

il Diabete

Vol. 35, N. 3, ottobre 2023



– RASSEGNE

L'eterogeneità del diabete autoimmune

Epidemiologia e fattori di rischio del diabete di tipo 1

Il diabete monogenico. Una condizione clinica frequentemente trascurata

– EDITORIALI

Ulcere ischemiche del piede diabetico: terapia cellulare autologa come possibile trattamento adiuvante

– AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA

Efficacia della terapia cellulare in pazienti con ischemia critica ed ulcere del piede diabetico: risultati di uno studio prospettico osservazionale

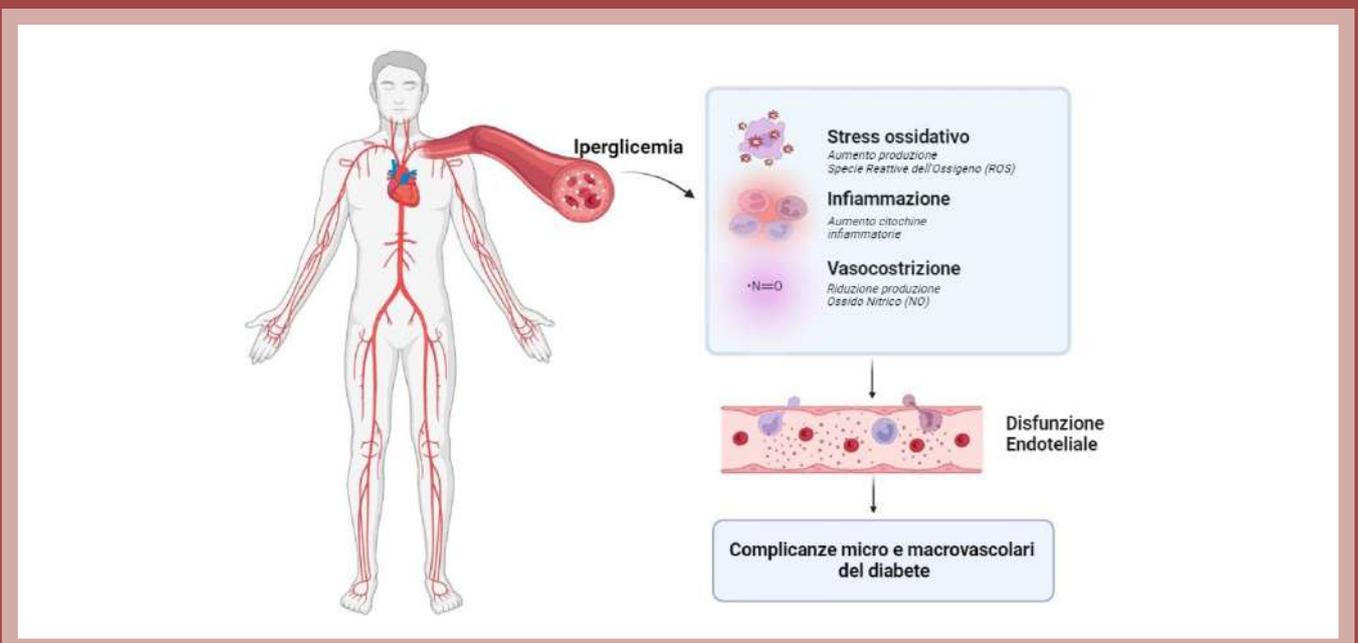
– JOURNAL CLUB

– MEDICINA TRASLAZIONALE

Il ruolo dei progenitori delle cellule endoteliali nel diabete mellito

– AGGIORNAMENTO CLINICO

Diabete mellito dopo trattamento con ocrelizumab per sclerosi multipla primariamente progressiva



il Diabete

Organo ufficiale della
Società Italiana di Diabetologia

Direttore Scientifico

Sebastiano Squatrito (Catania)

Co-direttori

Massimiliano Cavallo (Terni, YoSID)

Carla Greco (Modena, YoSID)

Giuseppe Defeudis (Roma)

Gloria Formoso (Chieti)

Lucia Frittitta (Catania)

Simona Frontoni (Roma)

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

Comitato di Redazione

Benedetta Bonora (Padova)

Fabio Broglio (Torino)

Stefano Ciardullo (Milano)

Francesca Cinti (Roma-Cattolica)

Giuseppe Daniele (Pisa)

Angela Dardano (Pisa)

Ilaria Dicembrini (Firenze)

Antonio Di Pino (Catania)

Francesca Fiory (Napoli)

Luigi Laviola (Bari)

Anna Leonardini (Bari)

Roberta Lupoli (Napoli-Federico II)

Ernesto Maddaloni (Roma-Sapienza)

Daria Maggi (Roma-Campus)

Alessandro Mantovani (Verona)

Lorella Marselli (Pisa)

Matteo Monami (Firenze)

Mario Luca Morieri (Padova)

Antonio Nicolucci (Pescara)

Emanuela Orsi (Milano)

Pia Clara Pafundi (Napoli-Vanvitelli)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Francesca Porcellati (Perugia)

Ivana Rabbone (Torino)

Elena Succurro (Catanzaro)

Dario Tuccinardi (Roma-Campus)

CONSIGLIO DIRETTIVO SID

Presidente

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)

Responsabili di Redazione

Andrea Tumminia (Catania)

Agostino Milluzzo (Catania)

Rosario Le Moli (Catania)

UFFICIO DI PRESIDENZA SID 2022-2024

Angelo Avogaro (Padova)

Agostino Consoli (Chieti)

Raffaella Buzzetti (Roma)

Sommario

Ricordando Simona

di Anna Solini

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

153 **L'eterogeneità del diabete autoimmune**

Ernesto Maddaloni, Raffaella Buzzetti

162 **Epidemiologia e fattori di rischio del diabete di tipo 1**

Niccolò Pellegrini, Giulia Leanza e Paolo Pozzilli

173 **Il diabete monogenico. Una condizione clinica frequentemente trascurata**

Antonella Marucci, Rosa Di Paola, Claudia Menzaghi e Vincenzo Trischitta

184 – **EDITORIALI** A CURA DI SIMONA FRONTONI

Ulcere ischemiche del piede diabetico: terapia cellulare autologa come possibile trattamento adiuvante

Matteo Monami

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

Efficacia della terapia cellulare in pazienti con ischemia critica ed ulcere del piede diabetico: risultati di uno studio prospettico osservazionale

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

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

A CURA DI CARLA GRECO E MASSIMILIANO CAVALLO

Il ruolo dei progenitori delle cellule endoteliali nel diabete mellito

Miriam Longo, Antonietta Maio, Graziella Botta, Paola Caruso, Katherine Esposito

213 – **AGGIORNAMENTO CLINICO** A CURA DI GIUSEPPE DEFEUDIS

Diabete mellito dopo trattamento con ocrelizumab per sclerosi multipla primariamente progressiva

Marco Grasso, Vera Frison, Nino Cristiano Chillelli, Alessio Filippi, Giorgia Costantini, Cristina Vilotti, Natalino Simioni

GOLDEN CIRCLE



il Diabete

Vol. 35, N. 3, ottobre 2023

Direzione Scientifica

Sebastiano Squatrito, Catania

Direttore Responsabile

Stefano Melloni

Associato all'Unione Stampa Periodica Italiana



Copyright © 2023 SID
Società Italiana di Diabetologia
CC BY 4.0 License
ISBN online 979-12-5477-326-0
ISSN online 1720-8335
DOI 10.30682/ildia2303

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

Fondazione Bologna University Press

Via Saragozza 10, 40123 Bologna
tel. (+39) 051 232 882; fax (+39) 051 221 019
e-mail: info@buponline.com
www.buponline.com

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

Autorizzazione Tribunale di Milano
n. 706 del 2/11/1988

Avvertenza ai lettori

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

Ricordando Simona

È recentemente venuta a mancare la professoressa Simona Frontoni, lasciando un vuoto incolmabile nella comunità diabetologica italiana.

Non è questo il contesto adatto ad illustrare in modo dettagliato il suo curriculum; desidero però ricordare alcuni aspetti del suo profilo professionale e personale.

Simona si è spesa senza risparmio per il bene della Società Italiana di Diabetologia, ricoprendo moltissimi incarichi (dal direttivo nazionale ai gruppi di studio), ma soprattutto ha servito la SID, senza chiedere mai niente in cambio. È stata una dei pilastri fondanti del processo di modernizzazione che ha generato il volto attuale della nostra società scientifica. Il comitato didattico è, sostanzialmente, nato con Lei, ed è stata Lei a dare, per prima, un enorme impulso alla formazione, comprendendone l'importanza nella economia di una società scientifica moderna, proponendo nuove formule e soluzioni, adoperandosi con grande impegno e dedizione per attrarre fondi pubblici e privati atti a sostenere i programmi didattici che aveva ideato e disegnato in modo completamente innovativo.

È stata estremamente attiva anche nell'ambito della sua Regione, il Lazio, contribuendo in modo straordinario alla crescita e alla capillare diffusione delle conoscenze diabetologiche applicate all'attività clinica e alla cura dei pazienti, ed avviando il processo di interazione e collaborazione tra SID e AMD. Per anni ha curato l'organizzazione della Giornata Mondiale del Diabete, e proprio durante la celebrazione di questo importante momento, due anni fa, ha avvertito i primi segni della sua malattia.

Simona era, innanzitutto, una diabetologa competentissima. Non ha mai smesso di leggere e di studiare, era aggiornata, ed era in grado di indicarti l'ultima review su quasi tutti gli argomenti di diabetologia clinica, o di consigliarti le letture più appropriate e più recenti su molti argomenti di endocrinologia e di medicina interna. Era un medico molto preparato, che però non faceva mai pesare queste sue capacità. Era dotata di una sorta di understatement, che era parte integrante della sua educazione e della sua finezza d'animo.

Simona si è dedicata con grande impegno e serietà anche all'attività didattica, contribuendo alla formazione culturale di un enorme numero di studenti in Medicina e di specializzandi in Endocrinologia, che ha seguito in modo attento, puntuale e altruista.

Dal punto di vista scientifico, Simona è stata una ricercatrice brillante e costantemente produttiva, e una guida costante per i giovani che lavoravano con Lei. Si è impegnata a fondo, e con successo, anche nella Società Europea per lo Studio del Diabete, arrivando a ricoprire la prestigiosa carica di coordinatrice del Gruppo di Studio Europeo sulla neuropatia diabetica, uno dei suoi molti interessi di ricerca. Sul piano scientifico, la sua principale cifra come ricercatrice è stata però quella della passione, unita al rigore metodologico e ad una non comune onestà intellettuale.



Al di là di questi aspetti, squisitamente professionali, mi sia infine consentito un ricordo personale. Ho conosciuto Simona 34 anni fa, il giorno del suo matrimonio, e da allora c'è sempre stato un filo che ci ha indissolubilmente unite, e che non si spezzerà mai. Simona è una persona che ho sempre molto ammirato, e alla quale ho sempre voluto assomigliare, anche se non ci sono riuscita. Ho ammirato la sua compostezza unita ad un grande entusiasmo nel modo di fare le cose, la sua attitudine diplomatica a costruire e a tessere rapporti utili per il bene di tutti. Ho ammirato, soprattutto, la sua grande empatia: era una persona che univa e non divideva mai, e questo è emerso anche dall'enorme partecipazione e dall'ondata emotiva che ha accompagnato la Sua perdita, che non ha conosciuto confini geografici nell'ambito della diabetologia nazionale ed internazionale. Simona non era mai divisiva, era accogliente e comprensiva, era indipendente nei suoi giudizi e nelle sue valutazioni, era equilibrata e non si lasciava mai condizionare da influenze esterne.

La principale dote alla base del suo modo di essere era però un'altra: Simona era una donna in grado di coniugare una grande ironia con una profonda intelligenza. Era ben consapevole della difficoltà che quotidianamente si incontrano nella nostra professione e, in qualche modo, ha sempre portato avanti in maniera non banale quella che potremmo definire una "empatia di genere", senza mai però rimarcare in modo vittimistico le difficoltà delle donne, ma impegnandosi in modo paritario.

Simona era una straordinaria professionista, una donna di grande equilibrio, una docente disponibile e attenta ai bisogni degli studenti, una ricercatrice appassionata e rigorosa. Per me era, soprattutto, l'Amica della vita. So che i suoi occhi brillanti e il suo incredibile sorriso continueranno a segnare la mia strada e quella dei tanti che, come me, hanno avuto la fortuna di conoscerla, La hanno apprezzata e Le hanno voluto bene.

Anna Solini

L'eterogeneità del diabete autoimmune

Heterogeneity of autoimmune diabetes

Ernesto Maddaloni, Raffaella Buzzetti

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2303a>

ABSTRACT

Autoimmune diabetes is a heterogeneous disease, encompassing both type 1 diabetes, characterized by fast progression towards an insulin-dependent state, and latent autoimmune diabetes in adults (LADA), considered a less severe form of autoimmune diabetes with a mild metabolic decompensation. An extensive genetic, phenotypic, and humoral heterogeneity is recognized even within the group of people with LADA. In this review, we discuss the pathological and clinical heterogeneity of autoimmune diabetes, highlighting the current understanding and gaps in knowledge.

KEYWORDS

Heterogeneity, autoimmune diabetes, type 1 diabetes, autoimmune diabetes, personalized medicine.

INTRODUZIONE

Il diabete autoimmune è una patologia eterogenea caratterizzata da una patogenesi poligenica e multifattoriale, che conduce a diverse manifestazioni cliniche della malattia. Sebbene l'esordio classico del diabete di tipo 1 sia caratterizzato da sintomi acuti e da una rapida progressione verso uno stato di insulino-dipendenza, la maggior parte dei pazienti con diabete autoimmune dell'adulto presenta un processo autoimmune meno grave ed uno scompenso metabolico più lieve alla diagnosi rispetto al diabete mellito di tipo 1 ad esordio giovanile (1). Tali pazienti sono definiti come affetti da diabete autoimmune latente dell'adulto (LADA) (2). In accordo con i criteri della International Immunology Society (3), il LADA è diagno-

sticato in soggetti di età superiore a 30 anni che non necessitano di terapia insulinica per almeno sei mesi dopo la diagnosi nonostante la positività per uno o più autoanticorpi tipici del diabete autoimmune. Questi criteri diagnostici, ancora ampiamente utilizzati sia in ambito di ricerca che clinico, risultano però poco specifici in quanto non prendono in considerazione caratteristiche chiave come titolo auto-anticorpale, caratteristiche dell'insulite autoimmune, o velocità di perdita della riserva funzionale beta-cellulare successivamente ai primi sei mesi dopo la diagnosi. Questa generica definizione implica, quindi, che il LADA venga diagnosticato in persone con caratteristiche genotipiche, fenotipiche ed umorali molto diverse, comprendendo diversi gradi di insulino-resistenza e di autoimmunità (4). Questo può in parte spiegare la diversa collocazione nosologica del LADA da parte delle società scientifiche, venendo riconosciuto come una forma di diabete di tipo 1 dall'American Diabetes Association (5), e come una forma di diabete a se stante dalla World Health Organization (6).

Oltre all'ampia eterogeneità del LADA, l'ampliamento delle conoscenze circa l'immunopatologia del diabete di tipo 1 ha, più di recente, evidenziato l'esistenza di una eterogeneità fisiopatologica anche all'interno del diabete di tipo 1 classico, riconoscendone diversi endotipi con importanti risvolti clinici e di ricerca.

In questa rassegna verrà discussa l'eterogeneità del diabete autoimmune, considerando le sue diverse manifestazioni in un *continuum* fisiopatologico, con territori di confine in termini di patogenesi e di presentazione clini-

ca non ben definiti e talvolta sovrapposti. Nello specifico procederemo con una disamina dell'eterogeneità fisiopatologica della malattia, discutendo le evidenze emerse a tal riguardo da studi condotti sia nei soggetti con diabete di tipo 1 classico che nei soggetti con LADA, per poi discuterne le implicazioni cliniche, anche evidenziando le fondamentali differenze tra queste due forme principali di diabete autoimmune.

ETEROGENEITÀ FISIOPATOLOGICA DEL DIABETE AUTOIMMUNE

L'eterogeneità del diabete autoimmune deriva da una complessa e variabile fisiopatologia, caratterizzata da un'interazione ancora non del tutto definita tra predisposizione genetica e fattori ambientali. È infatti opinione diffusa a livello scientifico internazionale che diversi *pathway* fisiopatologici possono condurre al diabete autoimmune, traducendosi però in diverse manifestazioni cliniche di malattia che verosimilmente necessiteranno di diversi approcci terapeutici. In quest'ottica, da alcuni anni viene utilizzato sempre più frequentemente nel diabete autoimmune il termine "endotipo", volendo suggerire l'esistenza di più processi fisiopatologici che possono concorrere all'insorgenza di una patologia, con ogni endotipo che necessita di un approccio terapeutico diverso e che determina diverse implicazioni prognostiche (7). Almeno due diversi endotipi di diabete autoimmune sono oggi proposti: l'endotipo 1 (T1DE1), caratterizzato da una età di insorgenza precoce (tipicamente inferiore ai 7 anni), insulite autoimmune molto aggressiva con estesa distruzione delle cellule beta e probabile difetto nel metabolismo della proinsulina, e l'endotipo 2 (T1DE2), caratterizzato da insorgenza in età adolescenziale o adulta, da un infiltrato linfocitario delle isole di Langerhans meno rappresentato, e da un iniziale risparmio di alcune cellule beta, con successivo declino della capacità secretoria di insulina a velocità variabile (8). Alcuni autori propongono l'esistenza di ulteriori endotipi di diabete autoimmune, suggerendo nello specifico come il LADA possa costituire un endotipo a sé di diabete autoimmune, piuttosto che una forma di T1DE2 a più lenta progressione (9). A tal proposito, saranno necessari ulteriori studi meccanicistici ed istologici per chiarire eventuali differenze nella fisiopatologia tra T1DE2 e LADA.

Eterogeneità genetica

Se i principali geni di suscettibilità al diabete di tipo 1 si trovano nella regione HLA (*Human Leukocyte Antigen*) di classe II sul cromosoma 6p2, con la maggiore suscettibilità conferita dagli aplotipi DRB1*03-DQB1*0201 e DRB1*04-DQB1*0302, è ben riconosciuto che esiste una eterogeneità nella predisposizione genetica tra sottogruppi di pazienti con diabete autoimmune che differiscono per età di insorgenza, per velocità di progressione di malattia, o per etnia.

Ad esempio, lo studio TEDDY ha dimostrato che diversi aplotipi HLA si associano in maniera diversa sia all'età di insorgenza di malattia, che alla tipologia di primo auto-anticorpo riscontrabile nel siero dei bambini arruolati: i bambini portatori di aplotipi DRB1*03-DQB1*0201 erano più grandi alla diagnosi ed erano più propensi a presentare autoreattività primaria contro GAD65, mentre quelli portatori di DRB1*04-DQB1*0302 presentavano una età di insorgenza inferiore e mostravano autoreattività contro l'insulina come prima risposta anticorpale (10-11). Inoltre, nei casi di diabete autoimmune ad insorgenza in età adulta, l'ereditabilità della malattia è inferiore, con minori tassi di concordanza tra gemelli omozigoti, minore frequenza degli aplotipi HLA ad alto rischio e maggiore frequenza di quelli protettivi (12-13). Infine, sebbene la maggior parte degli studi genetici sul diabete autoimmune siano stati condotti su individui di etnia caucasica, studi recenti effettuati in coorti di altre etnie hanno rivelato che esiste una variabilità tra gruppi etnici nel rischio genetico conferito dagli alleli HLA (14).

L'eterogeneità genetica del diabete autoimmune impatta significativamente sulla attendibilità e, quindi, sull'applicabilità, degli score di rischio genetico (*genetic risk score*, GRS) per diabete di tipo 1 in diversi contesti. Ad esempio, i GRS per diabete di tipo 1 hanno un basso potere predittivo di malattia per il diabete autoimmune ad insorgenza in età adulta. Inoltre, devono essere sviluppati e applicati GRS specifici per le diverse etnie (14).

Anche la suscettibilità genetica al LADA differisce in parte da quella al diabete di tipo 1 classico. Sebbene anche la prima sia legata a molti dei geni associati al diabete di tipo 1 classico, come HLA, PTPN22, INS o CTLA4 (15-17), il LADA condivide diverse caratteristiche genetiche con il diabete di tipo 2. Le varianti del gene TCF7L2 sono state associate al LADA, soprattutto nei pazienti con un basso titolo di GADA (18). Anche il gene FTO è stato associato

al LADA, ma in misura minore rispetto a TCF7L2. Queste associazioni suggeriscono che nella popolazione con LADA si possono ritrovare caratteristiche genetiche predisponenti sia al diabete di tipo 1 che al diabete di tipo 2.

Eterogeneità umorale

La presenza di specifici autoanticorpi sierici diretti contro la GAD65 (GADA), contro la tirosina fosfatasi IA-2 (IA-2A), contro l'insulina nativa (IAA), o contro il trasportatore dello zinco ZnT8 costituisce il principale marcatore clinico che consente di porre diagnosi di diabete autoimmune (5).

Esiste tuttavia un'eterogeneità in termini di titolo, di numero e di tipo degli autoanticorpi ritrovabili nel siero dei pazienti con diabete autoimmune, che si correla con diverse caratteristiche cliniche e che, in alcuni casi, potrebbe anche indicare una diversa fisiopatologia dell'autoimmunità contro le cellule beta. Lo studio NIRAD, finanziato dalla SID, ha dimostrato una distribuzione bimodale del titolo dei GADA nei pazienti con LADA, identificando così due sottopopolazioni, "a basso" e "ad alto" titolo GADA, con differenti caratteristiche cliniche (come discusso più avanti in questa rassegna - vedi paragrafo *Eterogeneità clinica nei pazienti con LADA*) (19). Le differenze tra le due sottopopolazioni sono state confermate da studi genetici che hanno riportato una diminuzione delle frequenze dei genotipi HLA a rischio alto e moderato passando da un titolo anticorpale alto ad uno basso (19). In maniera simile, nei pazienti con LADA anche il genotipo PTPN22 si associa con un alto titolo GADA e, viceversa, l'allele di rischio per il diabete di tipo 2, TCF7L2, si associa con un basso titolo GADA. Oltre al titolo anticorpale, anche la positività a più autoanticorpi si associa ad una maggiore intensità della risposta autoimmune e a diverse caratteristiche cliniche, che determinano poi anche un diverso rischio di complicanze macrovascolari (20-21). Inoltre, l'intensità della risposta autoimmune e della carenza insulinica sembrano essere direttamente proporzionali al numero di autoanticorpi riscontrabili nel siero dei pazienti; ovvero maggiori nei pazienti con almeno tre autoanticorpi.

Anche l'epitopo specifico riconosciuto dagli autoanticorpi può variare tra i diversi pazienti, associandosi ancora una volta a caratteristiche cliniche diverse. Tra i GADA, quelli diretti contro le regioni centrale e carbossi-terminale della proteina GAD65 sono i più predittivi della progressione verso il diabete di tipo 1 clinico (22). Quando

studiati nei pazienti LADA, i GADA specifici per le regioni centrale e carbossi-terminale, rispetto a quelli diretti contro la regione N-terminale, si riscontrano più frequentemente in pazienti più giovani, con GADA ad alto titolo, con concentrazioni sieriche di C-peptide più basse, con aumentato rischio di tiroidite autoimmune, e con maggiore propensione ad andare incontro a terapia insulinica (23). In maniera simile, l'immunoreattività contro diversi domini proteici IA2 caratterizzano distinti fenotipi di LADA. Gli autoanticorpi diretti contro il costrutto IA2₍₂₅₆₋₇₆₀₎, che è diverso dal costrutto tradizionalmente riconosciuto dagli IA-2A riscontrabili nel siero delle persone con diabete di tipo 1 (IA-2A_{IC(605-979)}), si ritrovano più frequentemente nelle persone con LADA che risultano negative per i GADA e che mostrano un fenotipo che assomiglia maggiormente al diabete di tipo 2, con maggiore BMI e maggiore circonferenza vita, e minori tassi di progressione verso l'insulino-dipendenza (24-25). Questi autoanticorpi, descritti anche in soggetti obesi e con normale tolleranza glucidica (26), sono diretti contro un costrutto della tirosina fosfatasi IA2 che comprende la porzione N-terminale extracellulare, quindi maggiormente accessibile alle cellule presentanti l'antigene rispetto alla porzione intracellulare. Anche il frammento IA-2_{EC(26-577)} della proteina IA-2 è stato recentemente proposto come un nuovo epitopo (che tuttavia si sovrappone a IA-2₍₂₅₆₋₇₆₀₎) coinvolto nell'autoimmunità pancreatica nel LADA. Come per gli autoanticorpi anti IA-2₍₂₅₆₋₇₆₀₎, anche quelli contro IA-2_{EC(26-577)} sono stati trovati in un sottogruppo di pazienti con diabete autoimmune ad esordio in età adulta con un fenotipo simile al diabete di tipo 2.

Queste osservazioni suggeriscono che gli antigeni self extra-citoplasmatici possano agire come *trigger* di autoimmunità in presenza di un basso grado di infiammazione, accelerando così la perdita di cellule beta nei pazienti obesi predisposti all'autoimmunità, mentre il riconoscimento degli antigeni intracellulari sarebbe limitata ai soggetti con una risposta immunitaria più intensa. Pertanto, lo sviluppo dell'autoimmunità nei pazienti con LADA potrebbe insorgere sia come conseguenza delle risposte infiammatorie croniche associate all'obesità, che come risultato di un *trigger* ambientale più specifico che può promuovere l'attivazione di un processo autoimmune simile a quello che si verifica nel diabete di tipo 1 (4). Infine, anche l'affinità degli autoanticorpi per i loro bersagli è stata recentemente associata ai diversi fenotipi

clinici di LADA. A tal proposito, il test di elettro-chemiluminescenza (ECL) è in grado di discriminare tra anticorpi specifici per il diabete ad alta e a bassa affinità (27). I pazienti che sono ECL-GAD65⁻, infatti, mostrano un fenotipo simile al diabete di tipo 2 ed una perdita di cellule beta più lenta, mentre i pazienti ECL-GAD65⁺ mostrano una più rapida perdita della funzione delle cellule beta e richiedono un trattamento con insulina più precoce (28). Una piccola percentuale di soggetti, inoltre, risulta negativa allo screening autoanticorpale, nonostante alcune evidenze che dimostrano la presenza di una patologia autoimmune a carico delle cellule beta del pancreas. È questo il caso del T-LADA, una forma di diabete dell'adulto caratterizzato da un più rapido declino funzionale delle cellule beta rispetto al diabete di tipo 2 e dalla presenza di cellule T circolanti autoreattive nei confronti di autoantigeni pancreatici (identificate mediante ELISPOT), nonostante l'assenza dei noti autoanticorpi marcatori di diabete autoimmune (29).

