (100-102). Una volta "svuotato" della componente cellulare nativa, l'organo decellularizzato, costituito dalla sola impalcatura di ECM, viene rigenerato mediante la semina di diversi tipi cellulari al fine di ricostituire non solo la struttura dell'organo ma anche la sua funzione (99, 103). Diversi organi decellularizzati, tra cui la milza (104), il pericardio (105), il rene (106), il fegato (107), e il polmone (98) sono già stati utilizzati con l'obiettivo di bioingegnerizzare tessuti e ricreare il pancreas endocrino (Fig. 1). Tra quelli appena elencati, il polmone decellularizzato ha dimostrato di essere un ottimo supporto per ingegnerizzare un tessuto endocrino pre-vascolarizzato, perché strutturalmente è costituito dagli alveoli che sono circondati da una fitta rete di capillari e hanno dimensioni simili alle isole pancreatiche. Tale caratteristica strutturale rende l'alveolo una struttura molto simile alla nicchia endocrina pancreatica. In aggiunta, il polmone decellularizzato presenta accessi indipendenti originariamente appartenenti alle vie aeree e vascolari. Da un punto di vista bioingegneristico, questi accessi facilitano la colonizzazione del tessuto decellularizzato: le cellule endoteliali possono essere introdotte negli accessi vascolari, mentre le cellule endocrine possono essere inserite negli accessi delle vie aeree. Studi più approfonditi hanno rivelato una significativa sovrapposizione delle proteine della ECM tra pancreas e polmone, suggerendo che l'utilizzo del polmone decellularizzato come dispositivo per ingegnerizzare il pancreas endocrino potrebbe essere una via promettente da esplorare. A tal proposito, un recente studio ha previsto di ripopolare il lobo del polmone sinistro di ratto con isole di maiale neonatale immature (NPIs) dalla trachea e cellule endoteliali derivate dal sangue periferico di soggetti sani (BOEC) dagli accessi vascolari. Dopo sette giorni di coltura in bioreattore, quello che si è ottenuto è un sistema bioingegnerizzato endocrino vascolarizzato che ha favorito sia l'integrazione delle NPIs con la rete vascolare creata ex vivo che il miglioramento della loro funzione pre-impianto. Una volta impiantato in modelli preclinici diabetici, il dispositivo è stato in grado di abbassare l'iperglicemia dopo soli cinque giorni dall'impianto e preservare la funzione fino a tre mesi dopo il trapianto. Pertanto, oltre a proteggere la componente endocrina dagli eventi infiammatori e massimizzare l'efficienza di attecchimento, il sistema garantisce anche una rapida integrazione con la rete vascolare del ricevente, così come dimostrato dalla presenza di funzione fin dalla prima settimana dopo il trapianto (100). Grazie a questi progressi, è emersa una migliore comprensione di come la struttura tridimensionale basata sulla ECM sia

cruciale per sostenere la vitalità, la maturazione (soprattutto nel caso delle cellule beta derivate da cellule staminali o immature come quelle delle NPIs), nonché per favorire l'attecchimento e la funzionalità in vivo della componente endocrina (99, 107-108).

Ad oggi, nonostante i macro dispositivi pre-vascolarizzati abbiano mostrato un notevole potenziale, risultano ancora in una fase iniziale del loro sviluppo; pertanto, non sono ancora stati effettuati studi clinici, ma una loro possibile traslazione clinica è possibile. Poiché la maggior parte dei supporti utilizzati come strutture pre-vascolarizzate sono di origine animale, è necessario, in previsione di una traslazione clinica, validarne la sicurezza e l'assenza di patogeni nocivi per il ricevente. Questo fenomeno può essere superato utilizzando fonti animali transgeniche così da limitare la reazione xenogenica e standardizzando le procedure per ottenere supporti privi di endotossine, secondo le norme dettate dalle buone pratiche di fabbricazione. A sostegno di questo, l'uso di dispositivi basati sull'impiego di ECM derivata da tessuti animali è già stato approvato dalla FDA e alcuni materiali sono già commercialmente disponibili ed applicati nella chirurgia ortopedica, la riparazione cardiovascolare e cutanea (109).

Grazie ai risultati ottenuti dai dispositivi macro-incapsulanti pre-vascolarizzati, concettualmente si è compreso che un dispositivo bioingegnerizzato per poter supportare la funzione endocrina debba possedere una struttura tridimensionale a livello sia macroscopico che microscopico in grado di rispecchiare quella nativa e che sia composta da ECM in modo da permettere alla componente endocrina di integrarsi più facilmente alla rete vascolare dell'ospite. Per cui, avere strutture altrettanto organizzate attraverso tecnologie che permettono di ottenere microstrutture e architetture fatte *ad hoc*, avrebbe un vantaggio in termini di produzione e standardizzazione del processo. Recentemente una tecnologia alternativa alla bioingegnerizzazione di organi decellularizzati che si sta facendo largo nell'ambito del trapianto di isole è la stampa 3D (Fig. 1). Essa permette di stampare delle strutture, precedentemente progettate *in silico*, in modo dettagliato e con caratteristiche desiderate, per ottenere ad esempio un buon rapporto superficie/volume e avere una diffusione ottimizzata dei nutrienti e dell'ossigeno o per ottenere una struttura ordinata anche a livello macroscopico (110).

La tecnica, oltre ad essere predisposta ad una standardizzazione del processo di produzione, consente una facile scalabilità dei costrutti a dimensioni clinicamente rilevanti (31, 110). L'uso della stampa 3D nell'ambito della sostituzione delle cellule beta, è relativamente recente; pertanto, pochi sono i lavori che la sfruttano per questa applicazione. Tuttavia, nonostante i risultati ottenuti dai primi report siano promettenti, si è subito osservata una più difficile diffusione da parte dei nutrienti e dell'insulina, ritardando la funzione della componente endocrina incorporata al suo interno (16, 111-115). Pertanto, è necessario scegliere accuratamente i materiali con cui fabbricare questi sistemi stampati 3D, considerando la biocompatibilità e la permissività alla diffusione dei nutrienti, nonché alle porosità del sistema finale.

In linea di massima, questo tipo di piattaforme sono rigenerabili con tipi di cellule differenti oppure derivate da diverse fonti. Per esempio, per ricreare la vascolarizzazione ex-vivo possono essere utilizzate diverse tipologie di cellule endoteliali (CE): primarie, cellule endoteliali formanti colonie (CEFC) e CE derivate da cellule staminali pluripotenti (116). Tra queste, le CEFC e le CE derivate da cellule staminali pluripotenti, sono quelle che clinicamente possono essere più rilevanti. Queste tipologie cellulari possono essere facilmente ottenute dai pazienti ed essere utilizzati per pre-vascolarizzare questo tipo di strutture ex-vivo e rendere "più autologo" il sistema, per quello che concerne la parte vascolare.

Le cellule endoteliali primarie (CEFC), derivate da sangue periferico, hanno un fenotipo stabile e forti capacità proliferative, ma la loro bassa presenza nel sangue periferico degli adulti (0,05-0,2 cellule/mL) ne rende difficile l'isolamento e limita l'uso clinico (117-118). Inoltre, esiste una forte variabilità tra i donatori e molti soggetti non presentano CEFC in circolo (119). Per superare queste limitazioni, risulta promettente l'uso delle cellule endoteliali autologhe derivate da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) (120). Queste CE possono eludere il rigetto immunitario e hanno una capacità di crescita illimitata (121). Studi preclinici hanno dimostrato che le CE derivate da iPSC si integrano con l'endotelio dell'ospite e possono sostenere la rivascolarizzazione di impianti sottocutanei, portando alla reversione del diabete in modelli preclinici immuno-compromessi (122-124). Tuttavia, è fondamentale garantire la sicurezza eliminando even-

tuali cellule indifferenziate per prevenire la formazione di teratomi (125). Oltre alle CE, altri tipi di cellule, come le MSC, i periciti e le cellule muscolari lisce (SMC), mostrano potenziale angiogenico e supportano la vascolarizzazione locale e la vitalità delle isole pancreatiche dopo il trapianto (14-15).