Eterogeneità nelle caratteristiche dell'insulite autoimmune

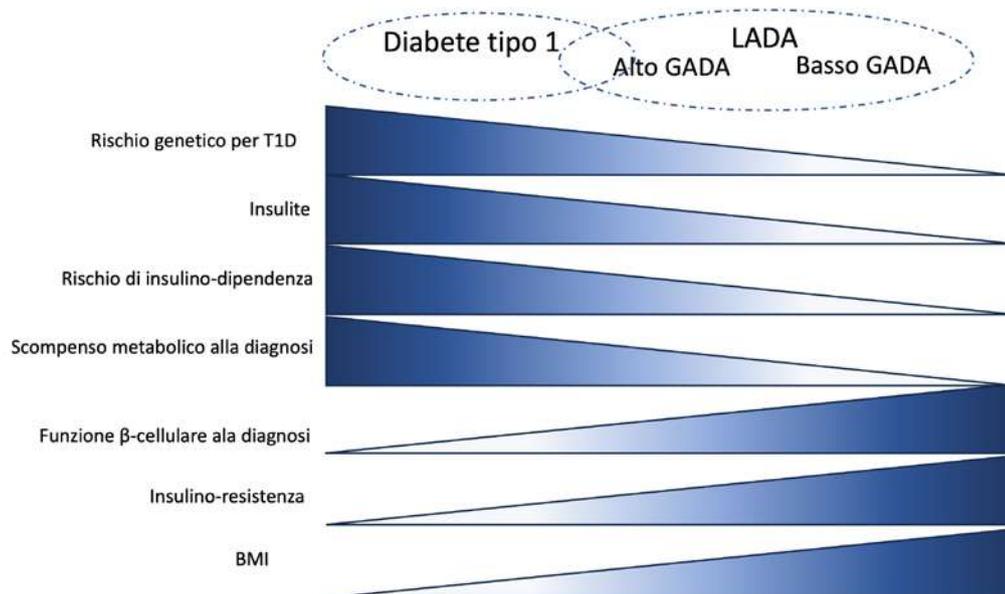
Alcuni studi hanno evidenziato come la diversa intensità del processo infiammatorio a carico delle isole di Langerhans si correli a differenti manifestazioni cliniche nei diversi pazienti affetti da diabete autoimmune. In particolare, è stato evidenziato come l'infiltrato di cellule del sistema immunitario differisca tra persone con diagnosi di diabete di tipo 1 sulla base dell'età di insorgenza (8). Immagini di immunofluorescenza elaborate su campioni di pancreas ottenuti poco dopo l'esordio di malattia da pazienti con diabete autoimmune diagnosticato in età adulta mostrano una evidente conservazione di un buon numero di cellule beta, con ridotta infiltrazione linfocitica rispetto al diabete di tipo 1 ad insorgenza in età precoce. In questi campioni, la maggior parte dei linfociti è disposta in periferia, e pochissimi sono migrati verso il nucleo dell'isolotto. Al contrario, immagini simili ottenute su campioni da pazienti pediatrici poco dopo l'esordio di diabete di tipo 1 mostrano linfociti che hanno violato la capsula dell'isolotto e molti disposti in prossimità delle cellule beta, a costituire un esteso infiltrato linfocitario, coerentemente con un più aggressivo attacco autoimmune. Anche la tipologia di linfociti infiltranti differisce in sottogruppi di pazienti con diabete autoimmune esordito ad età diverse (8, 30). Nei pazienti

con esordio prima dei 7 anni l'infiltrato infiammatorio pancreatico comprende un gran numero sia di cellule T CD8⁺ che di cellule B CD20⁺ (8, 30). Al contrario, in bambini con esordio dopo i 13 anni il numero assoluto di cellule T CD8⁺ è tipicamente inferiore e le cellule B CD20⁺ vengono ritrovate solo raramente (8, 30). Questi modelli sorprendentemente diversi sono tipici di pazienti che sviluppano diabete autoimmune in età diverse (8).

La presenza di insulite è stata dimostrata anche nei pazienti affetti da LADA. Uno studio scintigrafico del pancreas effettuato con IL-2 radiomarcata con ^{99m}Tc ha dimostrato la presenza di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) attivate nel pancreas dei soggetti LADA, in maniera simile a quanto osservato nei soggetti con diabete di tipo 1 (31). Tuttavia, un successivo studio istologico effettuato su campioni di parenchima pancreatico ottenuti sia da soggetti con LADA che da soggetti con diabete di tipo 1 ha messo in luce alcune importanti differenze tra queste due forme di diabete autoimmune. Solo nei campioni di parenchima ottenuti dai soggetti con LADA si osservava, infatti, la presenza di zone di pancreas apparentemente risparmiate dell'infiltrato infiammatorio. Inoltre, nelle isole con infiltrato infiammatorio delle persone con LADA, rispetto a quelle delle persone con T1D, si contava un minor numero di cellule T CD8⁺ rispetto al numero di macrofagi ed una differente espressione di citochine pro- ed anti-infiammatorie (aumentata espressione di IL-10 e diminuita espressione di TNF-alpha nel LADA rispetto al diabete di tipo 1) (32).

ETEROGENEITÀ CLINICA DEL DIABETE AUTOIMMUNE

Come conseguenza dell'eterogeneità fisiopatologica discussa nei paragrafi precedenti, il diabete autoimmune si presenta come una patologia clinicamente eterogenea (Fig. 1). Se il diabete di tipo 1 classico è infatti la forma di diabete più frequente in giovane età ed è caratterizzato da un esordio acuto, ovvero con scompenso metabolico e chetosi/chetoacidosi, il diabete autoimmune dell'adulto comprende un ampio spettro di fenotipi eterogenei. Una proporzione di pazienti che si attesta su circa 10% (21) presenta infatti un esordio simile al classico diabete di tipo 1 diagnosticato in giovane età, mentre il rimanente 90% esordisce con manifestazioni cliniche più lievi, il LADA appunto.

Figura 1 ♦ Spettro fisiopatologico e clinico del diabete autoimmune

Differenze cliniche tra diabete di tipo 1 e LADA

Il diabete di tipo 1 si presenta con sintomi e segni legati all'iperglicemia e alla iperchetonemia, quali poliuria, polidipsia, perdita di peso, chetoacidosi. Questi sintomi sono raramente presenti, oppure presenti ma di lieve entità, alla diagnosi di LADA. Il LADA, infatti, è una forma di diabete autoimmune ad insorgenza tardiva e a più lenta progressione verso uno stato di deficit insulinico assoluto rispetto al diabete di tipo 1 classico. Come conseguenza del deficit insulinico meno importante rispetto al diabete di tipo 1, i pazienti affetti da LADA non presentano il corredo sintomatologico tipico dei pazienti con diabete di tipo 1 classico all'esordio. Più spesso, infatti, i pazienti con LADA presentano caratteristiche cliniche simili ai pazienti con diabete di tipo 2. Ciò può comportare, a volte, un'erronea classificazione dei casi di LADA, che in Italia rappresenta circa il 5% dei casi di diabete insorti in età adulta. Esistono, tuttavia, alcune caratteristiche cliniche che si associano più frequentemente ad una diagnosi di LADA rispetto al diabete di tipo 2, e che pertanto possono guidare il medico a sospettare questa forma di diabete. Tra queste: un BMI nel range del normopeso/sovrappeso, la presenza di altre patologie autoimmuni, la familiarità per patologie autoimmuni, uno scompenso metabolico all'esordio mediamente più rilevante ed un'età alla diagnosi inferiore a 50 anni. Anche altre caratteristiche, oltre alle differenti modalità di esordio, possono differen-

ziare il LADA dal diabete di tipo 1 classico. Tra queste: un BMI più elevato, presenza di insulino-resistenza, declino del C-peptide lento nel tempo, aumentato rischio cardiovascolare alla diagnosi. Inoltre, più raramente nel LADA si osserva una simultanea positività per più di un autoanticorpo diretto contro antigeni beta-cellulari.

Eterogeneità clinica tra i pazienti con LADA

L'eterogeneità del LADA deriva dalla sua stessa definizione, in quanto diagnosticabile in qualsiasi adulto con diabete che non richieda insulina e che sia positivo per qualsiasi autoanticorpo del diabete, indipendentemente dal titolo, dal numero o dalla specificità dell'epitopo. L'eterogeneità del LADA si manifesta in diversi fenotipi clinici, che vanno da quelli caratterizzati da una prevalente resistenza all'azione dell'insulina a quelli con una prevalente carenza di insulina. Ognuno di questi fenotipi può essere associato a diversi marcatori autoimmuni e metabolici. Esistono infatti diverse evidenze che dimostrano che il titolo e il numero di autoanticorpi sono entrambi correlati a diversi fenotipi metabolici e clinici della malattia. In particolare, come discusso in precedenza, lo studio NIRAD ha dimostrato la presenza di una distribuzione bimodale del titolo GADA nella popolazione con LADA. Rispetto ai pazienti con LADA con basso titolo di autoanticorpi e/o con positività verso un solo autoanticorpo, quelli con un titolo più alto e/o con simultanea positività

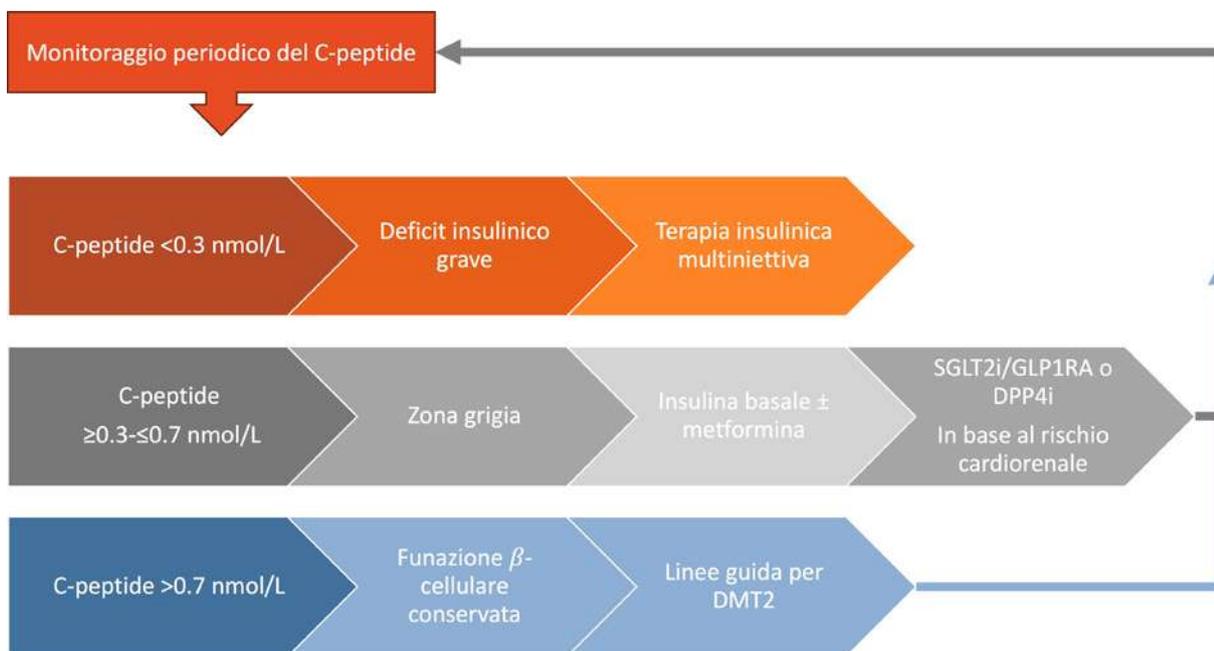
a più di un autoanticorpo si presentano di solito con peggiore scompenso glicemico, un BMI inferiore, più veloce progressione verso uno stato di insulino-dipendenza, ed una prevalenza inferiore della sindrome metabolica, con migliori livelli di colesterolo HDL e di trigliceridi e migliori valori di pressione arteriosa (19-21, 33-36). Inoltre, una maggiore frequenza di altri autoanticorpi organo-specifici - tra cui gli autoanticorpi anti-perossidasi tiroidea, quelli anti surrene (anti 21-idrossilasi), gli anticorpi anti transglutaminasi tissutale e anti cellule parietali - è stato riscontrata in pazienti con LADA che avevano titoli GADA elevati rispetto a quelli con titoli bassi, confermando così l'aumentata intensità del processo autoimmune nel primo gruppo di pazienti (37). Questi risultati potrebbero avere importanti implicazioni cliniche e suggeriscono uno screening regolare per altri autoanticorpi organo-specifici (indicativi di altre patologie autoimmuni) nei pazienti con LADA, soprattutto in quelli con un alto titolo dei GADA.

IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE DELL'ETEROGENEITÀ DEL LADA

L'ampia eterogeneità del LADA può avere importanti implicazioni terapeutiche, rendendo difficile determinare un algoritmo terapeutico *a priori*, e richiedendo un approc-

cio di medicina personalizzata che tenga conto delle caratteristiche intrinseche di ciascun paziente (4, 38). Se, infatti, la terapia insulinica è il trattamento più ovvio e sicuramente necessario in tutti i casi di diabete autoimmune con importante deficit insulinico (39), la tempistica corretta per iniziare la terapia insulinica nel LADA può variare considerevolmente a seconda del decorso naturale della malattia, in quanto, come discusso, alcune persone manterranno un'adeguata funzione delle cellule beta anche per decenni, mentre altre manifesteranno una significativa carenza di insulina più precocemente (40). Alcune caratteristiche cliniche (titolo GADA, presenza di più autoanticorpi pancreatici, età di esordio e BMI) possono aiutare a prevedere la progressione verso uno stato di insulino-dipendenza (36). Tuttavia, non ci sono ad oggi dati da studi randomizzati e controllati con una durata sufficiente del follow-up per trarre conclusioni sul momento ottimale per iniziare la terapia insulinica. A questo proposito, la concentrazione del C-peptide, che riflette la capacità endogena di secrezione di insulina, è stata proposta come marcatore clinico utile per decidere se e quando iniziare l'insulina nelle persone con LADA (41). Secondo quanto proposto in un recente *consensus report* internazionale sulla terapia del LADA, sono tre le categorie di concentrazione di C-peptide da considerare per indirizzare le scelte terapeutiche nel LADA (Fig. 2) (40, 42):

Figura 2 ♦ Ruolo del dosaggio del peptide C nell'algoritmo terapeutico semplificato del LADA



- concentrazioni inferiori a 0.3 nmol/L (<0.9ng/ml) dovrebbero raccomandare un regime di terapia insulinica multiniettiva, come nel diabete di tipo 1 classico;
- concentrazioni tra 0.3 e 0.7 nmol/L (≥ 0.9 ng/ml ≤ 2.1 ng/ml), considerati come valori nella zona grigia, dovrebbero indirizzare verso un algoritmo terapeutico modificato rispetto a quello raccomandato per il diabete di tipo 2, dovendo considerare di iniziare una terapia insulinica basale \pm metformina in combinazione con altre terapie con comprovati benefici di riduzione del rischio di complicanze croniche (come GLP1-RA o SGLT2i, questi ultimi consigliati solo se BMI ≥ 27 kg/m²), come da raccomandazioni per il diabete di tipo 2, e/o con possibili benefici sul C-peptide sulla base dei pochi dati presenti in letteratura (come alcune gliptine (43-45));
- concentrazioni superiori a 0.7 nmol/L (>2.1 ng/ml), dovrebbero consentire di utilizzare l'algoritmo terapeutico consigliato per il diabete di tipo 2 (39), con l'indicazione però a valutare periodicamente le concentrazioni di C-peptide per monitorare il declino della funzione beta-cellulare nel tempo e l'eventuale necessità di cambiare l'approccio terapeutico.

CONCLUSIONI

Il numero di persone con diabete autoimmune è in crescita in tutto il mondo come conseguenza sia dell'incidenza in costante aumento che della maggiore aspettativa di vita delle persone affette (46). Questa popolazione in crescita è esposta ad un elevato rischio sia di complicanze vascolari classiche, sia di nuove complicanze emergenti (47-48), rendendo il diabete autoimmune un fardello enorme per le persone che convivono con la malattia, i loro parenti e l'intera società. Una conoscenza sempre più approfondita della malattia, sia in termini fisiopatologici che di manifestazioni cliniche, è quindi necessaria al fine di implementare nell'immediato le più giuste terapie per migliorarne gli *outcome* a lungo termine, mantenendo anche viva l'ambizione di sviluppare nuove strategie terapeutiche in grado di prevenire o curare la patologia. L'ampia eterogeneità del diabete autoimmune, maggiormente manifesta e riconosciuta nel diabete autoimmune dell'adulto, ma, come discusso, presente anche nella più classica forma ad insorgenza in età pediatrica, emerge come uno dei principali ostacoli a questi

obiettivi. Nonostante gli importanti passi avanti compiuti finora nella comprensione della immunopatologia del diabete autoimmune, sono ancora diversi gli aspetti da definire circa l'esistenza e l'impatto dell'eterogeneità patogenetica, metabolica e clinica. Dobbiamo quindi essere consapevoli che il futuro del diabete autoimmune risiede nel riconoscimento della sua complessità, nell'ottica di una medicina di precisione che possa modificare il decorso della malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. Maddaloni E, Pozzilli P. Tipo 1 e LADA in crescita: prevenzione e assistenza ottimale. In: Bonora E, Sesti G (ed). Il diabete in Italia. Bologna Bononia University Press, 2016, pp. 157-163.
2. Redondo MJ. LADA: time for a new definition. *Diabetes* 62(2): 339-340, 2013.
3. Fourlanos S, Dotta F, Greenbaum CJ, Palmer JP, Rolandsen O, Colman PG, et al. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent. *Diabetologia* 48(11): 2206-2212, 2005.
4. Buzzetti R, Zampetti S, Maddaloni E. Adult-onset autoimmune diabetes: current knowledge and implications for management. *Nat Rev Endocrinol* 8; 13(11): 674-686, 2017.
5. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care* 45(Suppl 1): S17-38, 2022.
6. Organization WH, WHO, World Health Organization, WHO, Organization WH. Classification of diabetes mellitus, 2019.
7. Battaglia M, Ahmed S, Anderson MS, Atkinson MA, Becker D, Bingley PJ, et al. Introducing the Endotype Concept to Address the Challenge of Disease Heterogeneity in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 43(1): 5-12, 2020.
8. Redondo MJ, Morgan NG. Heterogeneity and endotypes in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* Jun 19, 2023.
9. Fiorina P, Pozzilli P. Unveiling a novel type 1 diabetes endotype: Opportunities for intervention. *Diabetes Metab Res Rev* 11; 38(5), 2022.
10. Krischer JP, Lynch KF, Lernmark Å, Hagopian WA, Rewers MJ, She J-X, et al. Genetic and Environmental Interactions Modify the Risk of Diabetes-Related Autoimmunity by 6 Years of Age: The TEDDY Study. *Diabetes Care* 40(9): 1194-1202. 2017.

11. Krischer JP, Liu X, Lernmark Å, Hagopian WA, Rewers MJ, She J-X, et al. Predictors of the Initiation of Islet Autoimmunity and Progression to Multiple Autoantibodies and Clinical Diabetes: The TEDDY Study. *Diabetes Care* 45(10): 2271-2281, 2022.
12. Mishra R, Åkerlund M, Cousminer DL, Ahlqvist E, Bradfield JP, Chesni A, et al. Genetic Discrimination Between LADA and Childhood-Onset Type 1 Diabetes Within the MHC. *Diabetes Care* 43(2): 418-425, 2020.
13. Zhu M, Xu K, Chen Y, Gu Y, Zhang M, Luo F, et al. Identification of Novel T1D Risk Loci and Their Association With Age and Islet Function at Diagnosis in Autoantibody-Positive T1D Individuals: Based on a Two-Stage Genome-Wide Association Study. *Diabetes Care* 42(8): 1414-1421, 2019.
14. Onengut-Gumuscu S, Chen W-M, Robertson CC, Bonnie JK, Farber E, Zhu Z, et al. Type 1 Diabetes Risk in African-Ancestry Participants and Utility of an Ancestry-Specific Genetic Risk Score. *Diabetes Care* 42(3): 406-415, 2019.
15. Howson JMM, Rosinger S, Smyth DJ, Boehm BO, Aldinger G, Aufschild J, et al. Genetic analysis of adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes* 60(10): 2645-2653, 2011.
16. Nisticò L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet* 5(7): 1075-1080, 1996.
17. Cosentino A, Gambelunghe G, Tortoioli C, Falorni A. CTLA-4 gene polymorphism contributes to the genetic risk for latent autoimmune diabetes in adults. *Ann N Y Acad Sci* 958: 337-340, 2022.
18. Zampetti S, Spoletini M, Petrone A, Capizzi M, Arpi ML, Tiberti C, et al. Association of TCF7L2 gene variants with low GAD autoantibody titre in LADA subjects (NIRAD Study 5). *Diabet Med* 27(6): 701-714, 2010.
19. Buzzetti R, Di Pietro S, Giaccari A, Petrone A, Locatelli M, Suraci C, et al. High titer of autoantibodies to GAD identifies a specific phenotype of adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes Care* 30(4): 932-938, 2007.
20. Maddaloni E, Coleman RL, Pozzilli P, Holman RR. Long-term risk of cardiovascular disease in individuals with latent autoimmune diabetes in adults (UKPDS 85). *Diabetes, Obes Metab* 21(9): 2115-2122, 2019.
21. Maddaloni E, Lessan N, Al Tikriti A, Buzzetti R, Pozzilli P, Barakat MT. Latent Autoimmune Diabetes in Adults in the United Arab Emirates: Clinical Features and Factors Related to Insulin-Requirement. *PLoS One* 10(8): e0131837, 2015.
22. Wyatt RC, Brigatti C, Liberati D, Grace SL, Gillard BT, Long AE, et al. The first 142 amino acids of glutamate decarboxylase do not contribute to epitopes recognized by autoantibodies associated with Type 1 diabetes. *Diabet Med* 35(7): 954-963, 2018.
23. Achenbach P, Hawa MI, Krause S, Lampasona V, Jerram ST, Williams AJK, et al. Autoantibodies to N-terminally truncated GAD improve clinical phenotyping of individuals with adult-onset diabetes: Action LADA 12. *Diabetologia*, 2018.
24. Buzzetti R, Spoletini M, Zampetti S, Campagna G, Marandola L, Panimolle F, et al. Tyrosine phosphatase-related islet antigen 2(256-760) autoantibodies, the only marker of islet autoimmunity that increases by increasing the degree of BMI in obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 38(3): 513-520, 2015.
25. Tiberti C, D'Onofrio L, Panimolle F, Zampetti S, Maddaloni E, Buzzetti R. Immunoreactivities Against Different Tyrosine-Phosphatase 2 (IA-2)(256-760) Protein Domains Characterize Distinct Phenotypes in Subjects With LADA. *Front Endocrinol (Lausanne)* 24; 13(June): 1-7, 2022.
26. Tiberti C, Zampetti S, Capoccia D, Campagna G, Lucantoni F, Anastasi E, et al. Evidence of diabetes-specific autoimmunity in obese subjects with normal glucose tolerance. *Diabetes Metab Res Rev* 34(8): e3055, 2018.
27. Yu L. Islet autoantibody detection by electrochemiluminescence (ECL) assay. *Methods Mol Biol*, 2016.
28. Zhu Y, Qian L, Liu Q, Zou J, Zhou Y, Yang T, et al. Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibody Detection by Electrochemiluminescence Assay Identifies Latent Autoimmune Diabetes in Adults with Poor Islet Function. *Diabetes Metab J*, 2019.
29. Liang H, Cheng Y, Tang W, Cui Q, Yuan J, Huang G, et al. Clinical manifestation and islet β -cell function of a subtype of latent autoimmune diabetes in adults (LADA): positive for T cell responses in phenotypic type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 56(11): 1225-1230, 2019.
30. Smith MJ, Cambier JC, Gottlieb PA. Endotypes in T1D: B lymphocytes and early onset. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 27(4): 225-230, 2020.
31. Signore A, Capriotti G, Chianelli M, Bonanno E, Galli F, Catalano C, et al. Detection of insulinitis by pancreatic

- scintigraphy with ^{99m}Tc -Labeled IL-2 and MRI in patients with LADA (Action LADA 10). *Diabetes Care*, 2015.
32. Jörns A J A, Wedekind D W D, Jähne J J J, Lenzen S L S, Jörns (A.J.) A, Wedekind (D.W.) D, et al. Pancreas Pathology of Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) in Patients and in a LADA Rat Model Compared With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 69(4): db190865, 2020.
 33. Yang L, Liu X, Liang H, Cheng Y, Huang G, Zhou Z. Pathophysiological characteristics in patients with latent autoimmune diabetes in adults using clamp tests: evidence of a continuous disease spectrum of diabetes. *Acta Diabetol* 56(11): 1217-1224, 2019.
 34. Li X, Yang L, Zhou Z, Huang G, Yan X. Glutamic acid decarboxylase 65 autoantibody levels discriminate two subtypes of latent autoimmune diabetes in adults. *Chin Med J* 116(11): 1728-1732, 2003.
 35. Bacha F, Redondo MJ. Decline Pattern of Beta Cell Function in LADA: Relationship to GAD Autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 105(8): e3008-9, 2020.
 36. Li X, Chen Y, Xie Y, Xiang Y, Yan X, Huang G, et al. Decline Pattern of Beta-cell Function in Adult-onset Latent Autoimmune Diabetes: an 8-year Prospective Study. *J Clin Endocrinol Metab* 105(7): 2331-2340, 2020.
 37. Zampetti S, Capizzi M, Spoletini M, Campagna G, Leto G, Cipolloni L, et al. GADA titer-related risk for organ-specific autoimmunity in LADA subjects subdivided according to gender (NIRAD study 6). *J Clin Endocrinol Metab* 97(10): 3759-3765, 2012.
 38. Maddaloni E, Moretti C, Mignogna C, Buzzetti R. Adult-onset autoimmune diabetes in 2020: An update. *Maturitas* 137: 37-44, 2020.
 39. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, et al. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care* 46(Suppl1): S140-57, 2023.
 40. Buzzetti R, Maddaloni E, Gaglia J, Leslie RD, Wong FS, Boehm BO. Adult-onset autoimmune diabetes. *Nat Rev Dis Prim* 8(1): 63, 2022.
 41. Maddaloni E, Bolli GB, Frier BM, Little RR, Leslie RD, Pozzilli P, et al. C-peptide determination in the diagnosis of type of diabetes and its management: A clinical perspective. *Diabetes Obes Metab* 24(10): 1912-1926, 2022.
 42. Buzzetti R, Tuomi T, Mauricio D, Pietropaolo M, Zhou Z, Pozzilli P, et al. Management of Latent Autoimmune Diabetes in Adults: A Consensus Statement From an International Expert Panel. *Diabetes* 69(10): 2037-2047, 2020.
 43. Buzzetti R, Pozzilli P, Frederich R, Iqbal N, Hirshberg B. Saxagliptin improves glycaemic control and C-peptide secretion in latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Diabetes Metab Res Rev*, 2016.
 44. Zhao Y, Yang L, Xiang Y, Liu L, Huang G, Long Z, et al. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin maintains β -cell function in patients with recent-onset latent autoimmune diabetes in adults: one year prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 99(5): E876-80, 2014.
 45. Yang L, Liang H, Liu X, Wang X, Cheng Y, Zhao Y, et al. Islet Function and Insulin Sensitivity in Latent Autoimmune Diabetes in Adults Taking Sitagliptin: A Randomized Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 106(4): e1529-41, 2021.
 46. Gregory GA, Robinson TIC, Linklater SE, Wang F, Colaguri S, de Beaufort C, et al. Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. *lancet Diabetes Endocrinol* 10(10): 741-760, 2022.
 47. Maddaloni E, Moretti C, Del Toro R, Sterpetti S, Ievolella MV, Arnesano G, et al. Risk of cardiac autonomic neuropathy in latent autoimmune diabetes in adults is similar to type 1 diabetes and lower compared to type 2 diabetes: A cross-sectional study. *Diabet Med* 38(2): e14455, 2021.
 48. Leanza G, Maddaloni E, Pitocco D, Conte C, Palermo A, Maurizi AR, et al. Risk factors for fragility fractures in type 1 diabetes. *Bone* 125: 194-199, 2019.

Epidemiologia e fattori di rischio del diabete di tipo 1

Epidemiology and risk factors of type 1 diabetes

Niccolò Pellegrini, Giulia Leanza e Paolo Pozzilli

Laboratorio di Endocrinologia e Diabetologia, Università Campus Bio-Medico di Roma

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2303b>

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is a globally rising autoimmune condition. Genetics, viral infections, and environmental factors contribute to T1D. Comprehending these factors, along with the underlying pathophysiological mechanisms, gives rise to the concept of distinct “endotypes” within the disease, paving the way for enhanced strategies in prevention and early intervention. This review highlights the importance of understanding these multifaceted characteristics in the context of T1D, providing a comprehensive analysis of its epidemiology and risk factors, synthesizing information from relevant literature.

KEYWORDS

Type 1 diabetes, epidemiology, genetic background, environment, personalized medicine.

INTRODUZIONE

Il diabete di tipo 1 (DMT1) è una malattia complessa che continua a sfidare il panorama della sanità pubblica in tutto il mondo ed ha un impatto significativo sulla vita di coloro che ne sono colpiti. Precedentemente definito diabete insulino-dipendente o ad insorgenza giovanile, il DMT1 è una malattia cronica caratterizzata da una distruzione autoimmune delle cellule beta pancreatiche produttrici di insulina. Si tratta della malattia cronica più comune nell'infanzia e sebbene venga generalmente chiamato anche diabete giovanile, un elevato numero di pazienti riceve la diagnosi anche dopo i 20 anni di età (1). Nel DMT1, l'effetto della carenza di insulina gioca un ruolo chiave nel determinare lo squilibrio

metabolico legato alla malattia. Nelle persone colpite infatti, la condizione di iperglicemia cronica si associa frequentemente a complicanze microvascolari e macrovascolari a lungo termine, che causano retinopatia, neuropatia, nefropatia e sindrome coronarica acuta, con conseguente aumento di morbilità e mortalità. Una gestione efficace della malattia è essenziale per la regolazione del glucosio ematico e, riducendone le fluttuazioni, prevenire o ritardare queste complicanze a lungo termine. Nonostante i meccanismi alla base del DMT1 rimangano ancora poco chiari, è ampiamente accettato che sia i fattori genetici che quelli ambientali svolgano un ruolo critico nel suo sviluppo. Come anticipato, il DMT1 è una condizione che può portare a gravi complicanze a lungo termine e avere significative implicazioni psicologiche e sulla qualità della vita. Ad oggi, nonostante un notevole miglioramento predittivo e terapeutico, rimane purtroppo una patologia per cui non vi è cura. Le persone colpite necessitano di un trattamento quotidiano con insulina ed un costante monitoraggio della glicemia insieme ad attività fisica regolare e una dieta sana, al fine di rallentarne le complicanze associate.

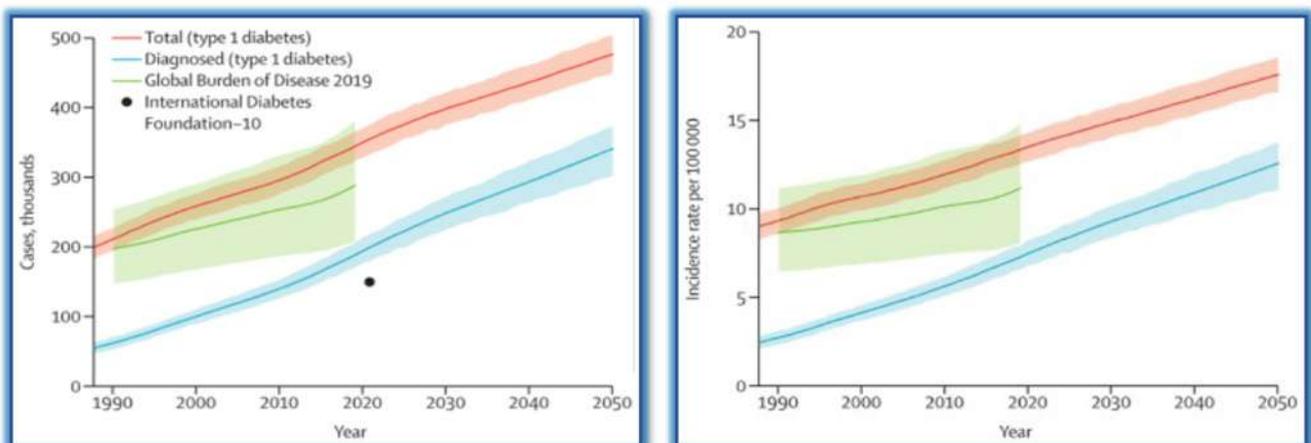
EPIDEMIOLOGIA DEL DIABETE DI TIPO 1

Fra i Paesi in cui si registra il numero più alto di decessi legati al diabete troviamo la Cina con circa 1,4 milioni di persone ogni anno. Si riscontrano mortalità elevate anche in Stati Uniti (0,7 milioni), India (0,6 milio-

ni), Pakistan (0,4 milioni) e Giappone (0,2 milioni). In particolare, il Pakistan si distingue come il paese con la percentuale più elevata di morti al di sotto dei 60 anni di età, attribuibili al diabete (35,5% dei casi) (2). Al contrario, la Russia e la Repubblica Ceca presentano le percentuali più basse, con ciascuna di esse che registra circa l'1% dei decessi totali. In accordo con alcuni autori, nel 2021 l'aspettativa di vita media per un bambino di 10 anni con diagnosi di DMT1, variava da una media di 13 anni nei Paesi a basso reddito a 65 anni nei Paesi ad alto reddito (3). Sembra inoltre che nei prossimi anni assisteremo ad un incremento globale delle persone colpite da DMT1, con ben il 94% dell'aumento totale di casi di diabete che si verificherà nei Paesi a basso e medio reddito (4). Il DMT1 sta emergendo come una sfida globale crescente, con variazioni geografiche significative che richiedono ulteriori ricerche insieme ad una maggiore disponibilità di dati. Secondo recenti ricerche, solamente la metà dei Paesi nel mondo, che rappresentano il 76% della popolazione mondiale, dispone di dati riguardo l'incidenza di bambini al di sotto dei 15 anni, mentre soltanto 26 di questi Paesi hanno informazioni sull'incidenza degli adolescenti compresi tra i 15 e i 19 anni. In accordo con gli ultimi dati dell'*International Diabetes Federation* (IDF), nel mondo vivono più di 8,75 mi-

lioni di individui con DMT1 e secondo alcune previsioni questa cifra raggiungerà i 17,4 milioni entro il 2040 (3). L'incidenza globale del DMT1 è stimata in 15 casi ogni 100.000 persone e la prevalenza è di 5,9 casi ogni 10.000 persone. I dati aggiornati sulla prevalenza della malattia indicano la presenza nel mondo di 651.700 casi di DMT1 1 tra i ragazzi e le ragazze di età compresa tra 0 e 14 anni, mentre considerando la fascia di età inferiore ai 20 anni questo numero aumenta a 1.211.900 casi. Ogni anno un significativo numero di giovani riceve la diagnosi di questa malattia, con circa 108.200 nuovi casi registrati tra i bambini e gli adolescenti (0-14 anni). Ampliando l'analisi per includere anche coloro che hanno meno di 20 anni, il numero delle nuove diagnosi annuali raggiunge quota 149.500 (4) (Tab. 2). In un interessante lavoro del 2022, Ward e colleghi, hanno stimato l'incidenza del DMT1 in bambini e adolescenti (0-19 anni), utilizzando un modello di proiezione della malattia che tiene conto del livello di incertezza nei parametri analizzati dal 1990 al 2050 (5). Gli autori hanno stimato 355.900 nuovi casi totali di DMT1 a livello globale nel 2021, con un incremento fino a 476.700 casi previsti entro il 2050 (Fig. 1). I valori ottenuti in questo studio, oltre a riflettere una tendenza in aumento delle diagnosi, mostrano in maniera interessante come siano

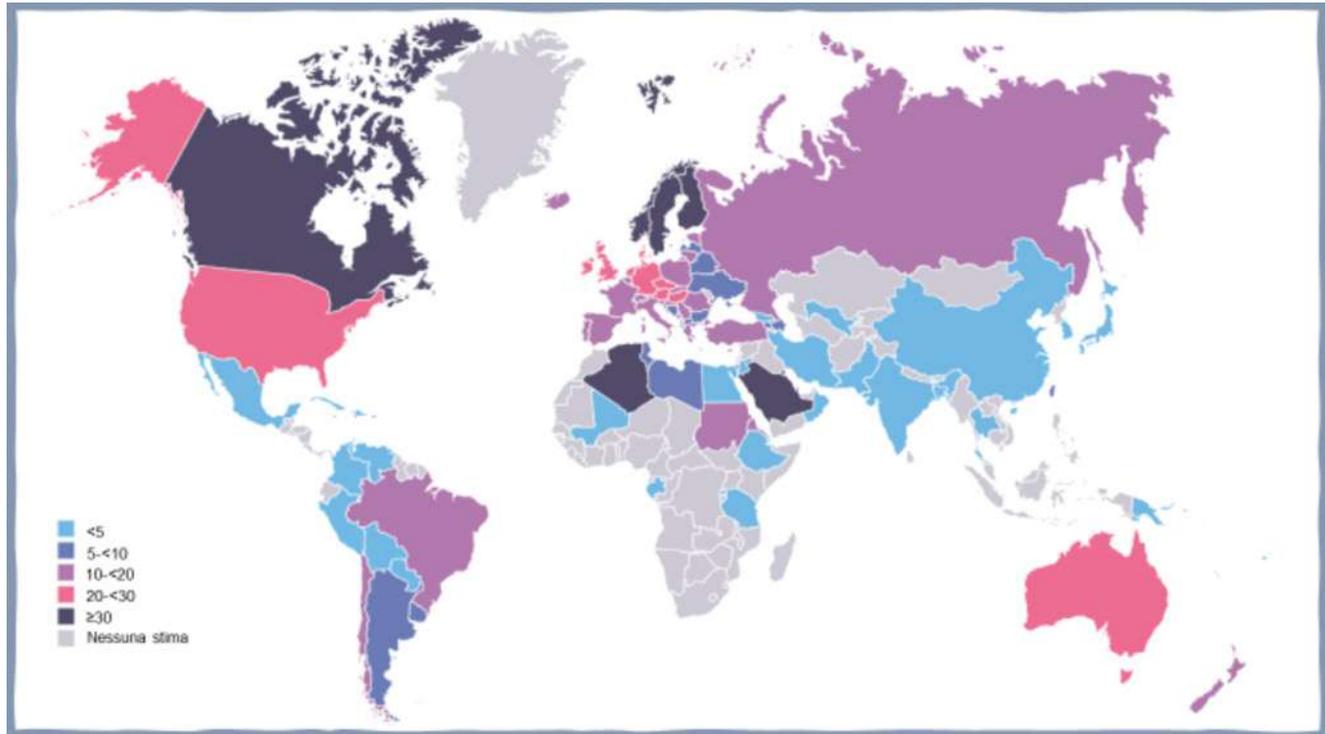
Figura 1 ◆ Proiezione dell'incidenza globale del diabete di tipo 1. Mod da (6)



Gli autori hanno stimato 355.900 nuovi casi totali di diabete di tipo 1 a livello globale nel 2021 tra i bambini e gli adolescenti (0-19 anni)

In accordo con le stesse proiezioni, si prevede che il numero totale di casi infantili di diabete di tipo 1 aumenterà a 476.700 nel 2050.

Figura 2 ◆ Tassi stimati di incidenza totale del DMT1 nell'infanzia e nell'adolescenza (0-14 anni) per paese nel 2021. Mod da (3)



stati diagnosticati nel 2021 solo il 56% dei casi totali di DMT1, il che suggerisce come l'incidenza totale a livello globale in questa fascia di età, sia maggiore di quanto stimato in precedenza nello stesso anno. L'ultimo rapporto dell'IDF mostra la distribuzione geografica della malattia utilizzando i dati provenienti da 215 Paesi divisi in 7 grandi regioni (Fig. 2). Dai risultati si evince come la regione europea (59 paesi considerati), con 295.000 persone e circa 31.000 nuovi casi all'anno ha il più alto numero di bambini e adolescenti affetti da DMT1, seguita dalla regione del Sud-Est Asiatico, con 244.500 persone e 25.700 nuove diagnosi (3). Spostandoci dalle regioni dell'America settentrionale e Caraibi, a quelle di Medio Oriente e Africa settentrionale, notiamo che entrambe presentano un numero elevato di casi di DMT1 (192.500 casi), seguite dalla regione del Pacifico occidentale (107.900 casi) e dall'America centrale e meridionale (121.300 casi). L'Africa registra il minor numero di diagnosi con circa 59.500 casi accertati. Quest'ultima, in particolare, ha visto un drastico aumento dei giovani con meno di 20 anni affetti da DMT1 dal 2019 anche se, come fanno notare gli autori, questa variabilità rispetto

ai report degli anni precedenti è in parte attribuibile ad una fluttuazione nella quantità di dati disponibili. Addentrandoci nel particolare dei singoli Paesi analizzati dal report, notiamo come l'India ha attualmente il più alto numero stimato di casi di DMT1 (229.400) tra i giovani nella fascia di età 0-19 anni, seguita da Stati Uniti (157.900), Brasile (92.300) e Cina (56.000). In particolare, l'India ha anche l'incidenza più alta nella stessa fascia di età (0-19 anni) con 24.000 nuovi casi, seguita da Stati Uniti (18.200), Brasile (8.900) e Algeria (6.500). In relazione alle dimensioni demografiche invece, la Finlandia si attesta prima per tasso di incidenza annuo (0-14 anni), con 52,2 nuovi casi ogni 100.000 persone all'anno, seguita dalla Svezia (44,1/100.000/anno) e Kuwait (41,7/100.000/anno) (Tab. 1). In Italia, come nel resto del mondo, la stragrande maggioranza dei casi di diabete è di tipo 2, rappresentando oltre 3,5 milioni di persone (il 5,6% della popolazione residente). Secondo i dati dell'I-STAT, si stima che nel nostro Paese, il DMT1 costituisca l'8,5% dei casi totali di diabete, con un totale di circa 300.000 casi registrati ed una prevalenza di circa 0,5%. Negli ultimi anni, l'incidenza del DMT1 in Italia è sta-

Tabella 1 ◆ Incidenza e prevalenza del diabete di tipo 1 nel mondo

POSIZIONE	TERRITORIO O PAESE	NUMERO DI BAMBINI E ADOLESCENTI CON DMT1 (0-19 ANNI) IN MIGLIAIA	TERRITORIO O PAESE	NUMERO DI NUOVI CASI/ANNO (0-19 ANNI) IN MIGLIAIA	TERRITORIO O PAESE	TASSO DI INCIDENZA PER 100.000 ABITANTI ALL'ANNO (0-14 ANNI)
1	India	229.400	India	24.0	Finlandia	52.2
2	Stati Uniti	157.900	Stati Uniti	18.2	Svezia	44.1
3	Brasile	92.300	Brasile	8.9	Kuwait	41.7
4	Cina	56.000	Algeria	6.5	Qatar	38.1

Tabella 2 ◆ Numero di bambini e adolescenti con diabete di tipo 1 nel mondo per fasce d'età

	2019	2021
(0-14 ANNI)		
Prevalenza (casi esistenti)	600.900	651.700
Incidenza annua (nuovi casi)	98.200	108.300
(0-19 ANNI)		
Prevalenza (casi esistenti)	1.110,100	1.211,900
Incidenza annua (nuovi casi)	128.900	149.500

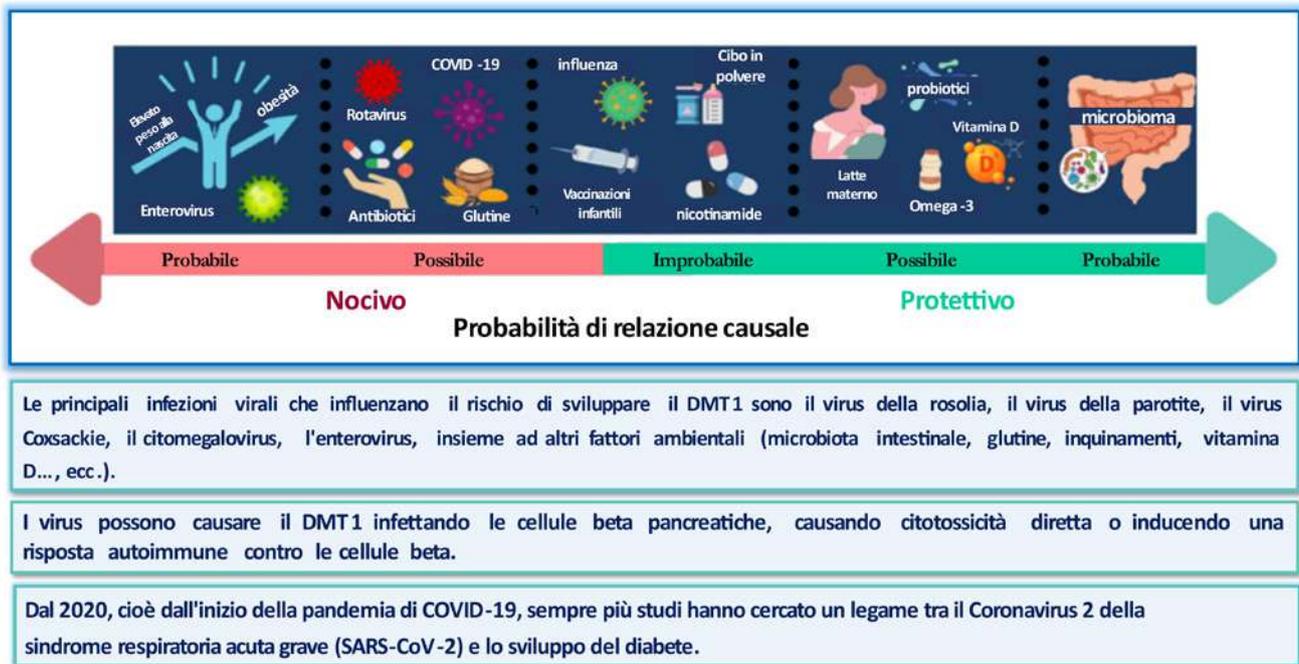
ta stimata a 9,3 casi ogni 100.000 abitanti all'anno, con una percentuale più alta di casi in età pediatrica che fra gli adolescenti. Inoltre, se ci si sposta fra le diverse regioni della penisola, una menzione speciale va alla Sardegna che con uno dei tassi di incidenza più alti al mondo (45 per 100.000 persone/anno) rappresenta una vera e propria eccezione (6). Le cause di questa variazione sono ancora poco chiare, ma sembrano legate alla particolare distribuzione nella popolazione di alcuni genotipi nonché a condizioni ambientali, tra cui l'igiene e le infezioni infantili (7-8).

I FATTORI DI RISCHIO DEL DIABETE DI TIPO 1

Il DMT1 è una malattia multifattoriale, la cui suscettibilità è un argomento complesso che coinvolge una combinazione di fattori genetici ed ambientali non ancora del tutto definiti (Tab. 3). La predisposizione genetica aumenta il rischio di insorgenza della malattia, unitamente ai determinanti ambientali, fra cui le infezioni virali e le abitudini alimentari (Fig. 3). Comprendere questa complessa interazione è fondamentale per prevenire e gestire la malattia.

Tabella 3 ◆ Fattori di rischio del diabete di tipo 1

CLASSI DI RISCHIO - POSSIBILI AGENTI
Predisposizione genetica HLA-DR3-DQ2/HLA-DR4-DQ8
Infezioni Rubella, Coxsackie, Enterovirus, COVID-19
Dieta latte artificiale vaccino, glutine, vit. D, omega 3
Microbiota intestinale Firmicutes, Bacteroidetes, allattamento, parto cesareo

Figura 3 ◆ Determinanti ambientali del diabete di tipo 1. Mod da Zorena K. et al. *Biology* 2022

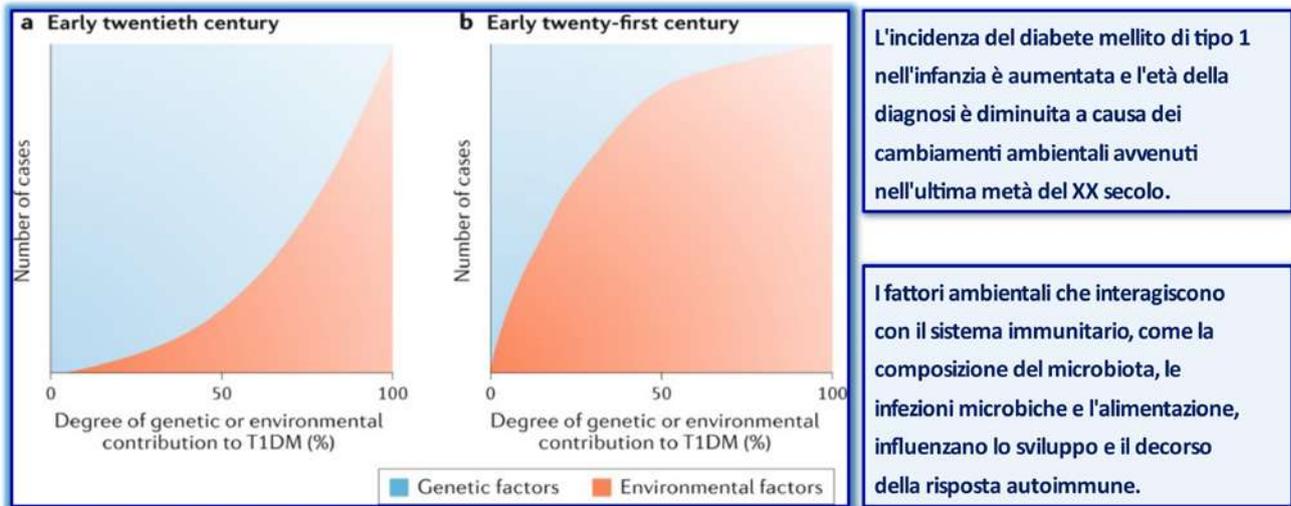
a. Fattori genetici

Le scoperte fatte finora, in particolare grazie a studi di associazione genomica (GWAS) e metanalisi, hanno mostrato più di 50 loci associati ad una maggiore suscettibilità nei confronti della malattia e molti altri continuano ad essere identificati (9-10). Fin dalla metà degli anni Settanta è noto che la predisposizione genetica a sviluppare il DMT1 è associata al complesso genico HLA situato sul cromosoma 6p21, con gli aplotipi HLA-DRB1*03 (DR3) e HLA-DRB1*04 (DR4) in associazione con DQB1*03:02 (DQ8) determinano la maggiore suscettibilità nei confronti della malattia. Analizzando la distribuzione degli aplotipi fra diverse etnie, notiamo che nel 90% della popolazione caucasica, il diabete è fortemente associato agli antigeni DR3 (DRB1 * 03: 01-DQB1 * 02: 01) e DR4 (DRB1 * 04: 01-DQB1 * 03: 02) mentre nella maggior parte delle popolazioni asiatiche, il DMT1 è associato agli aplotipi DR4 (DRB1 * 04: aplotipi 05-DQB1 * 04: 01) e DR9 (DRB1 * 09: 01-DQB1 * 03: 03) (11). Al contrario è stato visto come altre combinazioni alleliche siano in grado di conferire un certo grado di protezione dall'insorgenza della malattia. Dal punto di vista clinico, forse la manifestazione più estrema del DMT1 si osserva in India e Asia orientale con un alto numero di casi di diabete fulminante, che spesso si presenta in associazione con HLA-DRB1*04:05-