LA COMPONENTE PANCREATICA ENDOCRINA: FONTI ALTERNATIVE ALLE ISOLE PANCREATICHE UMANE

La possibilità di avere sistemi di incapsulamento che possono essere progettati per immuno-proteggere, sostenere la vitalità, la funzione e/o la maturazione della componente endocrina ha permesso di utilizzare in questi dispositivi cellule endocrine derivate da diverse fonti. Tra le fonti di cellule endocrine più promettenti ci sono quelle derivanti dalle cellule staminali pluripotenti (PSC), come le cellule staminali embrionali pluripotenti (ESC) o iPSC, e quelle xenogeniche provenienti da maiale (14-15).

Le ESC e le iPSC sono particolarmente interessanti per la loro capacità di auto-rinnovamento e differenziazione in vari sottotipi cellulari, a differenza delle SC adulte, che hanno una limitata capacità proliferativa e che tendono a differenziarsi in specifiche cellule tessutali adulte (126). Pertanto, studi di ricerca sono focalizzati sulla differenziazione delle PSC in cellule beta (127-128). Il primo protocollo di differenziamento sviluppato con successo riguardava le ESC, ma queste cellule inizialmente mostravano una risposta limitata alla stimolazione del glucosio (127). Per risolvere questo problema, si è iniziato a trapiantare cellule pancreatiche endodermiche derivate da ESC, ovvero nello stadio differenziativo precedente a quello di cellula beta. In topi immunodeficienti, le cellule maturavano spontaneamente e la normoglicemia veniva ripristinata dopo 3 mesi (129). Da allora, diversi gruppi hanno esplorato approcci efficaci per differenziare le ESC in cellule beta migliorandone la maturazione e la secrezione insulinica indotta da glucosio (130). Nonostante questi risultati incoraggianti, l'uso ESC rimane ad oggi argomento di grosso dibattito a causa 1) del persistere di problematiche immunologiche legate ai fenomeni di rigetto e 2) degli interrogativi etici dal momento che esse derivano da embrioni (131). Per questo motivo, parallelamente agli studi su ESC, sono stati condotti anche studi per ottimizzare protocolli di differenziamento di cellule beta da iPSCs (128).

Il lavoro effettuato dal gruppo di Melton è stato uno dei primi ad ottenere un alto numero di cellule beta funzionali da cellule staminali sia embrionali che indotte, con un'efficienza media di differenziamento in cellula beta del 33% (132). Questo è stato possibile mediante l'identificazione di un nuovo protocollo di differenziazione che prevedeva il passaggio della coltura cellulare da 2D a 3D, obbligando le cellule ad aggregarsi sotto forma di sferoidi. Il consolidamento di questo protocollo nel tempo ha permesso la sua ottimizzazione sia per una produzione di larga scala che l'applicazione della stessa procedura sia da soggetto sano che diabetico, dimostrando la versatilità e l'efficienza della procedura (133). Il processo nel tempo è stato ulteriormente migliorato e reso efficiente, man mano che si comprendevano tutti i meccanismi che stanno alla base del differenziamento (134-136). A tal proposito il gruppo coordinato da Otokonski ha recentemente pubblicato l'evoluzione di questa metodica dimostrando un significativo miglioramento delle cellule sia in vitro che in vivo (137). Infine, alcuni gruppi hanno evidenziato come piccole molecole, fattori di crescita e l'interazione con materiali biologici modifichino la struttura del citoscheletro cellulare e incidano sul processo di differenziamento verso il fenotipo di cellule beta (138). Le cellule reagiscono al microambiente attraverso proteine chiamate integrine, le quali interagiscono con la ECM, modificando o promuovendo specifici processi cellulari. Perciò, l'utilizzo di materiali bio-mimetici che replicano le caratteristiche della ECM come composizione, rigidità e geometria, potrebbe ulteriormente ottimizzare i protocolli di differenziamento. Tuttavia, uno dei più grandi limiti dell'impiego di queste cellule in maniera sistematica è il loro potenziale tumorigenico. Difatti, il trapianto di queste cellule può portare alla formazione di tumori, a causa delle cellule indifferenziate che possono persistere al termine del processo differenziativo (139).

Nonostante questi rischi, diversi trial clinici sono stati approvati utilizzando cellule beta derivate da ESC e iPSC. I trial clinici condotti da Viacyste (NCT02239354 e NCT03163511) hanno utilizzato cellule progenitriche pancreatiche derivate da ESC umane, incapsulate prima nel VC-01, poi nel VC-02 (64-66). Le cellule incapsulate nel VC-02 non avevano sviluppato formazioni neoplastiche ed avevano viceversa sviluppato un fenotipo simile alle cellule beta mature. Inoltre, nei

pazienti trapiantati con dispositivo VC-02, è stata rilevata nel plasma la presenza del C-peptide, sia a digiuno che in risposta a stimolo di glucosio (65-66).

Recentemente un importante attore nel campo dell'industria farmaceutica, Vertex Pharmaceuticals, ha avviato uno studio clinico di fase 1/2 (NCT04786262) con lo scopo di valutare la sicurezza, l'efficacia e la tollerabilità di cellule staminali secernenti insulina (VX-880) infuse attraverso la vena porta in pazienti affetti da DM1 sottoposti a terapia immunosoppressiva. L'impiego dell'immunosoppressione è un aspetto non irrilevante. Infatti, qualora le cellule dovessero prendere una deriva neoplastica, la sospensione della terapia immunosoppressiva esporrebbe l'impianto al sistema immunitario del ricevente, che non riconoscendo le cellule come autologhe, le attaccherebbe eliminando l'impianto. Recentemente sono stati resi noti i risultati del primo paziente trapiantato. Questi dimostrano come le cellule non solo sono in grado di normalizzare la glicemia ma producono un aumento significativo dei livelli di C-peptide a digiuno e una riduzione del 91% della necessità di insulina esogena durante i primi 90 giorni dopo il trattamento (140-141).

Questi risultati evidenziano gli sforzi significativi compiuti per trovare fonti alternative di cellule endocrine pancreatiche, come confermato dai numerosi protocolli sviluppati e dai trial clinici attualmente in corso (69, 142).

Oltre le cellule beta derivate da PSC, l'attenzione è stata focalizzata anche verso l'uso di fonti endocrine porcine (143). La scelta di andare in questa direzione è dipesa: 1) dalla quasi totale omologia che ha l'insulina porcina con quella umana, 2) dalla similarità di risposta metabolica delle cellule beta porcine con quelle umane e 3) dall'avvento delle tecniche di ingegneria genetica che hanno permesso di generare maiali geneticamente modificati potenzialmente produttori di tessuti in grado di evadere la risposta del sistema immunitario umano dopo trapianto (144-145). Un ulteriore grande vantaggio è rappresentato inoltre dalla facilità della procedura di isolamento che, a differenza dell'isolamento delle isole dal pancreas umano, permette di ottenere dai 25000 fino ai 500000 IEQ/pancreas funzionali in base alle dimensioni ed età dell'animale. Considerando che l'indice terapeutico per il trapianto di isole è di 10000 IEQ/kg di paziente, si evince come utilizzare isole derivanti da maiale potrebbe facilmente soddisfare la carenza di materiale proveniente dall'uomo.