DQB1*04:01 in assenza di autoanticorpi e con una infiammazione pancreatica diffusa (12). Ad oggi, il rischio generale di sviluppare il DMT1 al di sotto dei 20 anni è di circa 1:300 nelle famiglie senza predisposizione genetica. Alcuni studi hanno mostrato che negli Stati Uniti, i figli di madri con DMT1 hanno un rischio di sviluppare anch'essi la malattia di circa 1 su 40, mentre per i figli di padri con lo stesso tipo di diabete, il rischio è di circa 1 su 15 nati (13). Questa probabilità aumenta a circa l'8% fra fratelli e sorelle. Nonostante ciò, secondo alcune fonti, l'aumento dell'incidenza di DMT1 registrato negli ultimi decenni in particolare all'interno di popolazioni geneticamente stabili, sembra essere una conferma del ruolo svolto dall'ambiente nell'eziopatogenesi della malattia. Infatti, in accordo con diversi studi, il numero di casi relativi con una forte componente genetica è notevolmente diminuita fra i primi del Novecento e gli inizi del XXI secolo (14) (Fig. 4).

b. Fattori ambientali

Numerose ricerche hanno evidenziato il collegamento del DMT1 con alcuni tipi di virus come la Rubella, il virus Coxsackie B3 e B4, alcuni Enterovirus ed il COVID-19 (15-16). Sembra che questi virus possano determinare sia un danno da tossicità acuta, con distruzione diffusa

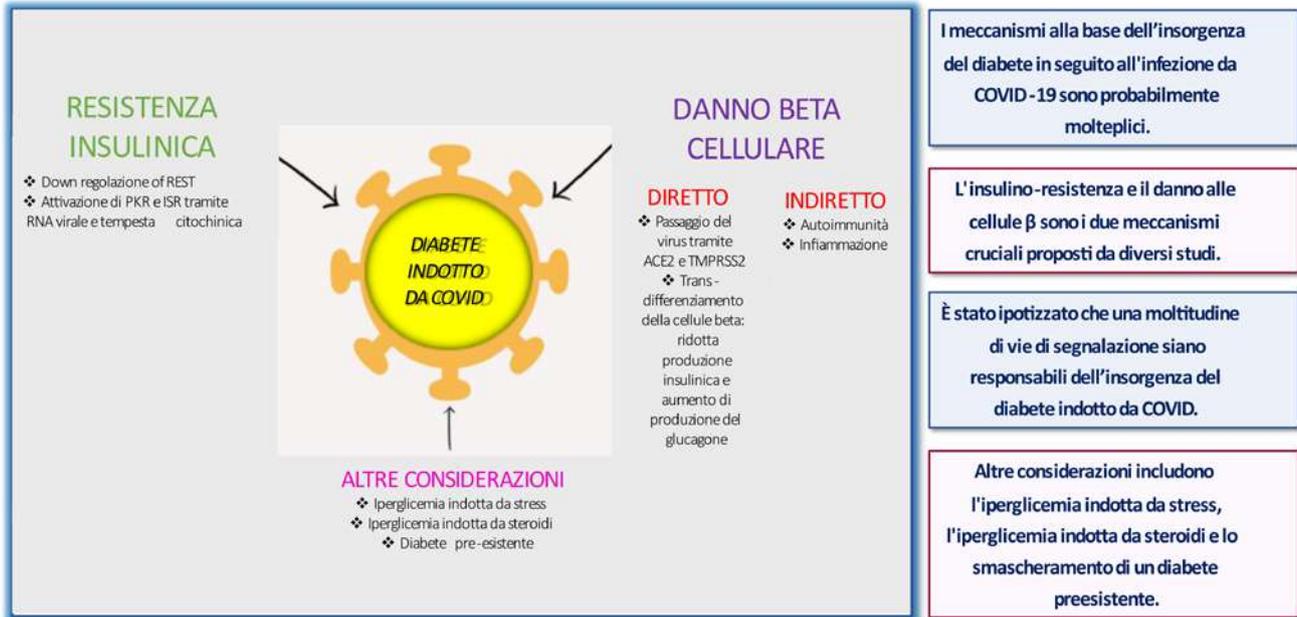
Figura 4 ♦ La patogenesi eterogenea del diabete di tipo 1. Mod da (15)

delle cellule beta, che una risposta autoimmune cross-reattiva diretta verso le cellule beta del pancreas, anche in seguito ad un'esposizione virale ripetuta. In particolare, un ampio numero di studi ha confermato che il nuovo virus SARS-CoV-2 può da una parte influire sullo sviluppo del DM1, danneggiando le cellule pancreatiche (soprattutto nei pazienti con infezioni gravi) e dall'altra esacerbare la sintomatologia e le complicanze del diabete (vasculopatia, coagulopatia). Questo virus è in grado di entrare nei tessuti pancreatici a livello insulare attraverso alcuni recettori espressi sulle cellule bersaglio fra cui la serina proteasi transmembrana 2 (TMPRSS2), l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) e la dipeptidil peptidasi-4 (DPP-4) (17). Una volta penetrato, il virus causa un'infezione che determina una transdifferenziazione cellulare che, a sua volta, causa una diminuzione di espressione dell'insulina, un aumento di glucagone e produzione di tripsina (18). Queste alterazioni portano in ultima analisi alla disregolazione del metabolismo glucidico riscontrato nei pazienti con COVID-19. Alcuni autori hanno suggerito che ACE2 svolge anche un ruolo importante aumentando l'infiammazione e danneggiando indirettamente le cellule del pancreas (19). In condizioni normali, questo recettore svolge un'azione antinfiammatoria scindendo l'angiotensina II nella forma inattiva con proprietà vasodilatatorie e antifibrotiche. Tuttavia, nell'infezione da SARS-CoV-2 si verifica una deplezione di ACE2 e pertanto, i tessuti coinvolti possono avere livelli significativamente più bassi di Angiotensina 1-7 (inatti-

va), con conseguenti effetti deleteri quali infiammazione e aumento della coagulazione. Inoltre, l'angiotensina II è anche in grado di aumentare l'infiltrazione tissutale di macrofagi e monociti perpetrando il processo infiammatorio.

Oltre al danno diretto e indiretto, diversi studi hanno preso in considerazione anche la resistenza insulinica fra i meccanismi coinvolti nell'insorgenza del diabete in pazienti con il virus.

In uno studio recente in cui è stata è una coorte di pazienti con COVID-19 senza una storia precedente di malattie metaboliche e con un intervallo di BMI normale, è stato osservato un aumento della resistenza insulinica. In particolare, il gruppo di ricercatori ha identificato una riduzione dell'espressione del fattore di trascrizione REST (fattore di trascrizione di silenziamento RE1), associata a cambiamenti nell'espressione genica di fattori cruciali per il metabolismo del glucosio e dei lipidi, tra cui mieloperossidasi, apelina e miostatina. In questi pazienti, le analisi hanno rivelato un aumento dei livelli di acido propionico e acido isobutirrico, ossia acidi grassi a catena corta correlati alla resistenza insulinica in modelli animali (17, 20). Alcuni autori hanno mostrato una possibile via di segnalazione implicata nella resistenza insulinica indotta da COVID-19. Classificata come risposta integrata allo stress (ISR), questa via porta all'attivazione di una famiglia di protein-chinasi fra cui la proteina chinasi dipendente da RNA a doppio filamento (PKR) e la chinasi ER PKR-like (PERK). Nel caso dell'infezione da SARS-CoV-2, i

Figura 5 ◆ Meccanismi di insorgenza del diabete mellito indotto da COVID-19. Mod da (18)

frammenti di RNA virale possono causare l'attivazione di PKR con conseguente insulino-resistenza. È stato infatti mostrato come queste proteine inducano la fosforilazione serinica dei substrati del recettore dell'insulina (IRS) con conseguente downregulation della via di segnalazione della stessa.

È noto inoltre come in molti pazienti COVID-19 ospedalizzati, la tempesta di citochine (ossia l'aumento dell'espressione di citochine pro-infiammatorie come IL-6 e TNF-alfa) attiva la famiglia delle serina/treonina chinasi legate alla PVR, causando insulino-resistenza. Inoltre, Sestan e colleghi, hanno dimostrato che l'interferone gamma (IFN) indotto da un virus può diminuire i recettori dell'insulina nel muscolo scheletrico, il che potrebbe spiegare la sindrome di insulino-resistenza descritta nei pazienti con diabete indotto da COVID-19 (21). Nella comparsa del diabete indotto da COVID-19 sono state ipotizzate numerose altre vie di segnalazione responsabili, fra cui l'iperglicemia indotta da stress, l'iperglicemia indotta da steroidi e lo smascheramento di un diabete preesistente (Fig. 5). Alcuni studi suggeriscono in maniera interessante che anche l'età potrebbe essere un fattore importante. Da dati recenti è emerso infatti come individui con un'età superiore ai 40 anni con diabete siano più esposti ad infezioni di grave entità (22). Parallelamente al contributo delle infezioni virali, anche il tipo di alimen-

tazione e il tempismo nell'introduzione di determinati cibi nell'infanzia potrebbe svolgere un ruolo (ancora poco definito) nell'insorgenza della malattia. Anche il momento della prima introduzione degli alimenti nonché gli eventi gestazionali sono state citate come possibili concause. È stato proposto in maniera interessante come una precoce esposizione al glutine e al latte vaccino nella dieta del bambino possa essere collegata ad un aumento rischio di DMT1. Uno studio finlandese ha rilevato che i bambini esposti a latte artificiale vaccino prima dei 3 mesi di età avevano tassi più elevati di IgG ed una maggiore cross-reattività verso l'insulina umana. Rispetto ad un possibile contributo dell'alimentazione nell'insorgenza della malattia, sono stati chiamati in causa anche i nitrati provenienti dall'assunzione di acqua, una ridotta assunzione di acidi grassi omega-3 e di vitamina D (23-25). Anche il microbiota intestinale è stato indicato come possibile attore per la sua capacità di modulare la risposta immunitaria. A tal proposito, recenti evidenze mostrano la presenza di un alterato rapporto tra batteri Firmicutes e Bacteroidetes nella flora batterica di pazienti con DMT1 rispetto a soggetti sani (26). È interessante notare come persone con livelli più elevati di batteri Firmicutes e con un'assunzione più elevata di carboidrati potrebbero essere più a rischio di sviluppare la malattia. Al contrario, una maggiore quantità di Bifidobacterium nell'intestino

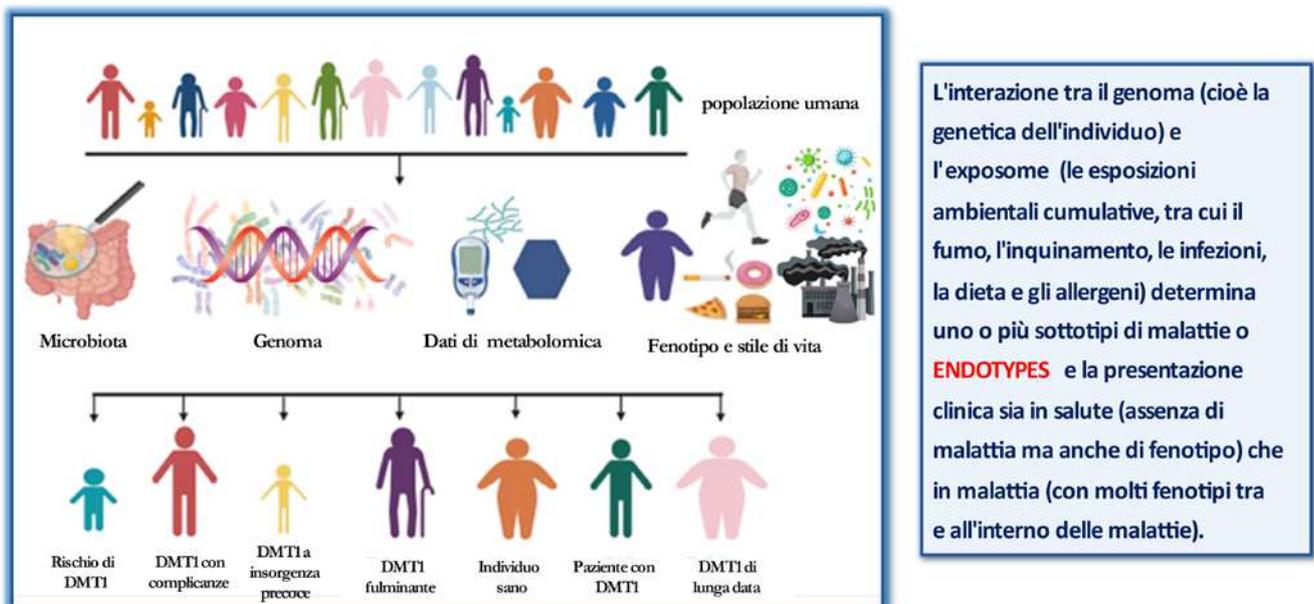
sembri svolgere un ruolo protettivo (27). Infine, è stato visto come un'alterata colonizzazione batterica a cui si assiste nei bambini nati da parto cesareo, potrebbe essere un ulteriore collegamento e relazione causale (28). È stato proposto in modo interessante come la mancanza di colonizzazione da parte di specie di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* causi un'immuno-modulazione disfunzionale con conseguenti implicazioni per l'autoimmunità e lo sviluppo della malattia.

L'ETEROGENEITÀ DEL DIABETE AUTOIMMUNE E GLI ENDOTIPI

Nonostante i grandi progressi compiuti nell'ultimo decennio, la prevenzione e il trattamento del DMT1 rimangono subottimali, con ampie e inspiegabili variazioni nelle risposte individuali agli interventi. Negli ultimi anni è emersa la consapevolezza che l'attuale schema di classificazione del diabete mellito non è sufficiente a cogliere la complessità di questa malattia né guida efficacemente la gestione clinica. La diagnosi clinica del DMT1 è stata classicamente considerata come relativamente univoca. Tuttavia, solo di recente sta emergendo una nuova visione della malattia come una condizione eterogenea ed estremamente complessa che può manifestarsi sotto forma di diversi fenotipi (29) (Fig. 6). Sembra infatti che

a contribuire all'insorgenza della malattia che culmina nella distruzione delle cellule del pancreas siano coinvolti una moltitudine di pathway fisiopatologici. Uno degli approcci proposti per raggiungere l'obiettivo di applicare una medicina di precisione nel diabete mellito è quello di identificare degli endotipi della malattia, ciascuno dei quali ha un'eziopatogenesi distinta che potrebbe essere suscettibile ad interventi specifici. Questo concetto è stato introdotto per cercare di comprendere meglio la complessità del DMT1 ed ha aperto a nuove possibilità in termini di valutazione della patologia, risposta al trattamento e prognosi (30). Il concetto di endotipo nel DMT1 potrebbe essere considerato come un concetto volto a dare un ordine alla moltitudine di contributi che derivano dall'epigenetica nella malattia. L'interazione tra il bagaglio genetico di ogni individuo e gli stimoli costanti causati dall'esposizione ambientale cumulativa origina questi endotipi, sia in presenza che in assenza di malattia manifesta (31). Un grande ostacolo alla comprensione più approfondita della eterogeneità del DMT1 risiede in parte nella difficoltà di monitorare in tempo reale il processo di distruzione tissutale nei pazienti colpiti. Alcune analisi su tessuti pancreatici hanno mostrato profili fisiopatologici diversi ed in particolare come il processo autoimmune a carico delle isole pancreatiche avvenga ad un tasso variabile e con un diverso grado di gravità in base all'età

Figura 6 ♦ L'interazione tra suscettibilità genetica e fattori ambientali determina diversi endotipi di DMT1. Mod da (32)



di esordio. Nei bambini di età inferiore ai 10 anni, si assiste ad una distruzione massiva con una ridotta porzione beta cellulare conservata, al contrario nel caso di un esordio in età adolescenziale si assiste ad una maggiore conservazione pancreatica. In accordo con diverse osservazioni sono stati proposti diversi endotipi in base all'età di insorgenza, alla genetica, al coinvolgimento del sistema immunitario e il tasso di distruzione delle cellule beta. L'endotipo DMT1E1 è spesso legato ad un esordio infantile (<7 anni), ed è caratterizzato dall'allele HLA DR4-DQ8, da un'alta percentuale di cellule T CD8+ ed un elevato rapporto proinsulina/peptide C nonché da una maturazione anomala delle cellule beta. Al contrario l'endotipo DMTE2 è contraddistinto da un esordio in adolescenza (>13 anni), dall'allele HLA DR3-DQ2, una percentuale minore di cellule T CD8+ e una maggiore conservazione insulinica (28-29). È interessante notare inoltre come questo secondo endotipo sia meno responsivo alla terapia con immunomodulanti rispetto al primo. Oltre a quelli discussi, alcuni autori propongono l'esistenza di diversi altri endotipi di diabete autoimmune (Fig. 7). Il LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults), è una forma di diabete

caratterizzata da una progressione verso la perdita delle cellule beta più lenta rispetto al tipo 1 classico. Inizialmente, può sembrare diabete di tipo 2, ma nel corso del tempo si sviluppa una carenza di insulina più simile a quella che avviene nei pazienti con il DMT1. È stato suggerito come il diabete latente autoimmune (LADA) possa costituire un endotipo a se stante rispetto a un forma a più lenta progressione del DMTE2. Nel futuro sarà fondamentale condurre ulteriori ricerche meccanicistiche ed istologiche al fine di elucidare possibili variazioni nella fisiopatologia tra tali sottotipi. Restano infatti da chiarire ancora diversi aspetti chiave di questa malattia, fra cui ad esempio in che misura predisposizione genica e fattori ambientali siano coinvolti nello sviluppo dell'autoimmunità alla base della malattia. Alcuni endotipi potrebbero beneficiare di trattamenti mirati per rallentare la progressione della malattia, dove altri richiederebbero una terapia insulinica intensiva sin dall'inizio (32). La ricerca sugli endotipi nel DMT1 è in corso e risulta di fondamentale importanza per comprendere meglio queste differenze e migliorare il trattamento per i pazienti che ne sono affetti.

Figura 7 ♦ Diabete di tipo 1 – una nuova visione della malattia basata sugli endotipi

		Endotipi					
		DMT1E1	DMT1E2	DMT1E3	DMT1E4	DMT1E5	DMT1E6
Proprietà (forza di associazione segnata con +)	Genetico	++++	+++	+++	++	++	+
	Immunologico	++++	+++	+++	++	++	+
	Età di esordio	+	++	+++	+++	++++	++
	BMI	+	+	++	+++	++++	++
	Livello peptide C	+	++	++	+++	++++	+++

- Una serie di fattori, tra cui l'età di insorgenza, la regolazione del sistema immunitario, il tasso di distruzione delle cellule beta, gli autoanticorpi, il peso corporeo e la genetica, sono riconosciuti come fattori che giocano un ruolo chiave nello sviluppo della DMT1.
- I pazienti possono essere classificati in sottotipi diabetici distinti basati su questi fattori, che possono essere utilizzati per classificare i pazienti in endotipi specifici.
- La classificazione dei pazienti in endotipi consente una maggiore comprensione della progressione naturale della malattia al momento della diagnosi, dando origine a terapie più accurate e incentrate sul paziente.

BIBLIOGRAFIA

1. Leslie RD et al. Adult-Onset Type 1 Diabetes: Current Understanding and Challenges. *Diabetes Care* 44(11): 2449-2456, 2021. doi: 10.2337/dc21-0770.
2. Magliano DJ, Boyko EJ; IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee. IDF DIABETES ATLAS [Internet]. 10th ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2021.
3. Ogle GD et al. Global estimates of incidence of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Atlas, 10th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022 Jan; 183: 109083. doi: 10.1016/j.diabres.2021.109083. Epub 2021 Dec 6. PMID: 34883188.
4. Gregory GA et al., International Diabetes Federation Diabetes Atlas Type 1 Diabetes in Adults Special Interest Group; Magliano DJ, Maniam J, Orchard TJ, Rai P, Ogle GD. Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 10(10): 741-760, 2022. doi: 10.1016/S2213-8587(22)00218-2. Erratum in: *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2022 Oct 7.
5. Ward ZJ et al. Estimating the total incidence of type 1 diabetes in children and adolescents aged 0-19 years from 1990 to 2050: a global simulation-based analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol* 10(12): 848-858, 2022. doi: 10.1016/S22138587(22)00276-5.
6. Songini M, et al. Type 1 diabetes in Sardinia: facts and hypotheses in the context of worldwide epidemiological data. *Acta Diabetol* 54(1): 9-17, 2017. doi: 10.1007/s00592-016-0909-2.
7. Bruno G, Pagano G, Faggiano F, De Salvia A, Merletti F. Effect of Sardinian heritage on risk and age at onset of type 1 diabetes: a demographic case-control study of Sardinian migrants. *Int J Epidemiol* 29(3): 532-535, 2000.
8. Songini M, Lombardo C. The Sardinian way to type 1 diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 4(5): 1248-1255, 2010. doi: 10.1177/193229681000400526.
9. Robertson CC, Rich SS. Genetics of type 1 diabetes. *Curr Opin Genet Dev* 50: 7-16, 2018. doi: 10.1016/j.gde.2018.01.006.
10. Qu HQ, Qu J, Bradfield J. et al. Genetic architecture of type 1 diabetes with low genetic risk score informed by 41 unreported loci. *Commun Biol* 4(908), 2021. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02368-8>.
11. Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 11(6): 533542, 2011. doi: 10.1007/s11892-011-0223-x.
12. Kawabata Y et al. Committee on Type 1 Diabetes, Japan Diabetes Society. Differential association of HLA with three subtypes of type 1 diabetes: fulminant, slowly progressive and acute-onset. *Diabetologia.* 2009 Dec; 52(12): 2513-2521. doi: 10.1007/s00125-009-1539-9. Epub 2009 Oct 8. PMID: 19812988.
13. Rewers M, Stene LC, Norris JM. Risk Factors for Type 1 Diabetes. In: Cowie CC, Casagrande SS, Menke A, et al. ed. *Diabetes in America.* 3rd edition. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (US); 2018 Aug., Chapter 11.
14. Ilonen J, Lempainen J, Veijola R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 15(11): 635-650, 2019. doi: 10.1038/s41574-019-0254-y.
15. Filippi CM, von Herrath MG. Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes* 57(11): 2863-2871, 2008. doi: 10.2337/db07-1023.
16. D'Souza F, Buzzetti R, Pozzilli P. Diabetes, COVID-19, and questions unsolved. *Diabetes Metab Res Rev* 39(5): e3666, 2023. doi: 10.1002/dmrr.3666.
17. Chandrashekhkar JS, Pozzilli P. COVID-19 induced Diabetes: A novel presentation. *Diabetes Res Clin Pract* 191: 110034, 2022. doi: 10.1016/j.diabres.2022.110034.
18. Tang X, Uhl S, Zhang T, Xue D, Li B, Vandana JJ, Acklin JA et al., SARS-CoV-2 infection induces beta cell transdifferentiation. *Cell Metab.* 2021 Aug 3; 33(8): 1577-1591.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2021.05.015. Epub 2021 May 19. PMID: 34081913; PMCID: PMC8133495.
19. Santos A, Magro DO, Evangelista-Poderoso R, Saad MJA. Diabetes, obesity, and insulin resistance in COVID-19: molecular interrelationship and therapeutic implications. *Diabetol Metab Syndr* 13(1): 23, 2021. doi: 10.1186/s13098-021-00639-2.
20. Heimann E, Nyman M, Degerman E. Propionic acid and butyric acid inhibit lipolysis and de novo lipogenesis and increase insulin-stimulated glucose uptake in primary rat adipocytes. *Adipocyte* 4(2): 81-88, 2014. doi: 10.4161/21623945.2014.960694.
21. Šestan M, Marinović S, Kavazović I, Cekinović Đ, Wueest S, Turk Wensveen T, Brzić I, Jonjić S, Konrad D, Wensveen FM, Polić B. Virus-Induced Interferon- γ Causes Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Derails Glycemic Control in Obesity. *Immunity* 49(1): 164-177.e6, 2018. doi: 10.1016/j.immuni.2018.05.005.
22. Chawla U, Kashyap MK, Husain A. Aging and diabetes drive the COVID-19 forwards; unveiling nature and

- existing therapies for the treatment. *Mol Cell Biochem* 476(11): 3911-3922, 2021. doi: 10.1007/s11010-021-04200-7.
23. Parslow RC, McKinney PA, Law GR, Staines A, Williams R, Bodansky HJ. Incidence of childhood diabetes mellitus in Yorkshire, northern England, is associated with nitrate in drinking water: an ecological analysis. *Diabetologia*. 1997 May; 40(5): 550-556. doi: 10.1007/s001250050714. PMID: 9165223.
 24. Norris JM, Yin X, Lamb MM, Barriga K, Seifert J, Hoffman M, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. *JAMA*. 2007 Sep 26; 298(12): 1420-1428. doi: 10.1001/jama.298.12.1420. PMID: 17895458.
 25. Altieri B, Muscogiuri G, Barrea L, Mathieu C, Vallone CV, Mascitelli L, et al. Does vitamin D play a role in autoimmune endocrine disorders? A proof of concept. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017 Sep; 18(3): 335-346. doi: 10.1007/s11154-016-9405-9. PMID: 28070798.
 26. Hu C, Wong FS, Wen L. Type 1 diabetes and gut microbiota: Friend or foe? *Pharmacol Res*. 2015 Aug; 98: 9-15. doi: 10.1016/j.phrs.2015.02.006. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25747961; PMCID: PMC4469505.
 27. Traversi D, Rabbone I, Scaiola G. et al. Risk factors for type 1 diabetes, including environmental, behavioural and gut microbial factors: a case-control study. *Sci Rep* 10, 17566, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74678-6>.
 28. Stene LC, Gale EA. The prenatal environment and type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2013 Sep; 56(9): 1888-1897. doi: 10.1007/s00125-013-2929-6. Epub 2013 May 10. PMID: 23657800.
 29. Redondo MJ, Morgan NG. Heterogeneity and endotypes in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 19(9): 542-554, 2023. doi: 10.1038/s41574-023-00853-0.
 30. Fiorina P, Pozzilli P. Unveiling a novel type 1 diabetes endotype: Opportunities for intervention. *Diabetes Metab Res Rev* 38(5): e3536, 2022. doi: 10.1002/dmrr.3536.
 31. Akil AA, Yassin E, Al-Maraghi A, Aliyev E, Al-Malki K, Fakhro KA. Diagnosis and treatment of type 1 diabetes at the dawn of the personalized medicine era. *J Transl Med* 19(1): 137, 2021. doi: 10.1186/s12967-021-02778-6.
 32. den Hollander NHM, O Roep B. From Disease and Patient Heterogeneity to Precision Medicine in Type 1 Diabetes. *Front Med (Lausanne)*. 9: 932086, 2022. doi:10.3389/fmed.2022.932086.

Il diabete monogenico. Una condizione clinica frequentemente trascurata

Monogenic diabetes. A frequently neglected clinical condition

Antonella Marucci¹, Rosa Di Paola¹, Claudia Menzaghi¹ e Vincenzo Trischitta^{1,2}

¹Unità di Ricerca di Diabetologia ed Endocrinologia, Fondazione IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo; ²Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2303c>

ABSTRACT

Monogenic diabetes (MD) includes several forms of hyperglycemia caused by mutations in genes capable of controlling glucose homeostasis. Although MD explains 0.5-5.0% of non-autoimmune diabetes, it remains mostly overlooked. This is unfortunate, given that most of the genes involved in MD influence the monitoring and/or therapy of carrier patients, thus representing an excellent example of “precision medicine” implemented in real-life clinical practice. This review provides a practical update to help identify patients who merit genetic testing for MD and how to best clinically manage carrier patients.

KEYWORDS

Rare forms of diabetes, genetic counselling, precision medicine, actionable genes, diabetes in pregnancy.

INTRODUZIONE

Il diabete mellito è una malattia molto prevalente (ne è affetto quasi mezzo miliardo di pazienti e le proiezioni indicano che nel 2050 saranno più di 1.3 miliardi) e con una elevata morbilità e mortalità (1). Tutto ciò si traduce in costi difficilmente sostenibili dai vari sistemi sanitari nazionali, oltre che in un peso molto gravoso per i pazienti ed i loro familiari. È quindi indispensabile aumentare le conoscenze sull'eziopatogenesi ed il decorso clinico delle varie forme di questa malattia così da poter migliorare la gestione di ogni singolo paziente, sia in termini di monitoraggio che di terapia.

Accanto alle forme più frequenti di diabete mellito, ne esistono altre più rare, tra le quali spicca il diabete monogenico (DM (2)), oggetto di questa rassegna. Il DM è costituito da un gruppo estremamente eterogeneo di vari disordini in cui l'iperglicemia è causata da mutazioni in geni codificanti per proteine che svolgono un ruolo determinante nel mantenimento dell'omeostasi del glucosio (2-3). La maggior parte delle mutazioni che causano il DM esercitano un effetto negativo sul numero o la funzione delle cellule beta pancreatiche (4). Tuttavia, esistono anche forme di DM causate da mutazioni che causano ridotta azione dell'insulina (resistenza insulinica) (5) o processi autoimmunitari che esitano in danno beta cellulare (4, 6).

Classicamente sotto l'ombrello di DM si comprendono il diabete neonatale (2, 4, 7-8), molto raro (circa 1 caso ogni 90 mila nuovi nati) che insorge entro i primi 6-9 mesi di vita, il ben più frequente MODY (maturity-onset diabetes of the young, nomenclatura che si tende a superare come descritto più avanti) con insorgenza molto varia, dai primissimi anni di vita fino alle prime 4-5 decadi e il diabete sindromico in cui l'iperglicemia è solo una delle manifestazioni cliniche e spesso neanche la più importante. In realtà, con l'eccezione del diabete neonatale, questa definizione così categorica non ha resistito alla prova delle migliori conoscenze accumulate nel corso degli ultimi anni che dimostrano come la separazione tra le varie forme di DM sia molto lasca e che spesso ci tro-

viamo davanti ad una patologia la cui età di insorgenza, i livelli di glicemia e la presenza di caratteristiche sindromiche rappresenta uno spettro clinico continuo che non sempre ha uno strettissimo correlato con i geni causativi, essendo mutazioni dello stesso gene in grado di dare manifestazioni cliniche fra loro anche molto diverse (4). Per superare queste rigidità classificatorie e per evitare i condizionamenti di nomenclature superate dalle evidenze scientifiche, si utilizza ormai il termine generico di DM oppure il termine di diabete seguito dal nome del gene che causa l'iperglicemia nello specifico paziente cui ci si riferisce. Quindi, per esempio, il più comune delle forme di DM, quello causato da mutazione del gene GCK (precedentemente descritto come MODY 2), viene indicato come "diabete-GCK".

Questa Rassegna si propone di fornire ai diabetologi una guida aggiornata secondo le più recenti conoscenze, per una corretta diagnosi molecolare del paziente con sospetto DM e la conseguente gestione clinica. L'argomento è di grande rilevanza perché i geni più comunemente coinvolti nel DM condizionano a vario titolo il monitoraggio e/o la terapia del paziente (è possibile, cioè, una gestione diversa a seconda del gene coinvolto nello specifico paziente), permettendo così l'implementazione di una vera e propria medicina di precisione (4, 9). Gli aspetti invece più squisitamente fisiopatologici non verranno qui trattati in dettaglio e sono ben riportati altrove (4).

EPIDEMIOLOGIA

Il cosiddetto MODY da solo costituisce oltre il 90% dei casi di DM e può rappresentare circa lo 0,5-5% dei casi del diabete non autoimmune riscontrato nella popolazione generale. Al contrario, non si ha una stima relativa alle forme più rare di DM. Alcuni studi riportano che in popolazione di origine europea, la prevalenza del DM sia di circa 100 casi per milione di abitanti (4). Tuttavia, studi più recenti condotti in UK suggeriscono una prevalenza minima di circa 250 casi per milione (2). In realtà, la vera prevalenza del DM è sconosciuta ed è verosimilmente molto sottostimata a causa della scarsa conoscenza della malattia che resta spesso non diagnosticata, soprattutto quando si presenta con caratteristiche cliniche sovrapponibili al diabete di tipo 1 in età pediatrica e al diabete di tipo 2 nell'età adulta. Alla sottostima della prevalenza del DM contribuisce pure la ridotta disponibilità, anche

in paesi ricchi come il nostro, di laboratori in grado di effettuare i test genetici necessari alla diagnosi di certezza di DM. Tutto ciò permette di ipotizzare che in Italia ci siano alcune decine di migliaia di pazienti con DM. Il diabetologo clinico deve quindi prendere atto che tra i pazienti del suo ambulatorio vi sono (quasi) certamente casi con DM non diagnosticato che non possono quindi usufruire di monitoraggio e cura ottimali e personalizzati della malattia, possibili in un'alta percentuale di questi pazienti. La tabella 1 riporta i dati di quattro recenti studi europei (10-13) sui geni più frequentemente coinvolti nel determinare DM.

Tabella 1 ♦ Geni più frequentemente coinvolti nel determinare DM

GENE	PRESENTAZIONE CLINICA	% DEI CASI IDENTIFICATI (RANGE)
<i>HNF1A</i>	Non sindromica (frequente)	16-33%
<i>GCK</i>		22-68%
<i>HNF4A</i>		0-14%
<i>ABCC8</i>	Non-sindromica (meno frequente)	0-4%
<i>RFX6</i>		0-3%
<i>INS</i>		0-2%
<i>KCNJ11</i>		0-2%
<i>NEUROD1</i>		0-2%
<i>PDX1</i>		0-2%
<i>m.3243A>G</i>		0-8%
<i>HNF1B</i>	Sindromica	4-6%
<i>WFS1</i>		0-5.9%
<i>INSR</i>		0.6-8%

I dati sono riportati come % e range dei casi identificati in 4 recenti studi europei sul DM (10-13)

PRESENTAZIONE CLINICA

La presentazione clinica del DM è caratterizzata da alcuni elementi che, soprattutto se presenti contemporaneamente, devono far sorgere il sospetto che il paziente non sia affetto da diabete di tipo 1 (soprattutto in età pediatrica e giovanile) oppure da diabete di tipo 2 (soprattutto in età adulta).

- Paziente pediatrico

Un livello di glicemia lievemente aumentato con assenza di chetosi e di familiari di primo grado con diabete verosimilmente non autoimmunitario devono far sospettare che il paziente non sia affetto da diabete di tipo 1. In questi casi è utile procedere con lo studio degli anticorpi correlati al diabete di tipo 1 (anti-GAD, anti-Insulina, anti-IA2 e anti-ZnT8) e la misurazione dei livelli sierici di C-peptide. La negatività anticorpale e una buona secrezione insulinica (C-peptide a digiuno >0,6 ng/ml oppure >0.2 nmol/L), rendono estremamente improbabile la diagnosi di diabete di tipo 1 e utile l'analisi molecolare per la diagnosi di DM.

- Paziente adulto

Un normale peso corporeo (o anche un modesto sovrappeso che sia lontano dal limite dell'obesità), l'assenza di dislipidemia aterogena e l'insorgenza dell'iperglicemia prima dei 30 anni di età devono far sospettare che il paziente non sia affetto da diabete di tipo 2. Il sospetto si rafforza in presenza di una forte familiarità, soprattutto

se compatibile con un modello di trasmissione autosomica dominante (circa il 50% di affetti per ogni generazione).

Come nel paziente pediatrico, nei casi in cui si sospetta la presenza di diabete autoimmunitario (sia LADA sia diabete di tipo 1 con insorgenza in età adulta) lo studio degli anticorpi correlati al diabete di tipo 1 sopra descritti e la misurazione dei livelli sierici di C-peptide può aiutare a dirimere il dubbio. In tutti questi casi, è utile procedere con l'analisi molecolare per la diagnosi di DM.

- Quadro sindromico

Sia in pazienti pediatriche che adulti, quadri clinici di cisti renali ed altre alterazioni dell'apparato genitourinario, ipoacusia, disturbi visivi, diabete insipido, lipodistrofia, anemia megaloblastica, acanthosis nigricans che si associano alle altre caratteristiche sopra descritte rendono irrinunciabile l'analisi molecolare per la diagnosi di DM. La tabella 2 descrive i geni più frequentemente coinvolti nel determinare DM sindromico e la loro associazione con le caratteristiche sopra elencate.

Tabella 2 ♦ **Caratteristiche cliniche che in pazienti con sospetto DM possono suggerire la presenza di mutazioni in geni sindromici**

CARATTERISTICHE CLINICHE	GENE DA ANALIZZARE
Cisti renali ed altre alterazioni dell'apparato genitourinario	<i>HNF1B</i> (fattore di trascrizione importante per il mantenimento della funzione β-cellulare e/o sviluppo e la maturazione delle isole pancreatiche)
Ipoacusia a trasmissione materna, eventualmente accompagnato a disturbi psichiatrici, maculopatia retinica, ipertrofia ventricolare sinistra, scompenso cardiaco, filtrato glomerulare ridotto in considerazione dell'età e della durata del diabete	<i>MTTL1</i> (DNA mitocondriale) m.3243A>G che provoca difetti nel trasporto degli elettroni; il fenotipo clinico è caratterizzato da grande varietà di manifestazioni e severità
Ipoacusia in presenza di diabete insipido e/o riduzione del visus per atrofia del nervo ottico	<i>WFS1</i> (forma un complesso con il sensore del calcio e partecipa direttamente al cross-talk tra il reticolo endoplasmatico e i mitocondri, essenziale per metabolismo e sopravvivenza cellulare)
Acanthosis nigricans eventualmente in donne con sindrome dell'ovaio policistico	<i>INSR</i> (recettore dell'insulina)
Lipodistrofia	<i>LMNA</i> (proteina nucleare che appartiene ai componenti della lamina nucleare, importante nel mantenimento e nell'integrità di diversi tipi cellulari qualcosa in più); <i>PPARG</i> (fattore di trascrizione inducibile essenziale per l'adipogenesi e coinvolto nel metabolismo lipidico degli adipociti)
Anemia megaloblastica, ipoacusia	<i>SLC19A2</i> (trasportatore della tiamina che regola l'up-take di tiamina coinvolta a precetti metabolici multipli del citosol, mitocondri e perossisomi)

In generale, soprattutto se l'esperienza del clinico su questa specifica forma di diabete è modesta, può essere utile rivolgersi ad un modello di predizione del rischio di DM (noto come "MODY calculator", (<https://www.diabetesgenes.org/exeter-diabetes-app/>), basato su dati anamnestici e clinici comunemente disponibili e messo gratuitamente a disposizione online dall'Università di Exeter, UK. Il modello, utilizzabile solo in pazienti con insorgenza del diabete prima dei 35 anni di età, fornisce la probabilità che si tratti di MODY e quando questa supera il 20% si suggerisce di procedere con l'analisi molecolare (<https://www.england.nhs.uk/publication/national-genomic-test-directories/>). La soglia può scendere al 10% nel caso il paziente sia in terapia insulinica (<https://www.england.nhs.uk/publication/national-genomic-test-directories/>). Ciò perché in questi pazienti aumenta il vantaggio di una diagnosi molecolare di DM, potendosi in molti casi sostituire la terapia insulinica con terapia con sulfoniluree, meno impattante sulla qualità della vita del paziente (si esprime cioè il concetto che a fronte di un potenziale maggior beneficio per il paziente, si può pagare il costo di eseguire un maggior numero di test ad alta probabilità di risultare negativi).

INFORMAZIONI GENERALI SUI TEST GENETICI

I test genetici vengono effettuati sequenziando le parti codificanti dei geni noti per essere coinvolti in una data malattia. Prima degli anni 2000, lo screening veniva eseguito utilizzando il sequenziamento Sanger, metodo che consente solo l'analisi di piccoli frammenti di DNA (450-1000 paia di basi) e quindi laborioso e molto costoso. Con l'avvento del sequenziamento di nuova generazione (next generation sequencing, NGS) che permette l'analisi simultanea di molteplici geni sul DNA di diversi pazienti, lo screening genetico è diventato sempre più economico e meno impegnativo. La pratica corrente nel NGS prevede il sequenziamento mirato delle parti codificanti di geni noti per essere coinvolti nel determinare la malattia di interesse (pannelli genici). A questa analisi può essere necessario aggiungerne altre che riescono ad identificare variazioni del numero di copie del gene (ad esempio delezioni di uno o più esoni interi, che nel contesto del DM è comune nel diabete-*HNF1B*) e mutazioni del DNA mitocondriale. L'interpretazione delle varianti si basa dal 2015 sulle linee guida dell'American College of Medical Gene-

tics and Genomics (ACMG (14)) che consentono il rigore e l'uniformità dei risultati tra i diversi centri di diagnosi genetica del mondo. I criteri del ACMG si fondano su evidenze scientifiche basate su dati di popolazione (ad esempio, la frequenza delle varianti), computazionali (previsione *in silico* dell'effetto delle varianti), sperimentale (sul ruolo biologico e funzionale delle varianti, deducibile da studi *in vitro* e/o *in vivo*) e di segregazione con la malattia riportata in pedigree precedentemente studiati. Ai criteri ACMG, un selezionato gruppo di esperti del diabete monogenico (ClinGen Monogenic Diabetes Variant Curation Expert Panel (VCEP) <https://clinicalgenome.org/affiliation/50016/>) ha aggiunto ulteriori linee guida per l'interpretazione della patogenicità delle varianti di geni coinvolti nel determinare questa forma di diabete.

STRATEGIA OGGI SUGGERITA PER LA DIAGNOSI MOLECOLARE DEL DM

Come già detto, la tabella 1 riporta i geni che più frequentemente causano DM.

Di norma (e fino allo scorso anno), sulla base della frequenza del coinvolgimento dei singoli geni ed in assenza di segni e sintomi suggestivi di "forme sindromiche" (anche paucisintomatiche) di DM, l'approccio più comune ha previsto l'analisi con sequenza Sanger del gene *GCK* (in soggetti con una diagnosi molto precoce di iperglicemia molto lieve e non progressiva o in donne con storia di GDM con mantenimento di iperglicemia lieve dopo il parto) o dei geni *HNF1A*, ed eventualmente *HNF4A*, nei restanti casi. Quando queste analisi sono negative, si procede con il sequenziamento NGS per tutti gli altri geni finora descritti nel DM. Come anticipato sopra, facevano eccezione in questo contesto, i pazienti che ad un attento esame anamnestico e clinico riportavano alcune delle caratteristiche che, in aggiunta all'iperglicemia, inducono a sospettare e analizzare specifiche forme sindromiche di DM (Tab. 2). Questa strategia è stata messa in discussione (10-13, 15) da studi recentissimi che riportano che circa il 10-20% dei pazienti con DM senza apparenti caratteristiche sindromiche sono di fatto portatori di mutazioni nei geni sindromici (10-13), suggerendo, a meno di un forte sospetto per un particolare gene da analizzare con sequenza Sanger, l'esecuzione diretta del NGS. Un secondo elemento che potrebbe far propendere per l'uso più frequente se non esclusivo del NGS è il miglioramento della sensibilità

nell'identificazione delle varianti che esita nell'aumento della percentuale di individui che una volta avviati alla diagnosi molecolare di diabete monogenico ricevono una risposta positiva (pick-up rate). Per esempio, nella nostra esperienza, il pick-up rate è passato dal 28% con sequenziamento Sanger (del periodo 2011-2017, in cui abbiamo eseguito 245 test diagnostici) al 45% con tecnica NGS (del periodo 2018-2022, per 283 test diagnostici).

In un recente documento redatto per conto della Società Italiana di Diabetologia (<https://www.siditalia.it/clinica/linee-guida-societari>) viene offerta una lista di alcuni centri pubblici che in Italia effettuano la diagnostica molecolare del DM. L'auspicio da una parte è che il diabetologo italiano sospetti più spesso la diagnosi di DM e richieda perciò l'intervento dei centri di riferimento, ma dall'altra parte è che, quando necessario (e lo è spesso) tali centri siano in grado di fornire oltre all'analisi molecolare anche un supporto nell'orientamento della richiesta (richiedere o meno il test, quale richiedere) e nell'interpretazione dei risultati ottenuti. Ciò è possibile solo quando il centro di riferimento garantisce competenze multidisciplinari ed è organizzato costitutivamente per facilitare scambi binari con i diabetologi clinici ed i pediatri.

IMPLEMENTAZIONE DI UNA VERA MEDICINA DI PRECISIONE IN MOLTI CASI DI DM

La gestione dei pazienti con diagnosi genetica di DM rappresenta un vero e proprio esempio di "medicina di precisione" (9). Infatti, conoscere la causa genetica, ovvero il gene mutato, responsabile del DM permette molto spesso una gestione personalizzata in quello specifico paziente del monitoraggio della glicemia, dello screening sia delle complicanze croniche della malattia sia, nei casi di diabete sindromico, delle alterazioni extra-pancreatiche e infine, della terapia dell'iperglicemia. A seguire vengono elencati i geni che più permettono un vero approccio di medicina di precisione e quali sono le procedure realmente implementabili nella pratica clinica.

Diabete-GCK

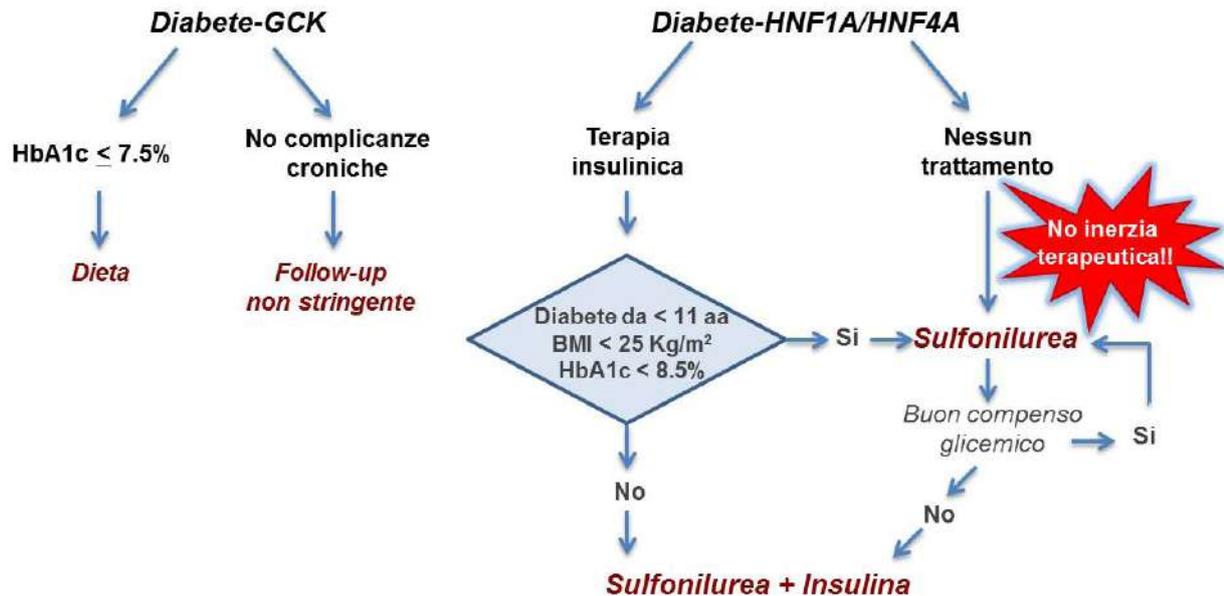
Mutazioni dominanti del gene GCK causano forme di DM (precedentemente denominato MODY 2) caratterizzato da modesta iperglicemia spesso nel range del prediabete (generalmente tra 100 e 140 mg/dl) già dai primi anni di vita che tende lievemente a peggiorare con l'età (16).

Nella maggioranza di questi soggetti, il trattamento non è necessario (17) perché, grazie alla modestia dell'iperglicemia essi non sviluppano le tipiche complicanze del diabete (18). La glicemia va, quindi, solo monitorata per intervenire nei rari casi di valori francamente elevati. D'altra parte, con l'eccezione della terapia insulinica, le altre terapie dell'iperglicemia oggi disponibili sono poco efficaci perché nessuna di esse è in grado di controllare l'attività enzimatica di GCK che è la vera ed unica causa di iperglicemia in questi pazienti. Resta determinante, invece, l'osservanza di un corretto stile di vita (quantità e qualità dell'alimentazione e attività fisica) per evitare che resistenza insulinica e obesità aggravino la già compromessa omeostasi glicemica (18). Per quanto sopra detto, anche lo screening delle complicanze croniche del diabete in pazienti con diabete-GCK può essere meno stringente, ricorrendo a controlli meno frequenti di quanto suggerito per tutte le altre forme di diabete mellito. La figura 1 descrive i punti salienti della gestione clinica di un paziente con diabete-GCK.

Diabete-HNF1A e HNF4A

Mutazioni dominanti dei geni HNF1A e HNF4A causano una forma di diabete (precedentemente MODY 3 e 1, rispettivamente) ampiamente eterogeneo, frequentemente diagnosticato durante la pubertà ma anche in età adulta (4, 19). In genere, il diabete-HNF si presenta con iperglicemia più grave rispetto al diabete-GCK e con rischio di complicanze croniche simile a quanto accade in pazienti con diabete di tipo 1 o 2 con simile durata di malattia e simile compenso glicemico. Di conseguenza, il monitoraggio delle glicemie e lo screening delle complicanze croniche sono identici a quelli delle altre forme più comuni di diabete (20).

Nei soggetti con diagnosi di diabete-HNF1A e HNF4A l'assunzione di sulfoniluree a basso dosaggio è particolarmente efficace e costituisce la terapia di elezione, mentre sono invece spesso abusivamente trattati con insulina (17). La natura del danno causato alle cellule beta da mutazioni di questi geni spiega la particolare efficacia delle sulfoniluree nei soggetti affetti. Le mutazioni di HNF1A e HNF4A, infatti, riducono l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo del glucosio o in quello mitocondriale alterando quindi meccanismi che sono a monte del recettore delle sulfoniluree (SUR1) (21), una componente essenziale del canale del potassio ATP dipendente che svolge un

Figura 1 ♦ Albero decisionale per la gestione dei pazienti con le forme più comuni di DM

- Il diabete-GCK è caratterizzato da lieve iperglicemia (spesso nel range del prediabete; non sensibile ad alcuna delle attuali terapie oggi disponibili eccetto l'insulina) e da un bassissimo rischio di complicanze croniche.

Ne consegue che non necessita di trattamento aggiuntivo ad un attento stile di vita (dieta ed attività fisica) e che lo screening delle complicanze croniche può essere molto meno stringente di quanto consigliato per le forme tradizionali di diabete mellito.

- Il diabete-HNF1A e HNF4A è particolarmente sensibile a basse dosi di sulfoniluree che permettono il raggiungimento di un buon compenso glicemico a circa 1/3 dei pazienti.

Tale trattamento è tanto più efficace quanto più precocemente viene iniziato.

Anche pazienti che si presentano in corso di terapia insulinica possono essere orientati verso la terapia con sulfoniluree, soprattutto se con diabete di durata relativamente breve, normopeso e con HbA1c inferiore a 8,5%. Se la sostituzione della terapia insulinica con sulfoniluree non è possibile si consiglia comunque di aggiungere questi farmaci orali alla precedente terapia con l'obiettivo di migliorare il compenso glicemico e ridurre il dosaggio ed il numero di somministrazioni di insulina.

ruolo centrale nella secrezione insulinica, come vedremo più avanti. Le sulfoniluree, si legano al SUR1 e agendo a valle dei difetti prodotti dalle mutazioni di HNF1A e HNF4A mantengono quindi la loro capacità di stimolare la secrezione d'insulina anche nei pazienti con diabete-HNF (21). Naturalmente l'effetto secretagogo delle sulfoniluree è tanto più efficace quanto più sono preservati sia il numero che la funzione delle cellule beta a loro volta condizionati negativamente dalla durata della malattia (17). Ciò spiega perché in pazienti con diabete-HNF il successo della terapia con sulfoniluree dipende fortemente dalla precocità della diagnosi genetica. Quando le sulfoniluree non sono sufficientemente efficaci, l'aggiunta della terapia insulinica resta la scelta migliore (17). La figura 1 descrive l'algoritmo per decidere la terapia con sulfoniluree o quella con insulina o la combinazione di entrambe in questi pazienti.

Per quanto riguarda il monitoraggio, è importante ricordare che il diabete-HNF1A può essere associato ad adenomatosi epatica (22-23), una malattia rara che può portare a grave emorragia addominale. Pertanto, si raccomanda che questi pazienti siano sottoposti a screening con ecografia del fegato.