I maiali possono essere divisi in tre fasce di età: fetale, neonatale (approssimativamente <14 giorni di età) e adulta (>12 settimane di età). Attualmente in ambito dello xenotrapianto, la scelta si limita all'utilizzo di cellule provenienti da animali adulti o neonatali. Ci sono vantaggi e svantaggi in entrambi i casi (146-147). Il processo di isolamento di pancreas di maiali adulti fornisce isole completamente differenziate in grado di secernere insulina immediatamente dopo il trapianto (148). Un pancreas di maiale adulto può produrre un numero sufficiente di isole per controllare il diabete dopo il trapianto in un paziente diabetico di 60 kg (149). Tuttavia, ci sono limitazioni nell'utilizzo di queste isole: 1) l'alto costo del mantenimento del maiale fino a quando non raggiunge una dimensione adeguata (a circa 6 mesi di età), 2) la difficoltà ed i costi dell'isolamento e 3) la scarsa vitalità in coltura in vitro (150). Diversamente le NPIs hanno notevoli vantaggi: 1) bassi costi di mantenimento degli animali prima dell'isolamento (meno di 2 settimane), 2) una procedura di isolamento molto più semplice e riproducibile con costi notevolmente inferiori rispetto ai maiali adulti (150) e 3) la possibilità di poterle differenziare dopo il trapianto (151-153). A tal proposito, le NPI sono cluster formati da cellule endocrine immature (circa il 25% della massa isolata sono cellule beta) e cellule precursori, che quindi necessitano una fase di coltura in vitro per riaggregarsi e maturare prima del trapianto (152-153).

Per poter utilizzare fonti porcine per sostituire la massa di cellule beta, è fondamentale modificare geneticamente gli animali donatori per ridurre il rischio di trasmissioni di patogeni, come quella da retrovirus endogeno suino (PERV), il quale sembra essere presente nel genoma della maggior parte degli animali di questa specie (154). Yang et al. ha mostrato la produzione di suini geneticamente modificati inattivando PERV tramite CRISPR-Cas9 e trasposoni (155). Inoltre, approcci di ingegneria genetica permettono di rendere le isole porcine più compatibili con l'uomo ed evitare una forte reazione xenogenica, dovuta per lo più alla presenza di anticorpi verso gli xeno-antigeni (156). Sono stati individuati tre xeno-antigeni responsabili della reazione xenogenica verso queste cellule da parte del sistema umano (155). Tra questi ci sono residui glicosidici presenti sulle isole di maiale: il galattosil- α 1,3-galattosio (α Gal) sintetizzato dall' α -1,3-galattosiltransferasi (GGTA1), presenti e ad alti livelli sulle isole di maiale; l'acido N-acetilneuraminico (Neu5Gc) sintetizzato dalla citidina monofosfato-N-acetilneuraminico idrossilasi (CMAH); un glicano simile a Sd(a)

prodotto dalla β -1,4-N-acetil-galattosaminil transferasi 2 (B4GALNT2) (157). Per rimuoverli definitivamente dalle isole suine, sono stati generati modelli suini geneticamente modificati silenziati singolarmente per GGTA1, CMAH, B4GALNT2, o per combinazioni di questi. Isole derivate da questi animali sono state trapiantate in modelli diabetici preclinici, senza osservare la formazione di anticorpi diretti verso i tre residui saccaridici deleti. Inoltre, la loro delezione ha causato una considerevole diminuzione della quantità di anticorpi in grado di riconoscere le isole. Infine, la delezione di questi antigeni non influenza l'architettura delle isole né la loro funzione (156, 158-160).

Dal 2011, diversi studi, tra cui il trial clinico condotto da Wang et al. (NCT03162237), hanno dimostrato le potenzialità dell'utilizzo delle isole pancreatiche di maiale nello xenotrapianto. Tuttavia, essi hanno mostrato risultati aventi una grande variabilità, con pazienti dipendenti dall'insulina esogena che rivela ancora una inefficace capacità terapeutica (161-163).

In primo luogo, trovare una valida fonte alternativa alle isole da donatore umano, risolverebbe la carenza di organi donatori e amplierebbe l'applicazione clinica di questo trattamento a un numero maggiore di pazienti (164). In secondo luogo, in base al tipo di fonte alternativa utilizzata, come per esempio le cellule beta derivate da cellule staminali, si potrebbero ottenere dei dispositivi autologhi, limitando gli effetti avversi del regime immunosoppressivo sui pazienti. In terzo luogo, l'uso dell'ingegneria genetica può aiutare ad ottenere delle cellule in grado di limitare la risposta immunitaria nei confronti dell'impianto endocrino.

INGEGNERIZZARE LE CELLULE BETA COME SOLUZIONE AL PROBLEMA IMMUNOLOGICO

Il successo delle procedure di sostituzione delle cellule beta è ostacolato dalla scarsa capacità di attecchimento delle isole e dalle reazioni immunologiche contro di esse, in particolare contro le cellule beta, al momento del trapianto e nel lungo periodo. Come già anticipato, dopo l'infusione intraportale, le isole sono esposte a diversi eventi infiammatori (165). In questo contesto, la bioingegneria è stata utilizzata, non solo per rimodellare la nicchia endocrina rendendola più favorevole, ma anche a sviluppare strategie innovative per limitare l'uso di immunosoppressori, evitando l'insorgenza degli effetti indesiderati correlati al loro utilizzo. Difatti, in seguito al trapianto, ai pazienti vengono somministrati a livello sistemico immunosoppressori che possono provocare diversi effetti collaterali a organi come i reni, oppure possono indurre ulcere o essere mielotossici ed infine intaccare anche la funzionalità delle cellule beta (166). A tal proposito, quello che diversi studi stanno cercando di sviluppare, è di evitare la somministrazione sistemica di immunosoppressori, ma piuttosto di provare ad inibire a livello topico, quindi, direttamente nel sito di trapianto, la risposta immunitaria. Modificare geneticamente la componente cellulare che viene incorporata nei sistemi incapsulanti permette di modificare l'espressione di molecole che scatenano o inibiscono la risposta immunitaria. In questo modo, le cellule che si ottengono, risultano immunologicamente "invisibili" e in grado di sfuggire quindi alla reazione avversa del sistema immunitario. Ad esempio, le cellule staminali embrionali pluripotenti (ESC) e le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) possono subire modifiche genetiche, in vitro, prima del processo di differenziazione in cellule beta (14).

In generale, quando un tessuto allogenico viene trapiantato, esso viene identificato come estraneo da parte delle cellule T tramite il riconoscimento degli antigeni leucocitari umani altamente polimorfici (HLA) (4). Sopprimendo l'espressione di questa macro-proteina di membrana nelle SC, prima di differenziarle in cellule beta, si possono rendere le cellule immunologicamente protette dal sistema immunitario del ricevente; tuttavia, tale modifica non limiterebbe il riconoscimento del trapianto da parte delle cellule natural killer (NK) (4). A tal proposito, sono stati esplorati altri approcci per estendere a diverse tipologie di cellule immunitarie il meccanismo di non-riconoscimento del trapianto. Ad esempio, uno studio recente ha dimostrato che la delezione del gene B2M, un componente di tutti gli HLA polimorfici endogeni, nelle cellule staminali pluripotenti (PSC) aumenta l'espressione di HLA di tipo E. Questo HLA ha una natura tollerogena, conferendo alle cellule l'invisibilità immunologica e permettendo loro di sfuggire all'attacco delle cellule T e NK (167).

Altre strategie mirano ad inibire la risposta immunitaria inducendo la sovraespressione sulla membrana di cellule beta derivate da staminali, alcune proteine che sono coinvolte nella soppressione delle cellule T, delle NK o delle cellule

mieloidi; tra queste vi sono la proteina PD-L1 o CD47 (168). L'espressione di PD-L1 inibisce l'attivazione delle cellule T mentre il CD47 inibisce l'azione fagocitaria dei macrofagi e l'attività citotossica delle cellule NK. Alcuni report hanno dimostrato come la presenza di PD-L1 sulle cellule beta, promuova la tolleranza verso l'impianto in modelli murini detti "umanizzati", ovvero ricostituiti con cellule immunitarie umane e pertanto in grado di mimare la risposta immunitaria di un soggetto ricevente la stessa tipologia di trapianto (168). Tuttavia, in questo studio la valutazione della risposta immunitaria si è limitata a quella allogenica. Infatti, questo modello murino ad oggi non è in grado di riprodurre gli eventi che portano all'induzione della risposta autoimmune.

Altri lavori, invece, hanno dimostrato come, la combinata sovraespressione di CD47 e la delezione delle proteine HLA di classe I e II, generi una linea di cellule beta differenziate da PSCs, ipoimmune, ed invisibile sia all'immunità innata (mediata da macrofagi e NK) che a quella specifica (mediata dalle cellule T citotossiche). La stessa strategia è stata adottata anche per modificare direttamente le isole pancreatiche umane, che in seguito, sono state disaggregate e poi riaggregate ottenendo dei cluster cellulari, chiamate pseudoisole (169). In questo contesto, si colloca anche la ricerca che sta conducendo Sana Biotechnology, pioniera nell'abito delle cellule staminali invisibili sia nel campo del diabete che della leucemia. Il loro studio mira ad applicare questa tecnologia alle isole pancreatiche umane isolate da pancreas (170). I risultati preliminari ottenuti su alcuni isolati di isole e trapiantati in sede intramuscolare in modelli preclinici murini e in primati, hanno dimostrato come la strategia di modifica genetica sia in grado di funzionare anche sulle isole umane, ponendo questa strategia come una possibile alternativa clinica al trapianto delle SC. Un trial clinico è attualmente in fase di esecuzione (NCT06239636) per valutare la sicurezza e l'efficacia di questo approccio (171-172). Questi risultati dimostrano come l'ingegneria genetica applicata su cellule staminali e più recentemente su cellule primarie può essere uno strumento molto efficace nel ridurre l'immunogenicità delle cellule beta per sfuggire al rigetto in un contesto allogenico.

L'ingegneria genetica viene largamente utilizzata anche per ottenere isole porcine ipo-immunogeniche, con lo scopo di renderle invisibili al sistema immunitario. Oltre ad essere necessaria per la delezione degli xeno-antigeni, l'ingegneria genetica usata sui donatori animali, può essere utile anche per rendere meno immunogeniche le isole di maiale ed:

- 1) esprimere proteine di membrana umane, (come ad esempio, CD46, CD55, CD59, coinvolte nell'attivazione del complemento (173-175), o della trombomodulina, recettore C della proteina endoteliale o inibitore della via del fattore tissutale, recettore 1 della proteina asialoglyca, CD39, CD73) (176-181);
- 2) indurre l'espressione di proteine che inibiscono l'attivazione delle cellule T, ad esempio, immunoglobulina citotossica dell'antigene-4 dei linfociti T, CTLA4-Ig; LEA29Y, chiamato belatacept, che è una variante ad alta affinità di CTLA4-Ig; oppure PD-L1, (182);
- 3) sopprimere l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I o II (183-184);
- 4) indurre l'espressione di HLA di I classe di tipo E (HLA-E) (185) ed HLA-G (186) o di CD47 (187).

Sono stati condotti studi promettenti con isole porcine modificate, combinando in modo differente le modifiche genetiche apportate sia a livello degli xenoantigeni che ai geni sopra elencati, capaci di inibire attivamente la risposta mediata dal complemento o dalle cellule del sistema immunitario. Ad esempio, isole delete per GGTA1 ed esprimenti HLA-G hanno dimostrato di resistere all'attacco del complemento e potenzialmente sarebbero in grado di sfuggire l'azione delle cellule NK (188). Uno studio preclinico su primati è stato condotto impiantando nel fegato delle isole delete per GGTA1 ed esprimenti CD55 e CD59. I risultati hanno mostrato una consistente funzione a lungo termine (circa 600 giorni). Tuttavia, durante il periodo di rilevazione della glicemia, gli animali erano, sottoposti a regime immunosoppressivo con la somministrazione belatacept e anti-CD154 (189). Un altro lavoro ha usato isole GGTA1-KO ed esprimenti CD46 e CD39 impiantate in primati, con somministrazione di anti-CD154. Qui, nonostante la massa insulare era stata preservata nei primi giorni dopo il trapianto, le modifiche genetiche non si sono dimostrate sufficienti a preservare la funzione nel lungo periodo. Infatti la funzione è stata rilevata solo per 5 mesi (190). Questi risultati, sebbene mostrino il notevole potenziale che ha questo approccio, sono ancora preliminari, e pertanto, una determinata combinazione tra le diverse modifiche genetiche e l'eventuale utilizzo di un immunosoppressore deve ancora essere definita. Non-

stante gli sforzi effettuati per inibire il rigetto mediato dalla risposta allogenica, tra i più recenti sviluppi nel campo dell'ingegneria genetica, non vi sono ancora strategie che intaccano i processi relativi alla componente autoreattiva. Questo tipo di immunità, che è presente nei pazienti affetti da DM1, contribuisce al rigetto del trapianto. Essa rappresenta ancora un ostacolo nell'applicazione delle SC differenziate in cellule beta. Sebbene la risposta allogenica diretta specifica per l'HLA possa essere contenuta, il blocco dell'autoreattività rimane un fattore limitante difficile da superare, poiché le cellule T della memoria, una volta attivate, sono particolarmente difficili da inibire (191). Pertanto, per contrastare le reazioni autoimmunitarie potrebbero essere necessarie ulteriori modifiche genetiche e rendere le strategie di ingegneria genetica efficienti nella complessa realtà immunologica di un trapianto di cellule beta potenzialmente allo e auto reattivo (10).

CONCLUSIONI

La sostituzione delle cellule beta, sebbene ci siano ancora delle limitazioni sperimentali, resta, ad oggi, una strategia che permette di ripristinare il controllo endogeno della glicemia, migliorando notevolmente la qualità della vita ai pazienti affetti da DM1.

Gli studi effettuati sino ad ora sulla ricerca del miglior sistema di bio-ingegnerizzazione di un pancreas endocrino, hanno evidenziato un concetto fondamentale: i dispositivi incapsulanti, di qualsiasi tipologia, dovrebbero essere progettati in modo da permettere il più rapidamente possibile un'integrazione vascolare funzionale della massa insulare infusa. Recentemente è stato osservato come il successo dell'attecchimento iniziale può influenzare la funzione a lungo termine delle isole infuse (3). Pertanto, è necessario che l'efficienza di attecchimento venga aumentata. Per questo scopo, le piattaforme che conferiscono una struttura tridimensionale organizzata per accogliere sia la componente endocrina che quella vascolare sembrano essere le più promettenti. Grazie ad essi, infatti, la vascolarizzazione può già essere stabilita ex vivo, senza ricorrere ad una vascolarizzazione in vivo. In questo modo, con l'impiego di dispositivi strutturalmente organizzati, è possibile ricostruire in maniera organica ex vivo la nicchia endocrina mediante la combinazione della componente vascolare con quella endocrina. In questo modo, si limitano tutta quella serie di eventi infiammatori a cui le isole sono sottoposte nella fase iniziale del trapianto favorendo un rapido attecchimento di una massa insulare ben strutturata e rapidamente irrorata dal flusso sanguigno.

In conclusione, sebbene ci siano ancora diverse sfide da superare, i progressi nella bioingegnerizzazione di sistemi vascolarizzati e immuno-compatibili per la sostituzione delle cellule beta rappresentano una frontiera promettente per il trattamento del DM1. La combinazione di tecnologie avanzate che includono dispositivi incapsulanti tridimensionali pre-vascolarizzati, ingegneria genetica per la creazione di cellule ipo-immuni e donatori "umanizzati", insieme ai successi preclinici in modelli animali di grande taglia, suggerisce che siamo vicini a una svolta significativa. Questa sinergia di approcci innovativi potrebbe presto portare a studi clinici di fase I, aprendo la strada a nuove terapie che migliorerebbero radicalmente la qualità della vita dei pazienti affetti da questa patologia.

BIBLIOGRAFIA

1. Shapiro AMJ, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med.* 2006; 355:1318-1330.
2. Eleventh Allograft Report. 2022.
3. Chetboun M, et al. Association between primary graft function and 5-year outcomes of islet allogeneic transplantation in type 1 diabetes: a retrospective, multicentre, observational cohort study in 1210 patients from the Collaborative Islet Transplant Registry. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2023; 1:391-401.
4. Brusko TM, Russ HA & Stabler CL. Strategies for durable β cell replacement in type 1 diabetes. *Science.* 2021; 373:516-522.
5. Kourtzelis I, Magnusson PU, Kotlabova K, Lambris JD & Chavakis T. Regulation of Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR) in pancreatic islet xeno-transplantation: Points for therapeutic interventions. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 865:171-188.