Diabete-ABCC8 e KCNJ11

I geni ABCC8 e KCNJ11 codificano rispettivamente per le 4 subunità di SUR1 (recettore delle sulfoniluree 1) e le 4 subunità di Kir6 che tutte insieme formano il canale del potassio ATP dipendente (K_{ATP}), localizzato sulla membrana cellulare delle cellule beta, responsabile della produzione e secrezione di insulina (24). In breve, in assenza di concentrazioni elevate di glucosio, il canale K_{ATP} resta aperto, ciò permette un efflusso del potassio dalla cellula con iperpolarizzazione della membrana. Quando i livelli

di glucosio aumentano, cresce la produzione di ATP che, legando e chiudendo il canale K_{ATP} , depolarizza la membrana e attiva i canali del Ca^{+} voltaggio dipendenti con in-flusso di Ca^{+} nella cellula e successivo rilascio dei granuli di insulina (24). Quindi, mutazioni attivanti nei due geni causano l'apertura permanente del canale, ridotta secrezione di insulina e quindi DM che può presentarsi anche molto precocemente (quando insorge entro i primi 6-9 mesi di vita viene definito diabete neonatale) (2, 4, 25-26). Quando viene diagnosticato un DM dovuto a una mutazione attivante il canale K_{ATP} , le sulfoniluree rappresentano intuitivamente il trattamento di scelta, essendo efficaci come monoterapia nella maggior parte di questi pazienti, con un notevole miglioramento della qualità della vita e della gestione della malattia (27-28).

Infatti, le sulfoniluree come precedentemente accennato si legano specificamente al loro recettore SUR1 e chiudono il canale K_{ATP} tramite un meccanismo indipendente dall'ATP, aggirando così il difetto genetico prodotto da mutazioni in *ABCC8* e/o *KCNJ11* (27, 28). Non è quindi sorprendente che la grande maggioranza degli individui con diabete-*ABCC8* o *KCNJ11*, possono sospendere la terapia insulinica ed essere trattati con sulfoniluree con ottimi risultati (27-28).

Diabete-HNF1B

Pazienti con DM da mutazioni del gene *HNF1B* diversamente da quelli con mutazioni nei geni *HNF1A* e *HNF4A*, non rispondono adeguatamente al trattamento con sulfoniluree (29) e devono essere trattati con insulina (30). Tuttavia, la diagnosi genetica resta molto importante per indicare la necessità di monitorare l'eventuale sviluppo di alterazioni extra pancreatiche principalmente a carico del sistema genitourinario (soprattutto cisti renali) cui i pazienti con diabete-*HNF1B* sono soggetti (2, 4, 31).

Diabete-GATA4 e GATA6

Mutazioni dei geni *GATA4* e *GATA6* causano un ampio spettro di alterazioni extra-pancreatiche tra cui malformazioni congenite del cuore (32-33) oltre ad una forma di diabete ad insorgenza molto precoce (34-35). Per questo una diagnosi genetica tempestiva permette un attento monitoraggio cardiologico. Il trattamento di scelta in questi pazienti è l'insulina e spesso è necessaria la supplementazione di enzimi pancreatici (34).

DNA mitocondriale (diabete mitocondriale)

Alterazioni della funzione mitocondriale nelle cellule beta portano ad un graduale deterioramento della loro funzione e della loro massa e quindi ad una riduzione della produzione e secrezione di insulina (36). La specifica variante *m.3243A>G* del gene che codifica per $tRNA^{Leu}$ del DNA mitocondriale è la principale causa di diabete e sordità ad ereditarietà materna (diabete mitocondriale o MIDD nell'acronimo in Inglese), a volte associato ad altre caratteristiche cliniche (convulsioni, episodi simili a ictus, debolezza muscolare, alterazioni psichiatriche, maculopatia retinica, ipertrofia ventricolare sinistra, scompenso cardiaco, riduzione del filtrato glomerulare) (37).

In questi soggetti il diabete, quando si presenta con blanda iperglicemia, è confuso col diabete di tipo 2 ma in molti casi si può presentare in forma acuta con chetoacidosi ed è confuso col diabete di tipo 1 (38). Spesso l'ereditarietà materna, la sordità e a volte alcune delle altre caratteristiche sopra descritte alimentano il sospetto di diabete mitocondriale che può essere confermato con la diagnosi genetica. In questi casi, anche in assenza di sintomi extra-glicemici, è opportuno lo screening della funzione uditiva e cardiaca così come una consulenza oftalmologica. In genere in fase iniziale i pazienti rispondono bene al trattamento con dieta o ipoglicemizzanti orali, ma con il passare degli anni si è spesso costretti alla terapia insulinica (38).

Diabete-WFS1 (sindrome di Wolfram)

Mutazioni del gene *WFS1*, che codifica per la proteina del reticolo endoplasmatico Wolframina, causano la sindrome di Wolfram, una delle forme di DM sindromico più frequente nei bambini ed adolescenti (39-40).

I soggetti con queste mutazioni hanno una forma di diabete non autoimmune con esordio in giovane età e atrofia del nervo ottico, alcuni pazienti possono sviluppare diabete insipido, sordità neurosensoriale, anomalie del tratto renale e disturbi neuropsichiatrici. Ci sono delle forme definite come Wolfram-like caratterizzate da un quadro fenotipico più lieve che oltre al diabete manifestano solo una o alcune delle altre alterazioni sopra descritte, inclusa l'atrofia del nervo ottico (39-41). Il trattamento dell'iperglicemia prevede quasi inevitabilmente la terapia insulinica.

Nel 2014 sono state redatte delle linee guida (<http://euro-wabb.org/guidelines/guidelines/>) per la gestione di que-

sti pazienti, soprattutto per il follow-up dei danni neurologici, della vista e dell'udito. Si consiglia comunque di avviare questi pazienti presso centri di riferimento che operano con approcci multidisciplinari.

GESTIONE DEL DM IN GRAVIDANZA

Un altro campo che permette la implementazione di decisioni cliniche, specifiche per il tipo di gene coinvolto nel causare il DM è quello della gravidanza. Per le donne in gravidanza con DM valgono, tranne alcune specifiche eccezioni, le stesse regole per le donne in gravidanza con altre forme di diabete. Vi sono tuttavia alcune specificità che dipendono dal gene mutato. Qui riportiamo brevemente gli aspetti salienti per le forme di DM, causate da mutazioni di *GCK*, *HNF1A* e *HNF4A*, *ABCC8* e *KCNJ11*, invitando chi fosse particolarmente interessato a questo aspetto alla lettura di una recente revisione molto dettagliata ed opportunamente interpretata della poca letteratura disponibile (42).

Diabete-GCK

Occorre innanzitutto ricordare che circa il 2% delle donne con diabete gestazionale ha in effetti un diabete-GCK (43). Il sospetto che la gestante sia portatrice di mutazione GCK è forte se durante il primo trimestre di gravidanza si riscontra lieve iperglicemia in presenza di normopeso. Queste pazienti di solito presentano familiarità per diabete non autoimmune con insorgenza in età precoce, una storia di lieve iperglicemia prima del concepimento e di diabete gestazionale in una precedente gravidanza, a volte con macrosomia fetale. In tutti questi casi, val la pena di richiedere l'analisi genetica per diabete-GCK.

Se la madre riceve una diagnosi genetica di diabete-GCK, il feto ha un aumentato rischio di macrosomia e di complicanze ostetriche a causa dell'iperinsulinemia fetale in risposta all'iperglicemia materna (44-45). Ovviamente, questo rischio è limitato ai casi (50%) in cui il feto non è portatore della stessa mutazione della madre e non accade invece nel restante 50% dei casi in cui anche il feto ha la mutazione del GCK e, quindi, non risponde con un eccesso di produzione insulinica alla lieve iperglicemia materna (44-45). Diventa quindi importante un controllo continuo delle glicemie e della crescita fetale così da prendere in considerazione tempestivamente il ricorso alla terapia insulinica quando si osserva una evoluzione

verso la macrosomia (45). Nel caso sia il padre ad avere un diabete-GCK ed il feto ne eredita la mutazione il peso del bambino alla nascita tende ad essere più basso della media a causa della ridotta produzione di insulina fetale che non trova nella normoglicemia materna uno stimolo sufficiente (46).

Diabete-HNF1A

Se la madre riceve una diagnosi genetica di diabete-HNF1A il peso del feto portatore della mutazione sarà tendenzialmente aumentato a causa dell'iperglicemia materna e non diverso rispetto al feto che non porta la mutazione (47-48). Il trattamento di scelta è con insulina da iniziare (o da sostituire alla sulfoniluree utilizzate in epoca pre-gravidica in quanto terapia di scelta in questi pazienti) possibilmente prima della gravidanza (42). Nel caso che la paziente si presenti già gravida ed in ottimo compenso con sulfoniluree, si può decidere di non modificare la terapia fino all'inizio del secondo trimestre. Ciò per evitare il possibile deterioramento glicemico che si può inizialmente osservare alla sospensione delle sulfoniluree proprio nei primi mesi di vita fetale durante i quali si compie l'organogenesi. Se si decide di mantenere la terapia con sulfoniluree, questa andrebbe sempre effettuata con glibenclamide (l'unica molecola per cui si abbiano dati in gravidanza) e va comunque sempre interrotta prima del terzo trimestre per evitare il suo passaggio transplacentare e il rischio di grave ipoglicemia alla nascita. Nel caso sia il padre ad avere un diabete-HNF1A ed il feto ne eredita la mutazione il peso del bambino sarà normale e non si osserva un maggiore rischio di ipoglicemia alla nascita (42).

Diabete-HNF4A

Se la madre riceve una diagnosi genetica di diabete-HNF4A il feto ha un elevato rischio di macrosomia. Tale rischio è ancora maggiore se anche il feto è affetto perché allo stimolo iperglicemico della madre (che comporta un aumento di peso di circa 650-700 gr) si aggiunge un effetto diretto della mutazione che contribuisce ad un ulteriore aumento di circa 800 gr, così che si arriva ad un peso finale medio di circa 4800 gr (42). Al rischio di macrosomia, si aggiunge ovviamente il rischio di ipoglicemia neonatale che può durare molto a lungo (anche molti mesi) oltre le varie complicanze ostetriche (42). Il meccanismo tramite cui mutazioni che in epoca post-natale sono responsabili di iperglicemia per ridotta secrezione

insulinica esercitano un effetto opposto nella vita fetale (un evento riscontrato anche in modelli animali) non è noto. Questo effetto contro-intuitivo non si verifica solo per una specifica mutazione di *HNF4A*, la p.R114V che non pare avere effetti sul peso alla nascita (49). Lo stato glicemico della madre deve essere, quindi, strettamente controllato insieme alla crescita fetale. Relativamente alla terapia con insulina o sulfoniluree ci si rifà a quanto detto sopra per le madri con mutazioni di *HNF4A*. Nel caso sia il padre ad avere un diabete-*HNF4A* ed il feto ne eredita la mutazione si osserva un elevato rischio di macrosomia con un peso finale intorno ai 4100-4200 gr e di ipoglicemia alla nascita (42).

Come per altre condizioni, in presenza di una marcata macrosomia (evenienza, come detto, più probabile quando sia la madre che il feto hanno una mutazione in *HNF4A*) andrebbe considerata l'induzione del parto (o un taglio cesareo) tra la 35a e la 38a settimana di gestazione (42).

Diabete-*ABCC8/KCNJ11*

È importante puntualizzare che le informazioni che si hanno al riguardo non sono state ottenute su donne in gravidanza con diabete-*ABCC8* o *KCNJ11* insorto in età adulta ma sono tutte ricavate da osservazioni effettuate su madri con diabete insorto nei primi mesi di vita (diabete neonatale). In queste donne il peso alla nascita del bambino che porta la mutazione tende ad essere più basso della media (circa 700 gr in meno) a causa della ridotta produzione di insulina fetale (42). Se la madre è in terapia con sulfoniluree il feto portatore trae beneficio da un'esposizione precoce a questo trattamento che previene il basso peso alla nascita cui sopra si faceva riferimento (42). Il trattamento in questo caso va continuato, cercando di utilizzare il dosaggio più basso possibile di sulfoniluree che ottenga il miglior compenso glicemico. Al contrario, se il feto non porta la mutazione la terapia con sulfoniluree può provocare iperinsulinemia con conseguente rischio di macrosomia e ipoglicemia neonatale (42). In questo caso, si suggerisce di sospendere il secretago e passare alla terapia insulinica. Nel caso che il feto erediti la mutazione dal padre, il peso alla nascita risulterà più basso similmente a quanto avviene quando la mutazione viene ereditata dalla madre. In tutte queste condizioni il monitoraggio ecografico della crescita fetale dovrebbe essere eseguito ogni due settimane a partire dalla 26a settimana di gestazione (42).

CONCLUSIONI

La conoscenza del DM da parte dei diabetologi clinici è ancora molto modesta e con la presente rassegna speriamo di aver dato un contributo nel migliorarla. Tale deficit, che si ripercuote in una grave sottostima del numero dei pazienti con DM (se non conosci un'entità clinica non la cerchi), ha risvolti pratici davvero dannosi, visto che per molti pazienti con DM adeguatamente caratterizzati da un punto di vista molecolare si possono implementare veri e propri approcci di medicina personalizzata. Per questo l'auspicio è che il DM rappresenti sempre più un obiettivo didattico sia per le Scuole di Medicina, sia per le Società Scientifiche a vario titolo coinvolte nella formazione ed aggiornamento sulla malattia diabetica. Di pari importanza è l'auspicio che aumentino sul territorio le strutture pubbliche dove effettuare, possibilmente a carico del SSN, l'analisi genetica per il DM e ricevere anche un supporto di conoscenze ed indirizzo sui possibili approcci di medicina personalizzata che possono essere oggi implementati. Questo obiettivo può essere raggiunto solo creando gruppi di lavoro multidisciplinari dedicati al DM.

In conclusione, i pazienti con DM restano in gran parte sconosciuti (anche nel nostro Paese che può vantare una diabetologia di eccellenza), e meritano, quindi, maggiore attenzione di quanto ne ricevano oggi. Nell'attesa che dal mondo della ricerca arrivino buone notizie sulla scoperta di nuovi geni causativi del DM e sui nuovi approcci clinici che ciò permetterà, la diabetologia italiana (con tutte le sue componenti che include il personale clinico, i biologi molecolari, gli esperti di salute pubblica, etc.) ha il preciso dovere di garantire che questi pazienti godano della giusta diagnosi e la conseguente personalizzazione del monitoraggio clinico e della terapia della loro forma di diabete.

Vincenzo Trischitta ha beneficiato dei seguenti finanziamenti specificamente relativi all'oggetto del presente articolo:

- Ministero dell'Università e della Ricerca - PON RI ARS01_00876;

- Ministero della Salute - Ricerca Corrente 2022-2023.

BIBLIOGRAFIA

1. The Lancet. Diabetes: a defining disease of the 21st century. *Lancet* 401(10394): 2087, 2023.
2. Zhang H, Colclough K, Gloyn AL, Pollin TI. Monogenic diabetes: a gateway to precision medicine in diabetes. *J Clin Invest* 131(3), 2021.

3. Stride A, Hattersley AT. Different genes, different diabetes: lessons from maturity-onset diabetes of the young. *Ann Med* 34(3): 207-216, 2002.
4. Bonnefond A, Unnikrishnan R, Doria A, Vaxillaire M, Kulkarni RN, Mohan V, et al. Monogenic diabetes. *Nat Rev Dis Primers* 9(1): 12, 2023.
5. Hegele RA. Monogenic forms of insulin resistance: aptures that expose the common metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 14(8): 371-377, 2003.
6. Johnson MB, Hattersley AT, Flanagan SE. Monogenic autoimmune diseases of the endocrine system. *Lancet Diabetes Endocrinol* 4(10): 862-872, 2016.
7. Rubio-Cabezas O, Ellard S. Diabetes mellitus in neonates and infants: genetic heterogeneity, clinical approach to diagnosis, and therapeutic options. *Horm Res Paediatr* 80(3): 137-146, 2013.
8. Hattersley AT, Greeley SAW, Polak M, Rubio-Cabezas O, Njølstad PR, Mlynarski W, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 19(Suppl 27): 47-63, 2018.
9. Marucci A, Rutigliano I, Fini I, Pezzilli S, Menzaghi C, Di Paola R, et al. Role of Actionable Genes in Pursuing a True Approach of Precision Medicine in Monogenic Diabetes. *Genes* 13: (1), 2022.
10. Colclough K, Ellard S, Hattersley A, Patel K. Syndromic Monogenic Diabetes Genes Should be Tested in Patients With a Clinical Suspicion of MODY. *Diabetes*, 2021.
11. Saint-Martin C, Bouvet D, Bastide M, Chantelot CB, Diabète. MDSGotSFd. Gene Panel Sequencing of Patients With Monogenic Diabetes Brings to Light Genes Typically Associated With Syndromic Presentations. *Diabetes*, 2021. In Press.
12. Marucci A, Di Paola R, Rutigliano I, Fini G, Pezzilli S, Menzaghi C, et al. MODY patients carrying mutation in syndromic diabetes genes. An Italian single-center experience. *Acta Diabetol* 60(1): 131-135, 2023.
13. Rapini N, Patera PI, Schiaffini R, Ciampalini P, Pampanini V, Cristina MM, et al. Monogenic diabetes clinic (MDC): 3-year experience. *Acta Diabetol* 60(1): 61-70, 2023.
14. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17(5): 405-424, 2015.
15. Di Paola R, Marucci A, Trischitta V. The Need to Increase Clinical Skills and Change the Genetic Testing Strategy for Monogenic Diabetes. *Diabetes* 71(3): 379-380, 2022.
16. Chakera AJ, Steele AM, Gloyd AL, Shepherd MH, Shields B, Ellard S, et al. Recognition and Management of Individuals With Hyperglycemia Because of a Heterozygous Glucokinase Mutation. *Diabetes Care* 38(7): 1383-1392, 2015.
17. Shepherd MH, Shields BM, Hudson M, Pearson ER, Hyde C, Ellard S, et al. A UK nationwide prospective study of treatment change in MODY: genetic subtype and clinical characteristics predict optimal glycaemic control after discontinuing insulin and metformin. *Diabetologia* 61(12): 2520-2527, 2018.
18. Steele AM, Shields BM, Wensley KJ, Colclough K, Ellard S, Hattersley AT. Prevalence of vascular complications among patients with glucokinase mutations and prolonged, mild hyperglycemia. *JAMA* 311(3): 279-286, 2014.
19. Mirshahi UL, Colclough K, Wright CF, Wood AR, Beaumont RN, Tyrrell J, et al. Reduced penetrance of MODY-associated HNF1A/HNF4A variants but not GCK variants in clinically unselected cohorts. *Am J Hum Genet* 109(11): 2018-2028, 2022.
20. Steele AM, Shields BM, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT, Pearson ER. Increased all-cause and cardiovascular mortality in monogenic diabetes as a result of mutations in the HNF1A gene. *Diabet Med* 27(2): 157-161, 2010.
21. Pearson ER, Starkey BJ, Powell RJ, Gribble FM, Clark PM, Hattersley AT. Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet* 362(9392): 1275-1281, 2003.
22. Bluteau O, Jeannot E, Bioulac-Sage P, Marqués JM, Blanc JF, Bui H, et al. Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat Genet* 32(2): 312-315, 2002.
23. Reznik Y, Dao T, Coutant R, Chiche L, Jeannot E, Clauin S, et al. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene inactivation: cosegregation between liver adenomatosis and diabetes phenotypes in two maturity-onset diabetes of the young (MODY)₃ families. *J Clin Endocrinol Metab* 89(3): 1476-1480, 2004.
24. Miki T, Seino S. Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. *J Mol Cell Cardiol* 38(6): 917-925, 2005.
25. Edghill EL, Flanagan SE, Ellard S. Permanent neonatal diabetes due to activating mutations in ABCC8 and KCNJ11. *Rev Endocr Metab Disord* 11(3): 193-198, 2010.

26. De Franco E, Saint-Martin C, Brusgaard K, Knight Johnson AE, Aguilar-Bryan L, Bowman P, et al. Update of variants identified in the pancreatic β -cell K. *Hum Mutat* 41(5): 884-905, 2020.
27. Pearson ER, Flechtner I, Njølstad PR, Malecki MT, Flanagan SE, Larkin B, et al. Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *N Engl J Med* 355(5): 467-477, 2006.
28. Rafiq M, Flanagan SE, Patch AM, Shields BM, Ellard S, Hattersley AT, et al. Effective treatment with oral sulfonylureas in patients with diabetes due to sulfonylurea receptor 1 (SUR1) mutations. *Diabetes Care* 31(2): 204-209, 2008.
29. Urakami T. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment. *Diabetes Metab Syndr Obes* 12: 1047-1056, 2019.
30. Aarthy R, Aston-Mourney K, Mikocka-Walus A, Radha V, Amutha A, Anjana RM, et al. Clinical features, complications and treatment of rarer forms of maturity-onset diabetes of the young (MODY) - A review. *J Diabetes Complications* 35(1): 107640, 2021.
31. Bellanné-Chantelot C, Chauveau D, Gautier JF, Dubois-Laforgue D, Clauin S, Beaufile S, et al. Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann Intern Med* 140(7): 510-517, 2004.
32. Wat MJ, Shchelochkov OA, Holder AM, Breman AM, Dagli A, Bacino C, et al. Chromosome 8p23.1 deletions as a cause of complex congenital heart defects and diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet A*. 149A(8): 1661-1677, 2009.
33. Lentjes MH, Niessen HE, Akiyama Y, de Bruïne AP, Melotte V, van Engeland M. The emerging role of GATA transcription factors in development and disease. *Expert Rev Mol Med* 18: e3, 2016.
34. Allen HL, Flanagan SE, Shaw-Smith C, De Franco E, Akerman I, Caswell R, et al. GATA6 haploinsufficiency causes pancreatic agenesis in humans. *Nat Genet* 44(1): 20-22, 2011.
35. Shaw-Smith C, De Franco E, Lango Allen H, Batlle M, Flanagan SE, Borowiec M, et al. GATA4 mutations are a cause of neonatal and childhood-onset diabetes. *Diabetes* 63(8): 2888-2894, 2014.
36. Supale S, Li N, Brun T, Maechler P. Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells. *Trends Endocrinol Metab* 23(9): 477-487, 2012.
37. Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, et al. The m.3243A>G mitochondrial DNA mutation and related phenotypes. A matter of gender? *J Neurol* 261(3): 504-510, 2014.
38. Guillausseau PJ, Massin P, Dubois-LaForgue D, Timsit J, Virally M, Gin H, et al. Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. *Ann Intern Med* 134(9 Pt 1): 721-728, 2001.
39. van ven Ouweland JM, Cryns K, Pennings RJ, Walraven I, Janssen GM, Maassen JA, et al. Molecular characterization of WFS1 in patients with Wolfram syndrome. *J Mol Diagn* 5(2): 88-95, 2003.
40. Astuti D, Sabir A, Fulton P, Zatyka M, Williams D, Hardy C, et al. Monogenic diabetes syndromes: Locus-specific databases for Alström, Wolfram, and Thiamine-responsive megaloblastic anemia. *Hum Mutat* 38(7): 764-777, 2017.
41. Urano F. Wolfram Syndrome: Diagnosis, Management, and Treatment. *Curr Diab Rep* 16(1): 6, 2016.
42. Shepherd M, Brook AJ, Chakera AJ, Hattersley AT. Management of sulfonylurea-treated monogenic diabetes in pregnancy: implications of placental glibenclamide transfer. *Diabet Med* 34(10): 1332-1339, 2017.
43. Ellard S, Beards F, Allen LI, Shepherd M, Ballantyne E, Harvey R, et al. A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria. *Diabetologia* 43(2): 250-253, 2000.
44. Spyer G, Macleod KM, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT. Pregnancy outcome in patients with raised blood glucose due to a heterozygous glucokinase gene mutation. *Diabet Med* 26(1): 14-18, 2009.
45. Dickens LT, Naylor RN. Clinical Management of Women with Monogenic Diabetes During Pregnancy. *Curr Diab Rep* 18(3): 12, 2018.
46. Spyer G, Hattersley AT, Sykes JE, Sturley RH, MacLeod KM. Influence of maternal and fetal glucokinase mutations in gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 185(1): 240-241, 2001.
47. Pearson ER, Boj SF, Steele AM, Barrett T, Stals K, Shield JP, et al. Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS Med* 4(4): e118, 2007.
48. Dickens LT, Thomas CC. Updates in Gestational Diabetes Prevalence, Treatment, and Health Policy. *Curr Diab Rep* 19(6): 33, 2019.
49. Laver TW, Colclough K, Shepherd M, Patel K, Houghton JA, Dusatkova P, et al. The Common p.R114W HNF4A Mutation Causes a Distinct Clinical Subtype of Monogenic Diabetes. *Diabetes* 65(10): 3212-3217, 2016.

a cura di Simona Frontoni

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

Ulcere ischemiche del piede diabetico: terapia cellulare autologa come possibile trattamento adiuvante

Risultati di uno studio prospettico non controllato sul trattamento cellulare con cellule mononucleate da sangue periferico in pazienti affetti da piede diabetico ulcerato e malattia dei piccoli vasi: efficacia, sicurezza e valutazione economica

Ischemic diabetic foot ulcers: autologous cell therapy as a possible adjuvant treatment

Results from a prospective uncontrolled study on autologous peripheral blood mononuclear cells in patients with small artery disease and diabetic foot ulcers: efficacy, safety, and economic evaluation

Matteo Monami

SOD Diabetologia e Malattie metaboliche, AOU-Careggi; Firenze

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2303d>

ABSTRACT

Background/aim: *this editorial is aimed at providing some insights on cell therapy in patients with diabetic foot ulcers and no-option critical limb-threatening ischemia (CLTI).*

Methods and results: *the present paper revised the available evidence on cell therapy in patients affected by diabetes and peripheral artery disease and reported the main results of a recently published uncontrolled study on the effects of peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) therapy in patients with diabetic foot ulcers, no-option CLTI, and small artery disease. All patients included in that study were allocated in a surgery waiting-list for major amputations. Patients treated with autologous PBMNC experienced a significant reduction of pain levels, an increase of oxygen tissue levels, a high rate of healing without the need of a major amputation.*

Conclusions: *the present paper illustrates the possible favorable effects of PBMNC cell therapy in patients with diabetes and peripheral artery disease even in presence of microangiopathy.*

KEYWORDS

PBMNC, diabetes, foot ulcers, no-option critical limb-threatening ischemia, small artery disease.