6. Gibly RF, et al. Advancing islet transplantation: from engraftment to the immune response. *Diabetologia*. 2011; 54:2494-2505.
7. Shapiro AMJ, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000; 343:230-238.
8. Walker S, Mahesh A, Shareen F. Considerations and challenges of islet transplantation and future therapies on the horizon. *Endocrinology and Metabolism*. 2002; 322(2). Doi: 10.1152/ajpendo.00310.2021.
9. Berney T, Andres A, Toso C, Majno P & Squifflet J-P. mTOR Inhibition and Clinical Transplantation: Pancreas and Islet. *Transplantation*. 2018; 102:S30-S31.
10. Bluestone JA & Tang Q. Solving the Puzzle of Immune Tolerance for β -Cell Replacement Therapy for Type 1 Diabetes. *Cell Stem Cell*. 2020; 27:505-507.
11. Takaki T & Shimoda M. Pancreatic islet transplantation: toward definitive treatment for diabetes mellitus. *Glob Health Med*. 2020; 2:200-211.
12. Warshauer JT, Bluestone JA & Anderson MS. New Frontiers in the Treatment of Type 1 Diabetes. *Cell Metab*. 2020; 31:46-61.
13. Samojlik MM & Stabler CL. Designing biomaterials for the modulation of allogeneic and autoimmune responses to cellular implants in Type 1 Diabetes. *Acta Biomaterialia*. 2021; 133: 87-101. Doi: 10.1016/j.actbio.2021.05.039.
14. Pignatelli C, Campo F, Neroni A, Piemonti L & Citro A. Bioengineering the Vascularized Endocrine Pancreas: A Fine-Tuned Interplay Between Vascularization, Extracellular-Matrix-Based Scaffold Architecture, and Insulin-Producing Cells. *Transplant International*. 2022; 35:168.
15. Campo F, et al. Bioengineered Vascularized Insulin Producing Endocrine Tissues. In: *Pluripotent Stem Cell Therapy for Diabetes*. 2023:151-177. Doi: 10.1007/978-3-031-41943-0_8.
16. de Vries R & van Apeldoorn AA. Scaffolds for Encapsulation of Stem Cell-Derived β Cells. In: *Pluripotent Stem Cell Therapy for Diabetes*. 2023:123-149. Doi: 10.1007/978-3-031-41943-0_7.
17. Opara A, Jost A, Dagogo-Jack S & Opara E. C. Islet cell encapsulation - Application in diabetes treatment. *Exp Biol Med*. 2021; 246:2570-2578.
18. Ernst AU, et al. Nanotechnology in cell replacement therapies for type 1 diabetes. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019, 139:116-138.
19. Ernst AU, Wang LH & Ma M. Islet encapsulation. *J Mater Chem*. 2018; B 6:6705-6722.
20. Tomei AA, et al. Device design and materials optimization of conformal coating for islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111:10514-10519.
21. Krol S, Baronti W & Marchetti P. Nanoencapsulated human pancreatic islets for β -cell replacement in Type 1 diabetes. *Nanomedicine (London, England)*. 2020; 15:1735-1738. Preprint at <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0166>.
22. Lee SH, Kim HO & Kang JT. Optimization of Nano-encapsulation on Neonatal Porcine Islet-like Cell Clusters Using Polymersomes. *Nanoscale Res Lett*. 2021; 16:1-11.
23. Leigh BL, et al. Antifouling Photograftable Zwitterionic Coatings on PDMS Substrates. *Langmuir*. 2019; 35:1100-1110.
24. Kizilel S, et al. Encapsulation of pancreatic islets within nano-thin functional polyethylene glycol coatings for enhanced insulin secretion. *Tissue Eng Part A*. 2021; 16:2217-2228.
25. Qin T, Smink AM & de Vos P. Enhancing longevity of immunoisolated pancreatic islet grafts by modifying both the intracapsular and extracapsular environment. *Acta Biomater*. 2023; 167:38-53.
26. Zhang Q, et al. Islet Encapsulation: New Developments for the Treatment of Type 1 Diabetes. *Front Immunol*. 2022; 13:869984.
27. Krishnamurthy VR, et al. Chemoselective immobilization of peptides on abiotic and cell surfaces at controlled densities. *Langmuir*. 2010; 26:7675-7678.
28. Zhi ZL, Khan F & Pickup JC. Multilayer nanoencapsulation: a nanomedicine technology for diabetes research and management. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013; 100:162-169.
29. Zhi ZL, Kerby A, King AJF, Jones PM & Pickup JC. Nano-scale encapsulation enhances allograft survival and function of islets transplanted in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 2012; 55:1081-1090.

30. Santini-González J, et al. In vitro generation of peri-islet basement membrane-like structures. *Biomaterials*. 2021; 273:120808.
31. Espona-Noguera A, et al. Review of advanced hydrogel-based cell encapsulation systems for insulin delivery in type 1 diabetes mellitus. *Pharmaceutics*. 2019; 11(11):597.
32. Scharp DW & Marchetti P. Encapsulated islets for diabetes therapy: History, current progress, and critical issues requiring solution. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014; vols 67-68, 35-73. Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.018>.
33. Place TL, Domann FE & Case AJ. Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radic Biol Med*. 2017; 113:311-322.
34. Cao R, Avgoustiniatos E, Papas K, de Vos P & Lakey JRT. Mathematical predictions of oxygen availability in micro- and macro-encapsulated human and porcine pancreatic islets. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020; 108:343-352.
35. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Science*. 2001; 31:81-110.
36. Opara EC & Kendall WF. Immunoisolation techniques for islet cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther*. 2002; 2:503-511.
37. Bhujbal SV, De Haan B, Niclou SP & De Vos P. A novel multilayer immunoisolating encapsulation system overcoming protrusion of cells. *Sci Rep*. 2014; 4:1-8.
38. de Vos P, Faas MM, Strand B & Calafiore R. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials*. 2006; 27:5603-5617.
39. Kim MJ, et al. Suppression of fibrotic reactions of chitosan-alginate microcapsules containing porcine islets by dexamethasone surface coating. *Endocrinology and Metabolism*. 2021; 36:146-156.
40. Hu S, et al. Toll-like receptor 2-modulating pectin-polymers in alginate-based microcapsules attenuate immune responses and support islet-xenograft survival. *Biomaterials*. 2021; 266:120460.
41. Desai T & Shea LD. Advances in islet encapsulation technologies. *Nat Rev Drug Discov*. 2017; 16:338-350.
42. Farina M, Alexander JF, Thekkedath U, Ferrari M & Grattoni A. Cell encapsulation: Overcoming barriers in cell transplantation in diabetes and beyond. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019; 139:92-115.
43. Papas KK, De Leon H, Suszynski TM & Johnson RC. Oxygenation strategies for encapsulated islet and beta cell transplants. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019; 139:139-156.
44. Ma M, et al. Core-Shell Hydrogel Microcapsules for Improved Islets Encapsulation. *Adv Healthc Mater*. 2013; 2:667-672.
45. Colton CK. Oxygen supply to encapsulated therapeutic cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014; 67-68:93-110.
46. Martin JD, et al. Dexamethasone Increases Cisplatin-Loaded Nanocarrier Delivery and Efficacy in Metastatic Breast Cancer by Normalizing the Tumor Microenvironment. *ACS Nano*. 2019; 13.
47. Smink AM & de Vos P. Therapeutic Strategies for Modulating the Extracellular Matrix to Improve Pancreatic Islet Function and Survival After Transplantation. *Curr Diab Rep*. 2018; 18.
48. Barkai U, Rotem A & de Vos P. Survival of encapsulated islets: More than a membrane story. *World J Transplant*. 2016; 6:69.
49. Llacua LA, Faas MM & de Vos P. Extracellular matrix molecules and their potential contribution to the function of transplanted pancreatic islets. *Diabetologia*. 2018; 61:1261-1272.
50. Kuwabara R, et al. Extracellular matrix inclusion in immunoisolating alginate-based microcapsules promotes longevity, reduces fibrosis, and supports function of islet allografts in vivo. *Acta Biomater*. 2023; 158:151-162.
51. Qin T, et al. Inclusion of extracellular matrix molecules and necrostatin-1 in the intracapsular environment of alginate-based microcapsules synergistically protects pancreatic β cells against cytokine-induced inflammatory stress. *Acta Biomater*. 2022; 146:434-449.
52. Krishtul S, Moshe MS, Kovrigina I, Baruch L & Machluf M. ECM-based bioactive microencapsulation significantly improves islet function and graft performance. *Acta Biomater*. 2023; 171:249-260.
53. Ding S, Serra CA, Vandamme TF, Yu W & Anton N. Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective. *Journal of Controlled Release*. 2019; 295:31-49.

54. Wang J, et al. Droplet microfluidics for the production of microparticles and nanoparticles. *Micromachines* (Basel). 2017; 8.
55. Daly AC, Riley L, Segura T & Burdick JA. Hydrogel microparticles for biomedical applications. *Nat Rev Mater*. 2020; 5:20-43.
56. Li W. et al. Microfluidic fabrication of microparticles for biomedical applications. *Chem Soc Rev*. 2018; 47:5646-5683.
57. Chasemi A, Akbari E & Imani R. An Overview of Engineered Hydrogel-Based Biomaterials for Improved β -Cell Survival and Insulin Secretion. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021; 9.
58. Jacobs-Tulleneers-Thevissen D, et al. Sustained function of alginate-encapsulated human islet cell implants in the peritoneal cavity of mice leading to a pilot study in a type 1 diabetic patient. *Diabetologia*. 2013; 56:1605-1614.
59. Calafiore R. Microencapsulated Pancreatic Islet Allografts Into Nonimmunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes: First two cases. *Diabetes Care*. 2006; 29:137-138.
60. Tuch BE, et al. Safety and viability of microencapsulated human islets transplanted into diabetic humans. *Diabetes Care*. 2009; 32:1887-1889.
61. Matsumoto S, Abalovich A, Wechsler C, Wynyard S & Elliott RB. Clinical Benefit of Islet Xenotransplantation for the Treatment of Type 1 Diabetes. *EBioMedicine*. 2016; 12:255-262.
62. Elliott RB, et al. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2007; 14:157-161.
63. Bowers DT, Song W, Wang L. & Ma M. Engineering the vasculature for islet transplantation. *Acta Biomater*. 2019; 95:131-151.
64. Henry RR, et al. Initial Clinical Evaluation of VC-01™ Combination Product—A Stem Cell-Derived Islet Replacement for Type 1 Diabetes (T1D). *Diabetes*. 2018; 67:138-OR.
65. Ramzy A, et al. Implanted pluripotent stem-cell-derived pancreatic endoderm cells secrete glucose-responsive C-peptide in patients with type 1 diabetes. *Cell Stem Cell*. 2021; 28:2047-2061.e5.
66. Shapiro AMJ, 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 Rep Med*. 2021; 2:100466.
67. Chang R, et al. Nanoporous Immunoprotective Device for Stem-Cell-Derived β -Cell Replacement Therapy. *ACS Nano*. 2017; 11:7747-7757.
68. Nyitray CE, et al. Polycaprolactone Thin-Film Micro- and Nanoporous Cell-Encapsulation Devices. *ACS*. 2015; *Nano* 9:5675-5682.
69. Magisson J, et al. Safety and function of a new pre-vascularized bioartificial pancreas in an allogeneic rat model. *J Tissue Eng*. 2020; 11.
70. Schweicher J, Nyitray C & Desai TA. Membranes to achieve immunoprotection of transplanted islets. *Frontiers in Bioscience – Landmark*. 2014; 19:49-76.
71. Lee AS, Tang C, Rao MS, Weissman IL & Wu JC. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat Med*. 2013; 19:998-1004.
72. Barkai U, et al. Enhanced oxygen supply improves islet viability in a new bioartificial pancreas. *Cell Transplant*. 2013; 22:1463-1476.
73. Ludwig B, et al. Favorable outcome of experimental islet xenotransplantation without immunosuppression in a nonhuman primate model of diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114:11745-11750.
74. Carlsson PO, et al. Transplantation of macroencapsulated human islets within the bioartificial pancreas β Air to patients with type 1 diabetes mellitus. *American Journal of Transplantation*. 2018; 18:1735-1744.
75. Ludwig B, et al. Transplantation of human islets without immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110:19054-19058.
76. An D, et al. Designing a retrievable and scalable cell encapsulation device for potential treatment of type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 115:E263-E272.

77. Wang X, et al. A nanofibrous encapsulation device for safe delivery of insulin-producing cells to treat type 1 diabetes. *Sci Transl Med.* 2021; 13.
78. Paez-Mayorga J, et al. Implantable niche with local immunosuppression for islet allotransplantation achieves type 1 diabetes reversal in rats. *Nat Commun.* 2022; 13:1-20.
79. Chick WL, et al. Artificial pancreas using living beta cells: Effects on glucose homeostasis in diabetic rats. *Science.* 1977. 197(4305):780-782.
80. Mak T, et al. Treatment of diabetes by xenogeneic islets without immunosuppression: Use of a vascularized bioartificial pancreas. *Diabetes.* 1996; 45:342-347.
81. Song, S et al. An intravascular bioartificial pancreas device (iBAP) with silicon nanopore membranes (SNM) for islet encapsulation under convective mass transport. *Lab Chip.* 2017; 17:1778-1792.
82. Burczak K, Fujisato T, Hatada M & Ikada Y. Protein permeation through poly(vinyl alcohol) hydrogel membranes. *Biomaterials.* 1994; 15:231-238.
83. Song S, & Roy S. Progress and challenges in macroencapsulation approaches for type 1 diabetes (T1D) treatment: Cells, biomaterials, and devices. *Biotechnol Bioeng.* 2016; 113:1381-1402.
84. Citro A, & Ott HC. Can We Re-Engineer the Endocrine Pancreas? *Current Diabetes Reports.* 2018; 18:1-7. Doi: 10.1007/s11892-018-1072-7.
85. Peloso A, et al. Bioengineering the Pancreas: Cell-on-Scaffold Technology. in *Scaffolds in Tissue Engineering - Materials, Technologies and Clinical Applications* (IntechOpen, 2017). Doi: 10.5772/intechopen.70990.
86. Ho BX, Teo AKK & Ng NHJ. Innovations in bio-engineering and cell-based approaches to address immunological challenges in islet transplantation. *Front Immunol.* 2024; 15:1375177.
87. Berman DM, et al. Bioengineering the endocrine pancreas: Intraomental islet transplantation within a biologic resorbable scaffold. *Diabetes.* 2016; 65:1350-1361.
88. Baidal DA, et al. Bioengineering of an Intraabdominal Endocrine Pancreas. *New England Journal of Medicine.* 2017; 376:1887-1889.
89. Marchioli G, et al. Hybrid Polycaprolactone/Alginate Scaffolds Functionalized with VEGF to Promote de Novo Vessel Formation for the Transplantation of Islets of Langerhans. *Adv Healthc Mater.* 2016; 5:1606-1616.
90. Kasoju N, et al. Bioengineering a pre-vascularized pouch for subsequent islet transplantation using VEGF-loaded polylactide capsules. *Biomater Sci.* 2020; 8:631-647.
91. Yin N, et al. VEGF-conjugated alginate hydrogel prompt angiogenesis and improve pancreatic islet engraftment and function in type 1 diabetes. *Materials Science and Engineering C.* 2016; 59:958-964.
92. Smink AM, de Haan BJ, Lakey JRT & de Vos P. Polymer scaffolds for pancreatic islet transplantation – Progress and challenges. *American Journal of Transplantation.* 2018; 18:2113-2119.
93. Gebe JA, Preisinger A, Gooden MD, D'Amico L. & Vernon RB. Local, Controlled Release In Vivo of Vascular Endothelial Growth Factor Within a Subcutaneous Scaffolded Islet Implant Reduces Early Islet Necrosis and Improves Performance of the Graft. *Cell Transplant.* 2018; 27:531-541.
94. Uzunalli G, et al. Improving pancreatic islet in vitro functionality and transplantation efficiency by using heparin mimetic peptide nanofiber gels. *Acta Biomater.* 2015; 22:8-18.
95. Hajizadeh-Saffar E, et al. Inducible VEGF Expression by Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesenchymal Stromal Cells Reduces the Minimal Islet Mass Required to Reverse Diabetes. *Sci Rep.* 2015; 5.
96. Vlahos AE, Cober N & Sefton MV. Modular tissue engineering for the vascularization of subcutaneously transplanted pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2017; 114:9337-9342.
97. Vlahos AE, et al. Endothelialized collagen based pseudo-islets enables tuneable subcutaneous diabetes therapy. *Biomaterials.* 2020; 232:119710.
98. Citro A, et al. Biofabrication of a vascularized islet organ for type 1 diabetes. *Biomaterials.* 2019; 199:40-51.
99. Citro A, et al. Directed self-assembly of a xenogeneic vascularized endocrine pancreas for type 1 diabetes. *Nat Commun.* 2023; 14:878.