INTRODUZIONE

Le ulcere del piede diabetico rappresentano la principale causa di ospedalizzazione ed amputazione maggiore degli arti inferiori e nei pazienti diabetici con lesioni ulcerative in atto si stima che il rischio di amputazione maggiore sia di circa 15 volte superiore rispetto a quello dei soggetti non diabetici (1-2).

La causa principale dell'amputazione nei pazienti con piede diabetico è quasi sempre legata direttamente o indirettamente alla presenza dell'Arteriopatia Obliterante Periferica (AOP), che nei pazienti diabetici spesso si presenta con quadri ad evoluzione più rapida e più grave rispetto ai non diabetici (3). Si stima che la presenza di ischemia critica agli arti inferiori nei diabetici possa raggiungere prevalenze di quasi il 25% con prognosi *quod vitam* (4) e *quod functionem* (5) molto sfavorevole.

L'ulcera ischemica del piede diabetico è l'anello di congiunzione che lega l'ischemia distrettuale dell'AOP all'amputazione, che viene infatti quasi sempre preceduta da una lesione trofica degli arti inferiori (6).

Le sedi più frequenti dell'ulcera ischemica sono quelle marginali del piede (2) (Fig. 1), dove la circolazione terminale non permette un margine sufficiente di compenso emodinamico.

L'approccio terapeutico ai pazienti diabetici con AOP è fondamentalmente legato alle possibilità di rivascolarizzazione.

Figura 1 ◆



PROCEDURE DI RIVASCOLARIZZAZIONE

Per molto tempo, l'unica opzione terapeutica era quella chirurgica (by-pass) che è rimasta fino a pochi anni fa il "gold standard" del trattamento della AOP, nonostante l'introduzione negli anni Novanta di procedure endovascolari (PTA - Percutaneous Transluminal Angioplasty). Infatti, rispetto all'angioplastica, il by-pass si è sempre contraddistinto per una maggiore durata della pervietà dei vasi trattati, anche se con un rischio di eventi avversi peri procedurali più elevato (7).

Recentemente, tuttavia, l'approccio endoluminale ha compiuto notevoli progressi in termini di efficacia, durabilità e sicurezza (8) tali da, in alcuni sistemi sanitari, far prediligere questa modalità di rivascolarizzazione a quella chirurgica tradizionale (9).

Qualunque sia l'approccio utilizzato per rivascolarizzare l'arto inferiore, tuttavia, circa il 25% dei pazienti affetti da ischemia critica non risultano essere rivascolarizzabili per vari motivi, quali la presenza di numerose comorbidità (es. insufficienza renale grave), estese calcificazioni dell'intima-media, assenza di vene adatte a confezionare un by-pass, numerosi tentativi pregressi, ecc. (10). In queste situazioni, si parla di ischemia critica 'no-option' con quadri ischemici molto eterogenei che possono arrivare fino alla completa assenza o quasi di circolazione a livello del piede ("desert foot") (2).

I pazienti diabetici con una ischemia critica non rivascolarizzabile (o non ulteriormente rivascolarizzabile) rispetto ai soggetti che vengono rivascolarizzati, sono quelli a maggior rischio di amputazione maggiore (30% vs 4.5%) e di eventi fatali (50% vs 8.9%) (11). Tale rischio di eventi avversi maggiori aumenta ulteriormente in presenza della cosiddetta malattia dei piccoli vasi (Small Artery Disease - SAD), spesso poco conosciuta e quindi poco diagnosticata; tale condizione si trova più frequentemente proprio nei soggetti diabetici, specie se affetti anche da insufficienza renale o in trattamento dialitico (12-13). La SAD è una condizione vascolare, non ancora bene definita e studiata, che colpisce i piccoli vasi dell'arco plantare (12-13) con vari gradi di estensione che possono arrivare fino al cosiddetto "desert foot".

Nonostante la sua prevalenza (circa il 20-25% dei pazienti con piede diabetico ischemico) e il suo impatto prognostico, le opzioni terapeutiche per la SAD, così come per l'ischemia critica non rivascolarizzabile, sono limitate e spesso poco efficaci aumentando considerevolmente il rischio di amputazione, mortalità e spese dirette ed indirette per i sistemi sanitari di tutto il mondo.

TERAPIA CELLULARE AUTOLOGA

Negli ultimi anni, la terapia cellulare (cellule staminali mesenchimali, cellule mononucleate del midollo sanguigno con o senza stimolazione midollare) è risultata essere un approccio promettente per affrontare l'ischemia critica non rivascolarizzabile, promuovendo l'angiogenesi, la vasculogenesi e la riparazione dei tessuti. La terapia cellulare autologa, infatti, ha mostrato effetti favorevoli su diversi esiti, come il dolore, la tensione transcutanea di ossigeno, la guarigione dell'ulcera, l'amputazione maggiore e la mortalità (14).

Esistono numerosi meccanismi di azione in grado di fornire una plausibilità biologica a queste azioni favorevoli. In particolare, le cellule mononucleate da sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC) che comprendono monociti/macrofagi e linfociti, aumentano la circolazione periferica stimolando la neo-angiogenesi attraverso attività paracrine di molteplici fattori di crescita (15-16). Come noto da tempo, infatti, il reclutamento para fisiologico dei monociti (ma anche dei linfociti [17-18]) nelle aree ischemiche favorisce la formazione di circoli vascolari collaterali (19), in grado di produrre e rilasciare nell'ambiente fattori pro-angiogenici, citochine e molecole messaggere che agiscono con effetto paracrino (15). Tale capacità angiogenica aumenta nel tessuto ischemico (16, 20-21) ed è mantenuta anche nei pazienti diabetici (22). Un'altra azione fondamentale dei monociti/macrofagi è quella stimolativa dei processi di rigenerazione tissutale (23-24). Queste cellule, infatti, vengono reclutate a livello di aree cutanee lesionate (19) ed esercitano la propria azione riparativa mediante la produzione di fattori di crescita (25), dimostrata anche nelle lesioni ulcerative del piede diabetico (26, 29, 34, 36). I monociti, inoltre, sono in grado di attivare la conversione dei macrofagi infiammatori M1, presenti in alte concentrazioni in tutte le lesioni croniche (in particolare nel piede diabetico [27]), in macrofagi M2. Questi ultimi sono dotati di proprietà antinfiammatorie e rigenerative, pertanto capaci di creare un microambiente altamente favorevole alla rigenerazione tissutale. Il rilascio, infine, di oppioidi naturali da parte dei macrofagi M2 (28) determina una importante azione antalgica, riducendo sensibilmente il dolore percepito dal paziente.

La terapia cellulare può essere somministrata attraverso vie e metodologie diverse a seconda delle linee cellulari utilizzate, dello stadio della malattia e dell'obiettivo del trattamento. Le vie di somministrazione più comuni includono

l'iniezione intramuscolare, l'infusione endovenosa, l'iniezione diretta nel tessuto o nel muscolo bersaglio e la somministrazione attraverso specifici supporti bioattivi (29).

Cellule autologhe mononucleate da sangue periferico prelevate senza stimolazione con fattore di mobilitazione

Negli ultimi anni, alcuni autori hanno proposto l'iniezione intramuscolare di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMNCs) senza stimolazione midollare (mobilitazione), che ha dimostrato un'efficacia simile rispetto alle cellule staminali "tradizionali". Studi recenti hanno, infatti, mostrato come anche le popolazioni monocitarie e linfocitarie da sangue periferico hanno, similmente a quelle progenitrici midollari, ottime proprietà neo-angiogeniche (16, 20) e rigenerative (15) a livello tissutale.

Inoltre, questo nuovo approccio presenta diversi vantaggi, come l'impiego di tecniche di estrazione meno invasive, procedure più brevi e meno dolorose e ripetibili (19, 29).

Sulla base di queste considerazioni, sono state sviluppate nuove tecnologie che hanno reso possibile la produzione di concentrati di cellule autologhe mononucleate provenienti da sangue periferico (senza necessità di stimolazione con fattori di crescita nei giorni precedenti il prelievo), spostando l'attenzione della comunità scientifica, impegnata nel campo della medicina rigenerativa, dalle "tradizionali" cellule staminali midollari o da tessuto adiposo, a quelle immunitarie (in particolare monociti/macrofagi e linfociti) (30).

Qualunque sia la linea cellulare utilizzata e la via di somministrazione impiegata, infatti, la terapia cellulare in pazienti affetti da lesioni ulcerative ischemiche si è dimostrata una valida opzione soprattutto nel caso di soggetti affetti da arteriopatia obliterante periferica giudicata non rivascolarizzabile (o non ulteriormente rivascolarizzabile) (14, 31).

Numerose metanalisi di studi randomizzati e osservazionali (14, 31) hanno, infatti, mostrato un miglior outcome clinico nei pazienti con CLI non option trattati con terapia cellulare autologa, con riduzione dei livelli di dolore percepito maggiore probabilità di guarigione delle lesioni ulcerative e degli indici di perfusione periferica, quali ABI e TcPO₂. In particolare, Rigato et al. hanno dimostrato in analisi estensiva per tipologia di terapia cellulare, comparando mononucleate da midollo (BM-MNC), mesenchimali da midollo (BM-MSC) e PBMNC che solo queste ultime riducevano in modo significativo l'amputazione di pazienti con ischemia critica non-option (14).

Nonostante vi possano essere dei dubbi sull'efficacia di tali terapie nel paziente diabetico, in quanto la presenza di diabete può alterare in maniera significativa le proprietà angiogeniche e rigenerative delle popolazioni cellulari midollari utilizzate (14, 31-33), la maggior parte delle evidenze sembra non mostrare differenti profili di azione della terapia cellulare con PBMNC nella popolazione diabetica (34-37).

DESCRIZIONE DELLO STUDIO PROSPETTICO

Recentemente abbiamo pubblicato uno studio non controllato su una serie consecutiva di pazienti con lesioni ulcerative del piede diabetico ed affetti da AOP giudicata non operabile e malattia dei piccoli vasi (SAD - Small Artery Disease) (37). Tutti i pazienti inclusi nell'analisi erano allocati in una lista di attesa per un intervento di amputazione maggiore. Lo scopo dello studio, oltre a valutare l'effetto di un ciclo di terapia cellulare sulla guarigione delle lesioni ulcerative (tutte di grado Texas 3) senza un atto demolitivo maggiore e/o sulla possibilità di distalizzare l'amputazione, è stato anche quello di valutare la sostenibilità economica dell'intervento proposto.

La scelta di questa particolare tipologia di pazienti è stata fatta in quanto non esiste, come detto, alcun trattamento codificato per la SAD e le poche opzioni terapeutiche esistenti, come la modifica dello stile di vita, l'impiego di farmaci vasoattivi (es. anticoagulanti, prostaglandine ecc.) e le procedure di rivascolarizzazione hanno un'efficacia limitata e in alcuni casi significativi effetti collaterali (12).

Il concentrato cellulare di PBMNC è stato prodotto con sistema a filtrazione selettiva Hematrate Procedure Pack (Athena Cell Therapy Technologies) (Fig. 2), con indicazione d'uso per terapia cellulare umana e caratterizzazione pubblicata su rivista scientifica indicizzata (38).

Figura 2 ◆



I risultati di questo studio (37) seppur incoraggianti (miglioramento significativo dei valori ossimetrici, aumento dei tassi di guarigione mediante atti chirurgici minori, amputazione maggiore necessaria solo nel 20% dei pazienti inclusi, riduzione dei livelli di dolore percepito (Fig. 1) e apparentemente costo-efficaci, devono tener conto di alcuni limiti importanti, quali la natura osservazionale dello studio (non controllato), dell'esigua numerosità della casistica arruolata ed il breve follow-up (1 anno).

Tuttavia, nonostante i limiti sopra descritti, i dati ottenuti sono, come detto, promettenti e rendono la terapia cellulare con PBMNC una possibile arma terapeutica nei pazienti con arteriopatía obliterante agli arti inferiori non rivascolarizzabile, anche in presenza di microangiopatía.

CONCLUSIONI

La terapia cellulare con PBMNC è entrata nella pratica clinica per il trattamento di CLI non option, nei fallimenti della rivascolarizzazione, e anche come terapia adiuvante alla rivascolarizzazione nei pazienti diabetici e nel trattamento del piede diabetico e delle lesioni non healing. Considerando l'elevato numero di studi clinici e di meta-analisi pubblicati, dal 2002 al 2020, e l'alto numero di pazienti trattati in Italia, forse dovremmo ritenere la terapia cellulare autologa con PBMNC una arma potenzialmente in grado di modificare la storia naturale dell'ischemia critica nei pazienti con ischemia critica "no-option". È, a questo proposito, è importante ricordare che queste terapie possono essere utilizzate al di fuori di qualsiasi sperimentazione, a condizione che i dati scientifici, che descrivono specificamente i metodi, la preparazione e l'uso, siano disponibili e pubblicati su riviste internazionali peer-reviewed.

Va inoltre sottolineato che la normativa europea con la nuova revisione della legislazione sulle cellule e i tessuti del sangue, adottata nell'ultimo trimestre del 2021, mira ad aggiornare la legislazione nella direzione di un allineamento

più flessibile con gli sviluppi scientifici e tecnologici. In linea con questo obiettivo, sembra muoversi nella direzione di una semplificazione, basata sull'analisi del rischio, per la produzione di prodotti di terapia cellulare autologa con cellule minimamente manipolate, prodotte con sistemi point-of-care, all'interno di una singola procedura chirurgica, per facilitarne l'uso ed evitare inutili e sproporzionati ostacoli burocratici, soprattutto per malattie critiche come la CLI che rappresentano un bisogno medico insoddisfatto (39).

BIBLIOGRAFIA

1. Ebskov B, Josephsen P. Incidence of reamputation and death after gangrene of the lower extremity. *Prosthet Orthot Int* 4(2): 77-80, 1980. doi: 10.3109/03093648009164567.
2. Meloni M, Izzo V, Giurato L, Lázaro-Martínez JL, Uccioli L. Prevalence, Clinical Aspects and Outcomes in a Large Cohort of Persons with Diabetic Foot Disease: Comparison between Neuropathic and Ischemic Ulcers. *J Clin Med* 9(6), 2020. doi: 10.3390/jcm9061780.
3. Thiruvoipati T, Kielhorn CE, Armstrong EJ. Peripheral artery disease in patients with diabetes: Epidemiology, mechanisms, and outcomes. *World J Diabetes* 6(7): 961-969, 2015. doi: 10.4239/wjd.v6.i7.961.
4. Elsayed S, Clavijo LC. Critical limb ischemia. *Cardiol Clin* 33(1): 37-47, 2015. doi: 10.1016/j.ccl.2014.09.008.
5. Reinecke H, Unrath M, Freisinger E, et al. Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence. *Eur Heart J* 36(15): 932-938, 2015. doi: 10.1093/eurheartj/ehv006.
6. Pecoraro RE, Reiber GE, Burgess EM. Pathways to diabetic limb amputation. Basis for prevention. *Diabetes Care* 13(5): 513-521, 1990. doi: 10.2337/diacare.13.5.513.
7. Romiti M, Albers M, Brochado-Neto FC, Durazzo AE, Pereira CA, De Luccia N. Meta-analysis of infrapopliteal angioplasty for chronic critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 47(5): 975-981, 2008. doi: 10.1016/j.jvs.2008.01.005.
8. Conte MS, Bradbury AW, Kolh P, et al. Global Vascular Guidelines on the Management of Chronic Limb-Threatening Ischemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 58(1s): S1-S109.e33, 2019. doi: 10.1016/j.ejvs.2019.05.006.
9. Setacci C, Sirignano P, Galzerano G, et al. Endovascular first as "preliminary approach" for critical limb ischemia and diabetic foot. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 54(6): 679-84, 2013.
10. Antoniou GA, Georgiadis GS, Antoniou SA, Makar RR, Smout JD, Torella F. Bypass surgery for chronic lower limb ischaemia. *Cochrane Database Syst Rev* 4(4): Cd002000, 2017. doi: 10.1002/14651858.CD002000.pub3.
11. Antonopoulos CN, Mylonas SN, Moulakakis KG, et al. A network meta-analysis of randomized controlled trials comparing treatment modalities for de novo superficial femoral artery occlusive lesions. *J Vasc Surg* 65(1): 234-245.e11, 2017. doi: 10.1016/j.jvs.2016.08.095.
12. Ferraresi R, Mauri G, Losurdo F, et al. BAD transmission and SAD distribution: a new scenario for critical limb ischemia. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 59(5): 655-664, 2018. doi: 10.23736/s0021-9509.18.10572-6.
13. Ferraresi R, Ucci A, Pizzuto A, et al. A Novel Scoring System for Small Artery Disease and Medial Arterial Calcification Is Strongly Associated With Major Adverse Limb Events in Patients With Chronic Limb-Threatening Ischemia. *J Endovasc Ther* 28(2): 194-207, 2021. doi: 10.1177/1526602820966309.
14. Rigato M, Monami M, Fadini GP. Autologous Cell Therapy for Peripheral Arterial Disease: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Nonrandomized, and Noncontrolled Studies. *Circ Res* 120(8): 1326-1340, 2017. doi: 10.1161/circresaha.116.309045.
15. Beer L, Mildner M, Gyöngyösi M, Ankersmit HJ. Peripheral blood mononuclear cell secretome for tissue repair. *Apoptosis* 21(12): 1336-1353, 2016. doi: 10.1007/s10495-016-1292-8.
16. Gurevich DB, Severn CE, Twomey C, et al. Live imaging of wound angiogenesis reveals macrophage orchestrated vessel sprouting and regression. *Embo j* 37(13), 2018. doi: 10.15252/embj.201797786.
17. Kwee BJ, Seo BR, Najibi AJ, et al. Treating ischemia via recruitment of antigen-specific T cells. *Sci Adv* 5(7): eaav6313, 2019. doi: 10.1126/sciadv.aav6313.
18. Li J, Tan J, Martino MM, Lui KO. Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. *Front Immunol* 9: 585, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.00585.

19. Magenta A, Florio MC, Ruggeri M, Furgiuele S. Autologous cell therapy in diabetes-associated critical limb ischemia: From basic studies to clinical outcomes (Review). *Int J Mol Med* 48(3), 2021 doi: 10.3892/ijmm.2021.5006.
20. Krishnasamy K, Limbourg A, Kapanadze T, et al. Blood vessel control of macrophage maturation promotes arteriogenesis in ischemia. *Nat Commun* 8(1): 952, 2017. doi: 10.1038/s41467-017-00953-2.
21. Patel AS, Smith A, Nucera S, et al. TIE2-expressing monocytes/macrophages regulate revascularization of the ischemic limb. *EMBO Mol Med* 5(6): 858-869, 2013. doi: 10.1002/emmm.201302752.
22. Awad O, Dedkov EI, Jiao C, Bloomer S, Tomanek RJ, Schatteman GC. Differential healing activities of CD34+ and CD14+ endothelial cell progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(4): 758-764, 2006. doi: 10.1161/01.ATV.0000203513.29227.6f.
23. Ogle ME, Segar CE, Sridhar S, Botchwey EA. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design. *Exp Biol Med (Maywood)* 241(10):1084-1097, 2016. doi: 10.1177/1535370216650293.
24. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44(3): 450-462, 2016. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.
25. Minutti CM, Knipper JA, Allen JE, Zaiss DM. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin Cell Dev Biol* 61: 3-11, 2017. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.08.006.
26. Kimball A, Schaller M, Joshi A, et al. Ly6C(Hi) Blood Monocyte/Macrophage Drive Chronic Inflammation and Impair Wound Healing in Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38(5): 1102-1114, 2018. doi: 10.1161/atvbaha.118.310703.
27. Kanter JE, Kramer F, Barnhart S, et al. Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(12): E715-24, 2012. doi: 10.1073/pnas.1111600109.
28. Pannell M, Labuz D, Celik M, et al. Adoptive transfer of M2 macrophages reduces neuropathic pain via opioid peptides. *J Neuroinflammation* 13(1): 262, 2016. doi: 10.1186/s12974-016-0735-z.
29. Persiani F, Paolini A, Camilli D, et al. Peripheral Blood Mononuclear Cells Therapy for Treatment of Lower Limb Ischemia in Diabetic Patients: A Single-Center Experience. *Ann Vasc Surg* 53: 190-196, 2018. doi: 10.1016/j.avsg.2018.05.036.
30. Benoit E, O'Donnell TF, Patel AN. Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review. *Cell Transplant* 22(3): 545-562, 2013. doi: 10.3727/096368912x636777.
31. Ai M, Yan CF, Xia FC, Zhou SL, He J, Li CP. Safety and efficacy of cell-based therapy on critical limb ischemia: A meta-analysis. *Cytotherapy* 18(6): 712-724, 2016. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.02.009.
32. Bitar MS. Diabetes Impairs Angiogenesis and Induces Endothelial Cell Senescence by Up-Regulating Thrombospondin-CD47-Dependent Signaling. *Int J Mol Sci* 20(3), 2019. doi: 10.3390/ijms20030673.
33. Fadini GP, Albiero M, Bonora BM, Avogaro A. Angiogenic Abnormalities in Diabetes Mellitus: Mechanistic and Clinical Aspects. *J Clin Endocrinol Metab* 104(11): 5431-5444, 2019. doi: 10.1210/jc.2019-00980.
34. Panunzi A, Madotto F, Sangalli E, et al. Results of a prospective observational study of autologous peripheral blood mononuclear cell therapy for no-option critical limb-threatening ischemia and severe diabetic foot ulcers. *Cardiovasc Diabetol* 21(1): 196, 2022. doi: 10.1186/s12933-022-01629-y.
35. Raghianti B, Piaggese A, Mannucci E, Monami M. Effects of local antibiotics in calcium-sulphate granules for the treatment of diabetic forefoot osteomyelitis: a propensity-matched observational study. *Journal of Wound Management* 24(2), 2023. epub-ahead of print.
36. Scatena A, Petruzzi P, Maioli F, et al. Autologous Peripheral Blood Mononuclear Cells for Limb Salvage in Diabetic Foot Patients with No-Option Critical Limb Ischemia. *J Clin Med* 10(10), 2021. doi: 10.3390/jcm10102213.
37. Raghianti B, Berardi BM, Mannucci E, Monami M. Autologous Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Small Artery Disease and Diabetic Foot Ulcers: Efficacy, Safety, and Economic Evaluation. *J Clin Med* 12(12), 2023. doi: 10.3390/jcm12124148.
38. Spaltro G, Straino S, Gambini E, Bassetti B, Persico L, Zoli S, Zanobini M, Capogrossi MC, Spirito R, Quarti C, Pompilio G. Characterization of the Pall Celeris system as a point-of-care device for therapeutic angiogenesis. *Cytotherapy* 17(9): 1302-1313. 2015. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.04.006. Epub 2015 May 30.
39. European Commission Evaluation of the Union legislation on blood, tissues and cells- COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT. SWD, 376, 2019.

a cura di Marta Letizia Hribal

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

ARTICOLI SELEZIONATI E COMMENTATI

Il Diabete n. 3/2023

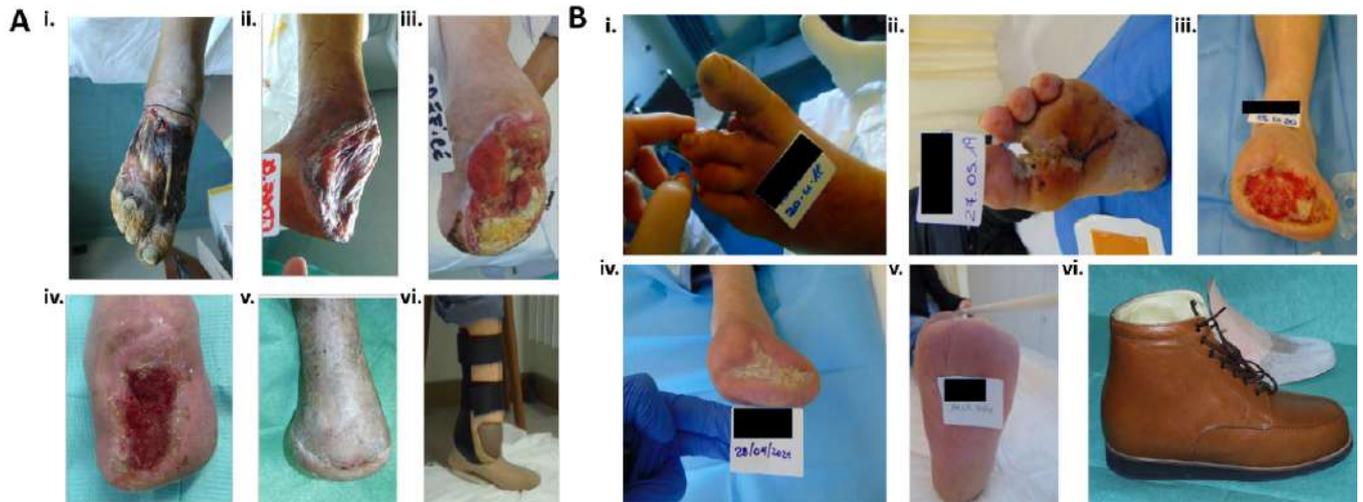
DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2303e>

Efficacia della terapia cellulare in pazienti con ischemia critica ed ulcere del piede diabetico: risultati di uno studio prospettico osservazionale ♦ *Results of a prospective observational study of autologous peripheral blood mononuclear cell therapy for no-option critical limb-threatening ischemia and severe diabetic foot ulcers*

Panunzi A et al. Cardiovasc Diabetol 2022 Sep 28; 21(1):196

Nell'editoriale di questo numero vengono illustrate le possibilità offerte dalla terapia con cellule mononucleari del sangue periferico (PBMNC) per il trattamento di pazienti con ulcere del piede diabetico e ischemia critica che minaccia l'arto (CLTI), illustrando in particolare i risultati di un recentissimo studio non controllato, condotto dal gruppo del prof. Monami, autore dell'Editoriale. Nel lavoro qui riassunto, che ha visto la collaborazione di più gruppi di ricercatori italiani con notevole esperienza sul piede diabetico, sono stati inclusi 50 pazienti con CTLI, non elegibili per trattamenti di rivascularizzazione e quindi ad elevato rischio di amputazione, che avevano ricevuto un massimo di 3 infusioni intramuscolari di PBMNC. Ad 1 anno dal reclutamento, 8 pazienti (16% dell'intera coorte) erano andati incontro ad amputazione maggiore; mentre al termine del follow-up (durata media 1,5 anni) questo numero era salito a 9. Tuttavia, nonostante per la loro condizione di partenza tutti e 50 i pazienti fossero ad elevato rischio per amputazione sopra il ginocchio (ATK), in 5 casi, dei 9 sottoposti ad amputazione, si è trattato di amputazioni sotto il ginocchio (BTK). Il 47% dei pazienti sopravvissuti ad 1 anno dal reclutamento (34 su 50 inizialmente reclutati) è andato incontro a guarigione, con un tempo medio di 257 giorni. Al termine del follow-up 26 soggetti su 34 erano in condizioni di camminare in modo soddisfacente con calzature o supporti appositi. È stato inoltre osservato un significativo miglioramento della perfusione tissutale nei pazienti sottoposti a terapia con PBMNC.