100. Tapias LF & Ott HC. Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2014; 19:145-152 Doi: 10.1097/MOT.000000000000051.
101. Guyette JP, et al. Perfusion decellularization of whole organs. 2014; 9:1451-1468.
102. Song JJ, et al. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med*. 2013; 19:646-651.
103. Wassmer C-H, et al. Bio-Engineering of Pre-Vascularized Islet Organoids for the Treatment of Type 1 Diabetes. *Transplant International*. 2022; 35:10214.
104. Vishwakarma SK, et al. Molecular dynamics of pancreatic transcription factors in bioengineered humanized insulin producing neorgan. *Gene*. 2018; 675:165-175.
105. Wang X, Wang K, Zhang W, Qiang M & Luo Y. A bilaminated decellularized scaffold for islet transplantation: Structure, properties and functions in diabetic mice. *Biomaterials*. 2017; 138:80-90.
106. Willenberg BJ, et al. Repurposed biological scaffolds: Kidney to pancreas. *Organogenesis*. 2015; 11:47-57.
107. Goh SK, Bertera S, Richardson T & Banerjee I. Repopulation of decellularized organ scaffolds with human pluripotent stem cell-derived pancreatic progenitor cells. *Biomedical Materials (Bristol)*. 2023; 18:025018.
108. Karimova MV, Gvazava IG & Vorotelyak EA. Overcoming the Limitations of Stem Cell-Derived Beta Cells. *Biomolecules*. 2022; 12:810.
109. Mendibil U, et al. Tissue-specific decellularization methods: Rationale and strategies to achieve regenerative compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21:1-29 Doi: 10.3390/ijms21155447.
110. Gurlin RE, Giraldo JA & Latres E. 3D Bioprinting and Translation of Beta Cell Replacement Therapies for Type 1 Diabetes. *Tissue Eng Part B Rev*. 2021; 27:238-252.
111. Song J & Millman JR. Economic 3D-printing approach for transplantation of human stem cell-derived β -like cells. *Biofabrication*. 2016; 9:015002.
112. Kim J, et al. 3D cell printing of islet-laden pancreatic tissue-derived extracellular matrix bioink constructs for enhancing pancreatic functions. *J Mater Chem B*. 2019; 7:1773-1781.
113. Marchioli G, et al. Fabrication of three-dimensional bioplotting hydrogel scaffolds for islets of Langerhans transplantation. *Biofabrication*. 2015; 7(2):025009.
114. Liu X, et al. Development of a Coaxial 3D Printing Platform for Biofabrication of Implantable Islet-Containing Constructs. *Adv Healthc Mater*. 2019; 8(7):e1801181.
115. Duin S, et al. 3D Bioprinting of Functional Islets of Langerhans in an Alginate/Methylcellulose Hydrogel Blend. *Adv Healthc Mater*. 2019; 8(7):e1801631.
116. Wang K, Lin RZ & Melero-Martin JM. Bioengineering human vascular networks: trends and directions in endothelial and perivascular cell sources. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019; 76:421-439. Doi: 10.1007/s00018-018-2939-0.
117. Ingram DA, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. 2004. Doi: 10.1182/blood-2004-04-1396.
118. Mund JA, Estes ML, Yoder MC, Ingram DA & Case J. Flow Cytometric Identification and Functional Characterization of Immature and Mature Circulating Endothelial Cells. 2012. Doi: 10.1161/ATVBAHA.111.244210.
119. Rignault-Clerc S, et al. Functional late outgrowth endothelial progenitors isolated from peripheral blood of burned patients. *Burns*. 2013; 39:694-704.
120. Amano Y, et al. Development of vascularized iPSC derived 3D-cardiomyocyte tissues by filtration Layer-by-Layer technique and their application for pharmaceutical assays. *Acta Biomater*. 2016; 33:110-121.
121. Wu SM & Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol*. 2011; 13:497.
122. Samuel R, et al. Generation of functionally competent and durable engineered blood vessels from human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110:12774-12779.
123. Turksen K. Human Embryonic Stem Cell Protocols. Third edition. *Methods in Molecular Biology*, vol 1307, 2016.

124. Song W, et al. Engineering transferrable microvascular meshes for subcutaneous islet transplantation. *Nat Commun.* 2019; 10.
125. Stevens KR & Murry CE. Human pluripotent stem cell-derived engineered tissues: clinical considerations. *Cell Stem Cell.* 2018; 22:294.
126. Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell.* 2020; 27:523-531.
127. D'Amour KA, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2006; 24:1392-1401.
128. Takahashi K & Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006; 126:663-676.
129. Kroon E, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol.* 2008; 26:443-452.
130. Rezaia A, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2014; 32:1121-1133.
131. Volarevic V, et al. Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *Int J Med Sci.* 2018; 15:36.
132. Pagliuca FW, et al. Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell.* 2014; 159:428-439.
133. Millman JR, et al. Generation of stem cell-derived β -cells from patients with type 1 diabetes. *Nat Commun.* 2016; 7.
134. Nair GG, et al. Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived β cells. *Nat Cell Biol.* 2019; 21:263-274.
135. Sharon N, et al. Wnt Signaling Separates the Progenitor and Endocrine Compartments during Pancreas Development. 2019; 27:2281-2291.
136. Liu H, et al. Chemical combinations potentiate human pluripotent stem cell-derived 3D pancreatic progenitor clusters toward functional β cells. *Nature Communications.* 2021; 12: 3320.
137. Barsby T, et al. Differentiating functional human islet-like aggregates from pluripotent stem cells. *STAR Protoc.* 2022; 3:101711.
138. Hogrebe NJ, Augsornworawat P, Maxwell KG, Velazco-Cruz L & Millman JR. Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2020; 38:460-470.
139. Pellegrini S, et al. Treating iPSC-Derived β Cells with an Anti-CD30 Antibody-Drug Conjugate Eliminates the Risk of Teratoma Development upon Transplantation. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(17):9699.
140. FDAnews. Vertex Plans IND for Implantable Islet Cell Device for Type 1 Diabetes (2021). Available at: <https://www.fda-news.com/articles/204982-vertex-plans-ind-for-implantable-islet-cell-device-for-type-1-diabetes?v=preview> (Accessed March 18, 2022).
141. Dolgin E. Diabetes cell therapies take evasive action. *Nat Biotechnol.* 2022; 40:291-295.
142. Paez-Mayorga J, et al. Emerging strategies for beta cell transplantation to treat diabetes. *Trends Pharmacol Sci.* 2022; 43:221-233.
143. Liu Z, et al. Pig-to-primate islet xenotransplantation: Past, present, and future. *Cell Transplant.* 2017; 26:925-947.
144. Karamanou M, Protogerou A, Tsoucalas G, Androutsos G, Poulakou-Rebelakou E. Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World J Diabetes.* 2016; 7:1.
145. Mourad NI, Xhema D & Gianello P. In vitro assessment of pancreatic hormone secretion from isolated porcine islets. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022; 13:935060.
146. Nagaraju S, Bottino R, Wijkstrom M, Trucco M. & Cooper DKC. Islet xenotransplantation: What is the optimal age of the islet-source pig? *Xenotransplantation.* 2015; 22:7-19.
147. Bottino R, et al. Isolation outcome and functional characteristics of young and adult pig pancreatic islets for transplantation studies. *Xenotransplantation.* 2007; 14:74-82.
148. Smood B, Bottino R & Cooper DKC. Xenotransplantation of the endocrine pancreas. *Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas.* 2020; vol 2: 423-446. Doi: 10.1016/B978-0-12-814831-0.00031-2.

149. Kwak K. et al. Comparison of islet isolation result and clinical applicability according to GMP-grade collagenase enzyme blend in adult porcine islet isolation and culture. *Xenotransplantation*. 2021; 28(4):e12703.
150. Vanderschelden R, Sathialingam M, Alexander M & Lakey JRT. Cost and Scalability Analysis of Porcine Islet Isolation for Islet Transplantation: Comparison of Juvenile, Neonatal and Adult Pigs. *Cell Transplant*. 2019; 28:967-972.
151. Dhanasekaran M. et al. Pig islet xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017; 22:452-462.
152. Coe TM, Markmann JF & Rickert CG. Current status of porcine islet xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2020; 25:449.
153. Hassouna T, Seeberger KL, Salama B & Korbitt GS. Functional Maturation and In Vitro Differentiation of Neonatal Porcine Islet Grafts. *Transplantation*. 2018; 102:e413-e423.
154. Denner J & Tönjes RR. Infection barriers to successful xenotransplantation focusing on porcine endogenous retroviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25:318-343.
155. Yue Y, et al. Extensive germline genome engineering in pigs. *Nat Biomed Eng*. 2021; 5:134-143.
156. Kemter E, Denner J & Wolf E. Will Genetic Engineering Carry Xenotransplantation of Pig Islets to the Clinic? *Curr Diab Rep*. 2018; 18:103.
157. Byrne GW, McGregor CGA & Breimer ME. Recent investigations into pig antigen and anti-pig antibody expression. *Int J Surg*. 2015; 23:223-228.
158. Estrada JL et al. Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/ β 4GalNT2 genes. *Xenotransplantation*. 2015; 22:194-202.
159. Martin BM, et al. Dual islet transplantation modeling of the instant blood-mediated inflammatory reaction. *Am J Transplant*. 2015; 15:1241-1252.
160. Hawthorne WJ, Lew AM & Thomas HE. Genetic strategies to bring islet xenotransplantation to the clinic. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016; 21:476-483.
161. Matsumoto S, Abalovich A, Wechsler C, Wynyard S & Elliott RB. Clinical Benefit of Islet Xenotransplantation for the Treatment of Type 1 Diabetes. *EBioMedicine*. 2016; 12:255-262.
162. Matsumoto S, et al. Clinical porcine islet xenotransplantation under comprehensive regulation. *Transplant Proc*. 2014; 46:1992-1995.
163. Wang, W, et al. A clinical trial of xenotransplantation of neonatal pig islets for diabetic patients. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2011; 36:1134-1140.
164. Pepper AR, Bruni A & Shapiro AMJ. Clinical islet transplantation: Is the future finally now? *Curr Opin Organ Transplant*. 2018; 23:428-439.
165. Brusko TM, Russ HA & Stabler CL. Strategies for durable β cell replacement in type 1 diabetes. *Science*. 2021; 373:516-522.
166. Berney T, Buhler LH, Majno P, Mentha G & Morel P. Immunosuppression for pancreatic islet transplantation. *Transplant Proc*. 2004; 36:S362-S366.
167. Gornalusse GG, et al. HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol*. 2017; 35:765-772.
168. Casey SC, et al. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science*. 2016; 352:227-231.
169. Hu X, et al. Hypoimmune induced pluripotent stem cells survive long term in fully immunocompetent, allogeneic rhesus macaques. *Nat Biotechnol*. 2024; 42:413-423.
170. Hu X, et al. Human hypoimmune primary pancreatic islets avoid rejection and autoimmunity and alleviate diabetes in allogeneic humanized mice. *Sci Transl Med*. 2023; 15.
171. Hu X, et al. Hypoimmune islets achieve insulin independence after allogeneic transplantation in a fully immunocompetent non-human primate. *Cell Stem Cell*. 2024; 31:334-340.e5.
172. Hu X, et al. Abstract LB144: Overexpression of CD47 protects hypoimmune CAR T cells from innate immune cell killing. *Cancer Res*. 2021; 81:LB144-LB144.
173. Diamond LE, et al. A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. *Transplantation*. 2001; 71:132-142.

174. Rosengard AM, et al. Tissue expression of human complement inhibitor, decay-accelerating factor, in transgenic pigs. A potential approach for preventing xenograft rejection. *Transplantation*. 1995; 59:1325-1333.
175. Chen Y, et al. Xenoantibody response to porcine islet cell transplantation using GTKO, CD55, CD59, and fucosyltransferase multiple transgenic donors. *Xenotransplantation*. 2014; 21:244-253.
176. Miwa Y, et al. Potential value of human thrombomodulin and DAF expression for coagulation control in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2010; 17:26-37.
177. Petersen B, et al. Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C. *Xenotransplantation*. 2009; 16:486-495.
178. Lee KFE, et al. Recombinant pig TFPI efficiently regulates human tissue factor pathways. *Xenotransplantation*. 2008; 15:191-197.
179. Paris LL, et al. Reduced human platelet uptake by pig livers deficient in the asialoglycoprotein receptor 1 protein. *Xenotransplantation*. 2015; 22:203-210.
180. Le Bas-Bernardet S, et al. Xenotransplantation of galactosyl-transferase knockout, CD55, CD59, CD39, and fucosyl-transferase transgenic pig kidneys into baboons. *Transplant Proc*. 2011; 43:3426-3430.
181. Kaniewska E, et al. Immunohistochemical and functional analysis of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) in pig aortic valves. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2014; 33:305-312.
182. Klymiuk N, et al. Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice. *Diabetes*. 2012; 61:1527-1532.
183. Hara H, et al. Human dominant-negative class II transactivator transgenic pigs - effect on the human anti-pig T-cell immune response and immune status. *Immunology*. 2013; 140:39-46.
184. Reyes LM, et al. Creating class I MHC-null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease. *J Immunol*. 2014; 193:5751-5757.
185. Forte P, Baumann BC, Weiss EH & Seebach JD. HLA-E expression on porcine cells: protection from human NK cytotoxicity depends on peptide loading. *Am J Transplant*. 2005; 5:2085-2093.
186. Esquivel EL, et al. Suppression of human macrophage-mediated cytotoxicity by transgenic swine endothelial cell expression of HLA-G. *Transpl Immunol*. 2015; 32:109-115.
187. Tena A, et al. Transgenic expression of human CD47 markedly increases engraftment in a murine model of pig-to-human hematopoietic cell transplantation. *Am J Transplant*. 2014; 14:2713-2722.
188. Zhou X, et al. [Generation of genetic modified pigs devoid of GCTA1 and expressing the human leukocyte antigen-G5]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2022; 38:1096-1111.
189. Hawthorne WJ, et al. Xenotransplantation of Genetically Modified Neonatal Pig Islets Cures Diabetes in Baboons. *Front Immunol*. 2022; 13:898948.
190. Bottino R, et al. Pig-to-Monkey Islet Xenotransplantation Using Multi-Transgenic Pigs. *American Journal of Transplantation*. 2014; 14:2275-2287.
191. Bluestone JA & Tang Q. Solving the Puzzle of Immune Tolerance for β -Cell Replacement Therapy for Type 1 Diabetes. *Cell Stem Cell*. 2020; 27:505-507.