I risultati di questo studio, in linea con quelli presentati nell'editoriale, sottolineano come la terapia cellulare autologa con PBMNC dovrebbe essere considerata quale fondamentale strumento nel trattamento di pazienti con ischemia critica "no-option". Come ben evidenziato dal prof. Monami, la revisione della legislazione europea sulle cellule e i tessuti del sangue va nella direzione di una maggiore flessibilità e semplificazione; motivo per cui si può ipotizzare che nel prossimo futuro ci possa essere un'applicazione maggiormente diffusa della terapia con PBMNC, nel trattamento di malattie critiche come la CLTI, le quali, allo stato attuale, rappresentano un bisogno medico insoddisfatto.



Immagini rappresentative di due casi clinici. Da sinistra in alto a destra in basso si osserva l'evoluzione delle ulcere e la predisposizione di supporti utili a favorire una buona qualità della capacità residua di cammino.

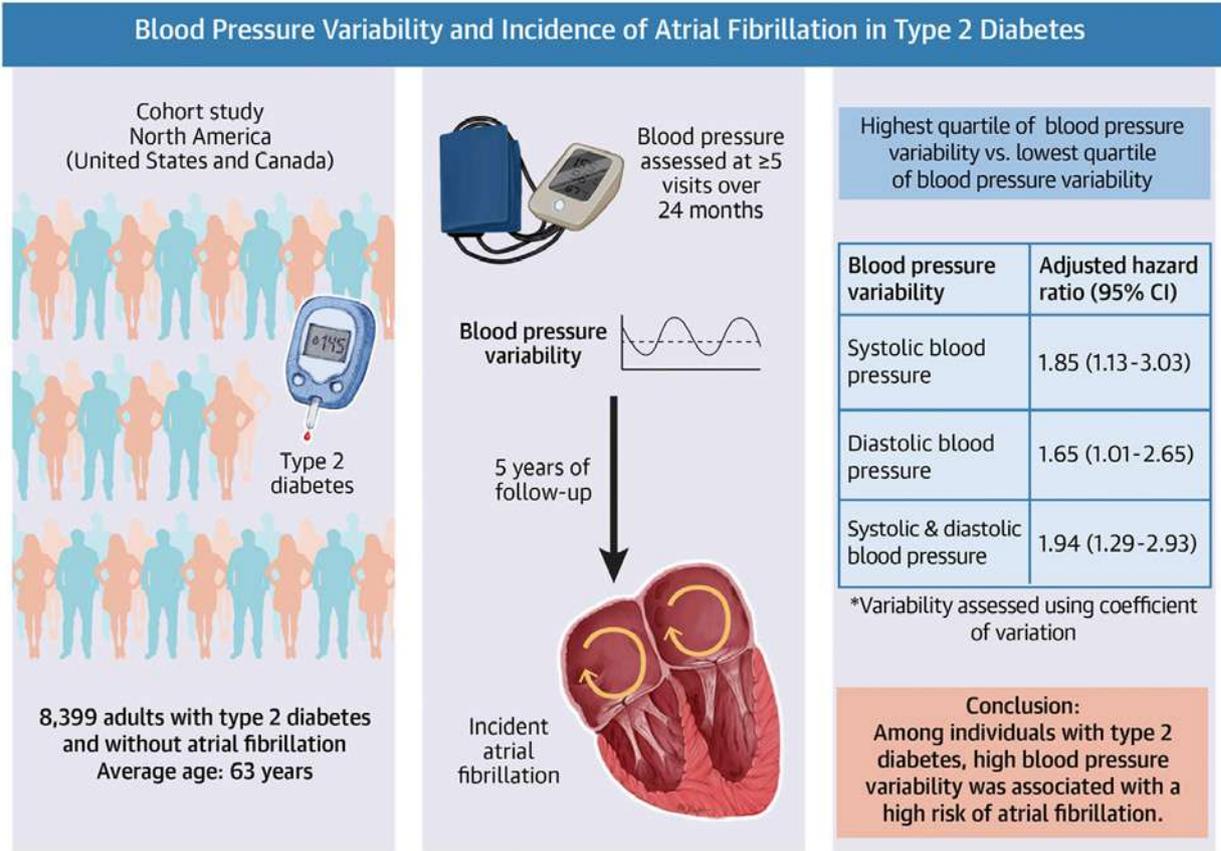
Proseguiamo con questo numero la selezione dei contributi del Journal Club, pubblicati negli ultimi tre mesi, corredati da graphical abstract, uno strumento utile per trasmettere il messaggio in modo immediato e di impatto.

Ricordiamo ai Lettori che possono trovare i commenti sui canali social della SID: Facebook (www.facebook.com/SocietaItalianadiDiabetologia), Twitter (SID Italia (@Sid_Italia) / Twitter) e LinkedIn ((25) SID - Società Italiana di Diabetologia: Panoramica | LinkedIn); Li invitiamo a condividerli con i loro followers ed amici.

CVD nel diabete

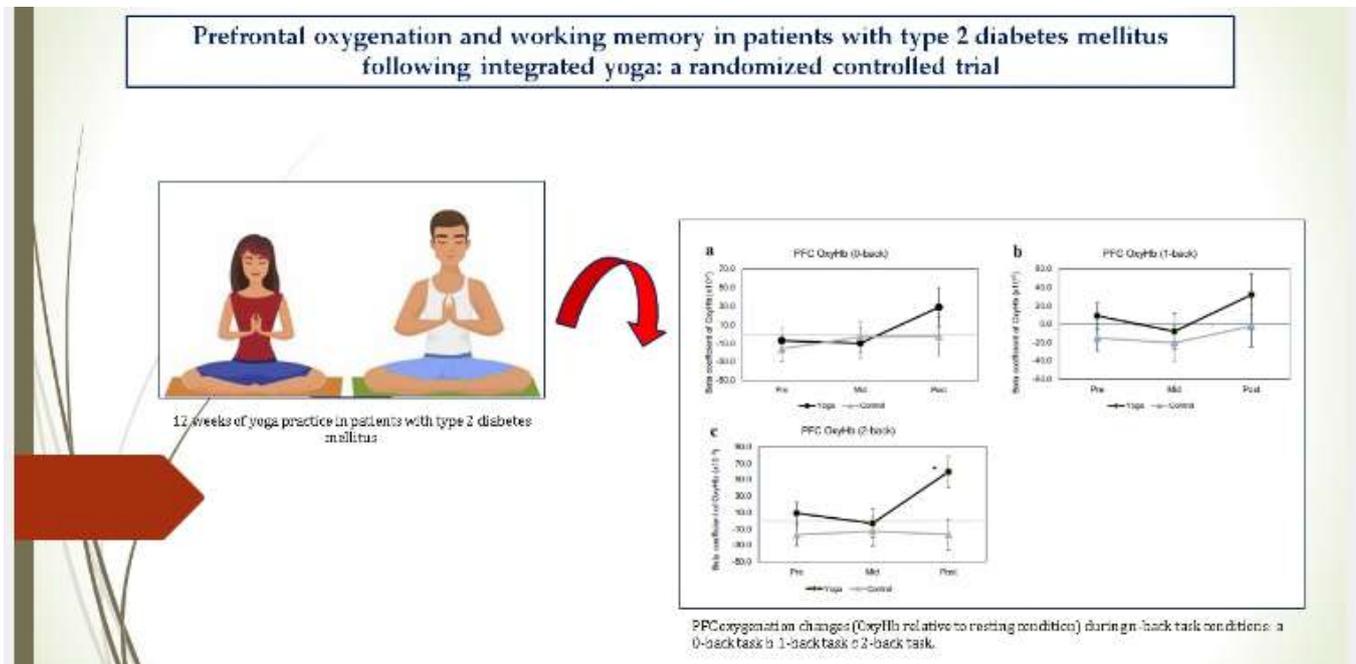
Non solo alta, anche ballerina fa male: pressione arteriosa e fibrillazione atriale - A cura di Lorenzo Nesti

Link al commento: Blood Pressure Variability and Risk of Atrial Fibrillation in Adults With Type 2 Diabetes (siditalia.it)



Compiti per le vacanze: migliorare le capacità meditative e respiratorie - A cura di Raffaele Galiero

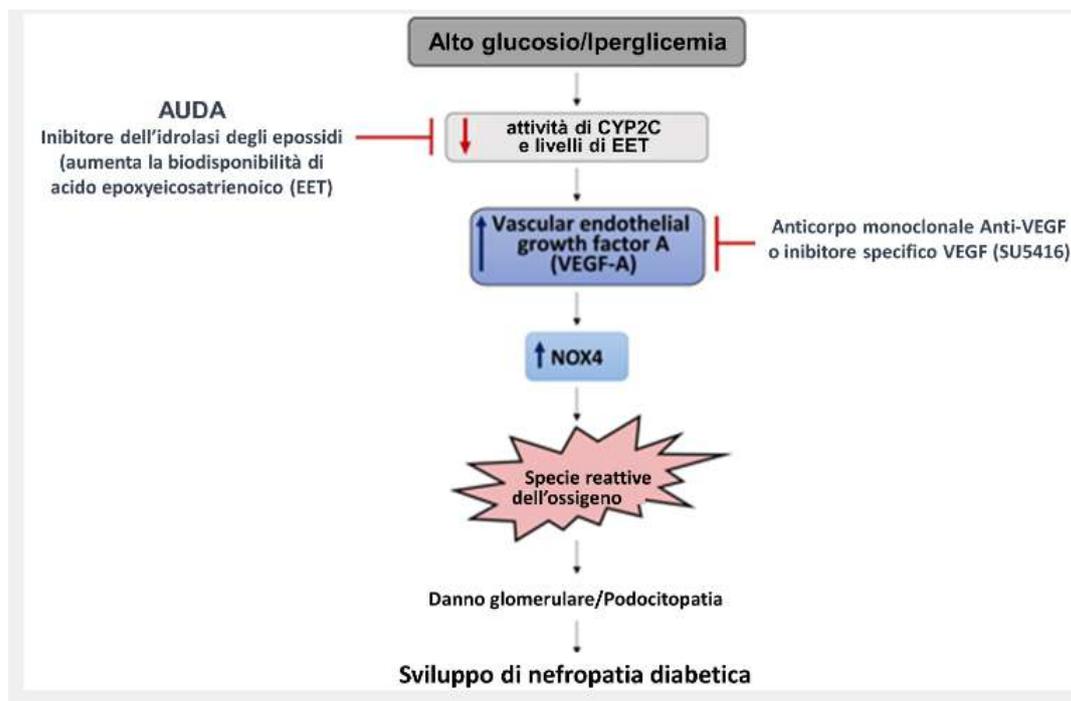
Link al commento: Prefrontal oxygenation and working memory in patients with type 2 diabetes mellitus following integrated yoga: a randomized controlled trial (siditalia.it)



Nefropatia

VEGF-A, occhio non vede e rene duole: un futuro bersaglio terapeutico anche per la nefropatia diabetica? - A cura di Stefano Menini

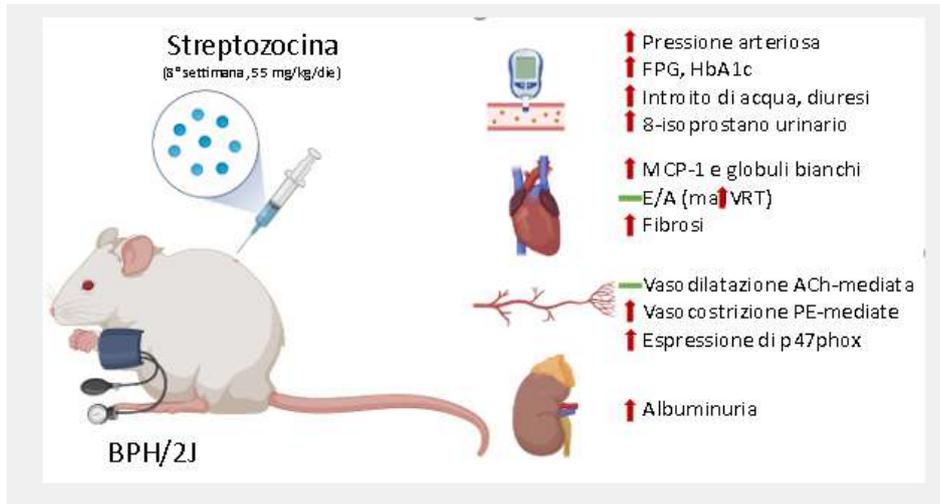
Link al commento: VEGF-A: A Novel Mechanistic Link Between CYP2C-Derived EETs and Nox4 in Diabetic Kidney Disease (siditalia.it)



Ipertensione e diabete

Uomini e topi: l'importanza dei modelli di malattia cardiometabolica - A cura di Alessandro Mengozzi

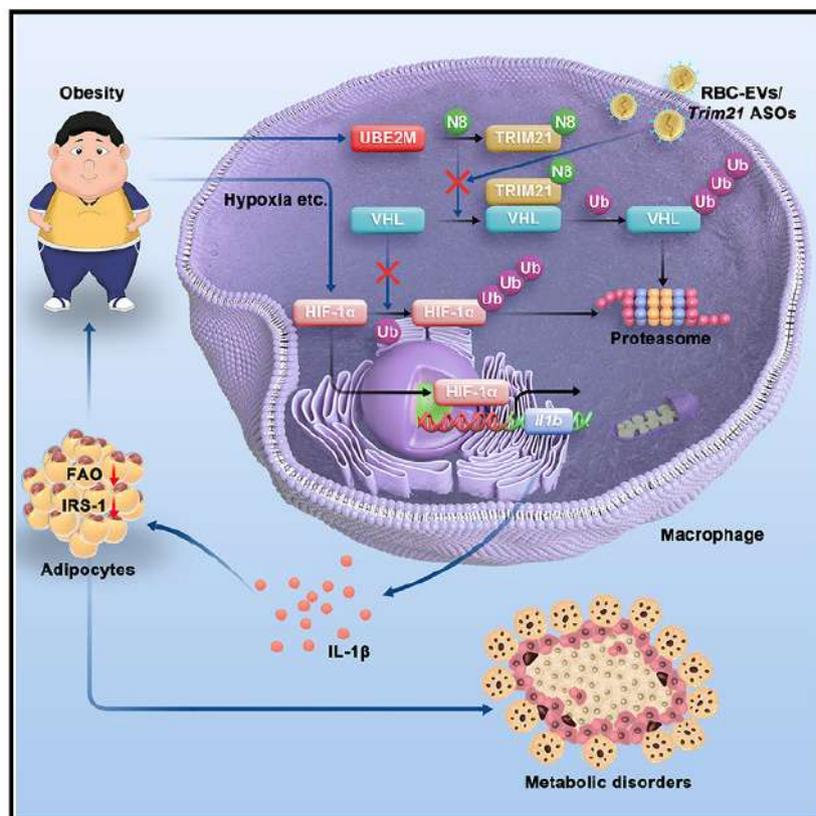
Link al commento: Cardiovascular characterisation of a novel mouse model that combines hypertension and diabetes co-morbidities (siditalia.it)



Aspetti molecolari nella patogenesi del diabete tipo 2

New insights in tema di infiammazione obesità-mediata e alterazioni metaboliche correlate: la neddilazione un meccanismo fondamentale - A cura di Chiara Maria Assunta Cefalo

Link al commento: UBE2M-mediated neddylation of TRIM21 regulates obesity-induced inflammation and metabolic disorders (siditalia.it)



a cura di Carla Greco¹, Massimiliano Cavallo²

¹Unità di Endocrinologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia;

²Medicina interna, Azienda Ospedaliera "Santa Maria" di Terni

Il ruolo dei progenitori delle cellule endoteliali nel diabete mellito

The role of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus

Miriam Longo^{1,2}, Antonietta Maio¹, Graziella Botta¹, Paola Caruso², Katherine Esposito^{1,2}

¹Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche avanzate, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli;

²Divisione di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, AOU Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2303f>

ABSTRACT

Diabetes is associated with increased risk of cardiovascular morbidity and mortality. Endothelial progenitor cells (EPCs) are bone marrow-derived cells involved in endothelial health, vasculogenesis and damage repair. Both subjects with type 1 and type 2 diabetes showed a lower number of EPCs and impaired EPC function, suggesting a potential pathogenic role of these cells in both micro and macrovascular complications, as well as in sexual dysfunctions in diabetes. Several glucose-lowering drugs have been reported to potentially improve EPCs levels and bioreactivity. However, larger and longer studies are needed to better explain the mechanisms involved.

KEYWORDS

Diabetes mellitus, endothelium, EPCs, glucose control, inflammation, diabetes complications.

INTRODUZIONE

Il diabete mellito è una patologia metabolica cronica ad eziologia multipla. Si caratterizza per uno stato di iperglicemia che può essere causata dall'assenza completa di insulina, nel caso del diabete di tipo 1, o da una resistenza alla sua azione, nel caso del diabete di tipo 2. Nell'ambito di una patologia così complessa, la tossicità derivante dalla cronica iperglicemia (glucotossicità) funge da trigger per molte altre alterazioni biochimiche, che contribuiscono a generare uno stato infiammatorio cronico e ad aumentare lo stress ossidativo nell'organismo. In particolare, gluco- e lipotossicità possono indurre alterazioni dell'omeostasi endoteliale dei piccoli e grandi vasi già dalle prime fasi della malattia nelle persone affette da diabete (1).

Le malattie cardiovascolari costituiscono la principale causa di morbidità e mortalità precoce nei soggetti con diabete (2-3). In particolare, i pazienti con diabete di tipo 2 presentano un rischio 2-4 volte maggiore di sviluppare malattie cardiovascolari nelle forme di malattia coronarica, insufficienza cardiaca cronica, fibrillazione atriale, ictus, e arteriopatia periferica rispetto alle persone senza diabete (4). Inoltre, il diabete è un importante fattore di rischio per lo sviluppo di malattia renale cronica, che costituisce a sua volta un fattore prognostico negativo per la funzione cardiaca (4). Le patologie cardiovascolari contribuiscono attualmente a circa un quarto di tutti i decessi nei soggetti con diabete di tipo 1 con una durata della malattia compresa tra 10 e 19 anni, mentre rappresentano più della metà di tutti i decessi

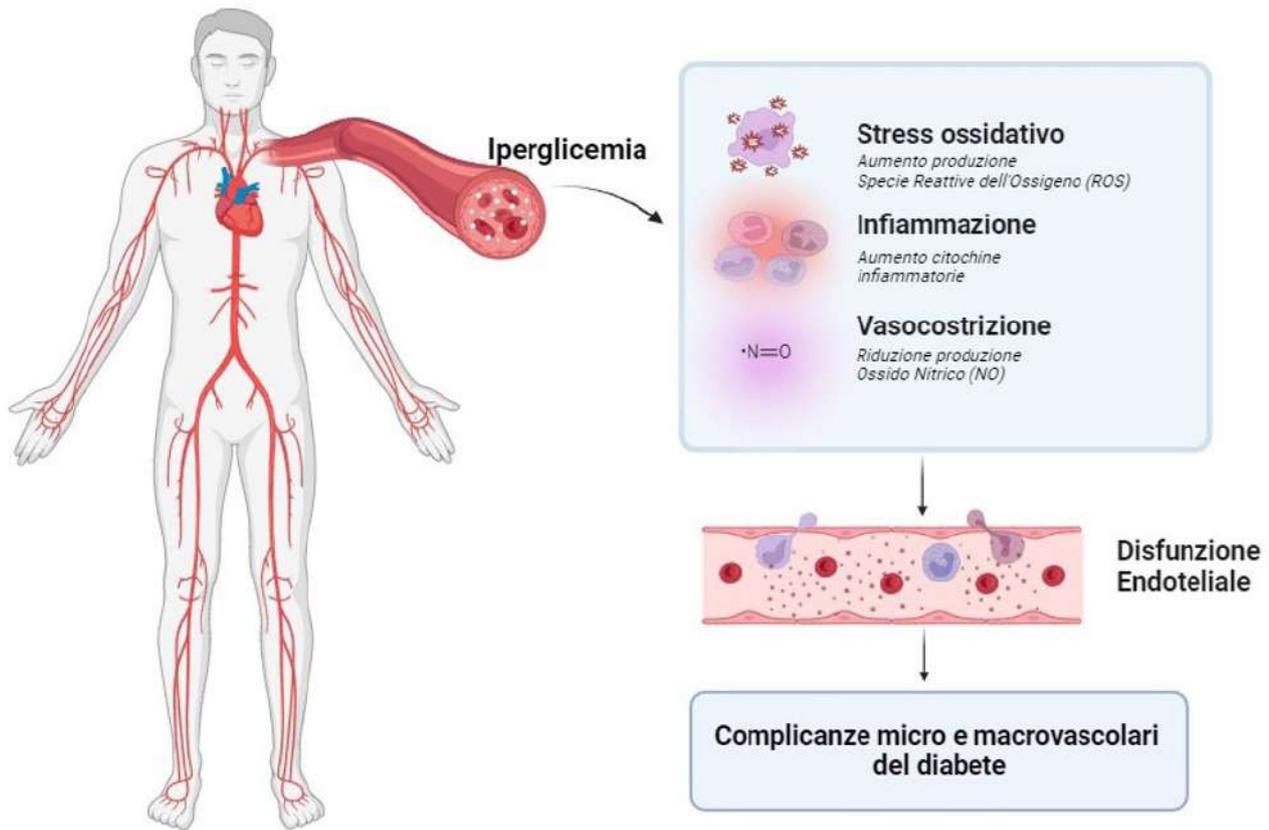
in quelli con una durata superiore a 20 anni (5-6). Inoltre, il rischio cardiovascolare nel diabete peggiora all'aumentare della prevalenza di fattori di rischio noti, quali ipertensione, dislipidemia, fumo, sovrappeso e obesità. L'insieme di più fattori di rischio contribuisce allo sviluppo di uno stato infiammatorio cronico subclinico che vede come principali mediatori il TNF- α , IL-1, IL-6, leptina, l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), la proteina C reattiva (PCR) e il fibrinogeno. Queste citochine infiammatorie innescano diversi pathways infiammatori con accumulo di lipidi a carico delle pareti vascolari e conseguente sviluppo di disfunzione endoteliale e malattie cardiovascolari (7-8). Numerosi studi hanno dimostrato che la disfunzione dell'endotelio vascolare gioca un ruolo centrale nella fisiopatologia delle malattie cardiovascolari nel diabete (9).

DISFUNZIONE ENDOTELIALE COME PRIMUM MOVENS DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE

La salute vascolare dipende da un equilibrio tra i meccanismi di danno e quelli di riparazione endoteliale. In seguito ad una lesione vascolare, la riparazione dell'endotelio danneggiato avviene ad opera delle cellule endoteliali residenti e alla proliferazione e migrazione di cellule progenitrici endoteliali (EPC) nel sito del danno (10-11). Le EPC sono cellule mononucleate derivanti dal midollo osseo. Esse svolgono l'importante ruolo di mantenere la fisiologica integrità vascolare, rimpiazzando cellule endoteliali danneggiate e svolgendo un ruolo protettivo nelle fasi più precoci del processo aterogenetico e di altre malattie cardiovascolari. La disfunzione endoteliale trova terreno fertile per svilupparsi all'interno di un milieu infiammatorio cronico (12). Le cellule endoteliali, attraverso la produzione di chemochine, citochine e di fattori di trascrizione intracellulari, partecipano al reclutamento, adesione e diapedesi dei leucociti all'interno della parete vascolare nei processi infiammatori (13). La produzione enzimatica di ossido nitrico (NO) da parte della NO sintetasi endoteliale (eNOS) costituisce un elemento critico nel regolare l'omeostasi endoteliale. L'aumento dello stress ossidativo può causare un'alterazione di eNOS e lo sviluppo di disfunzione endoteliale (14) (Fig. 1). La riduzione di NO, normalmente prodotto dalle cellule endoteliali, determina la progressione della lesione attraverso una più marcata proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce e un'aumentata attivazione piastrinica che conduce ad un maggiore rischio di trombosi (15). La disfunzione endoteliale può, pertanto, ridurre la perfusione vascolare, produrre fattori che riducono la stabilità di placca e aumentare la risposta trombotica in caso di rottura della stessa (16). Lo stato di iperglicemia cronica attiva una serie di meccanismi molecolari che hanno un importante impatto sulla funzione e sulla sopravvivenza delle cellule endoteliali. In particolare, l'attivazione della protein chinasi C (PKC) e l'aumento dello stress ossidativo possono compromettere la funzionalità delle cellule endoteliali. Sebbene queste ultime siano dotate di potenti sistemi antiossidanti, la produzione prolungata di ROS dovuta all'iperglicemia cronica può determinare il fallimento dei meccanismi protettivi e condurre a uno stato di intenso stress ossidativo, promuovendo l'apoptosi e determinando un'alterazione del turnover cellulare (17). La morte e la senescenza delle cellule endoteliali sono responsabili della compromissione strutturale del monostrato endoteliale, lasciando una superficie luminale altamente pro-aterogena (18).

Le alterazioni metaboliche associate al diabete possono influenzare la fisiopatologia delle EPC a diversi livelli, ivi compreso il numero di cellule progenitrici disponibili ed il grado di mobilità e differenziazione in cellule della linea endoteliale (19). Il rilascio di EPC dal midollo osseo in risposta a stimoli mobilizzanti dipende da complesse interazioni che avvengono nel microambiente midollare. L'ischemia tissutale è considerata lo stimolo più forte per la mobilizzazione delle EPC, attraverso l'attivazione di sistemi di rilevamento dell'ipossia, come il fattore inducibile dall'ipossia (HIF)-1 (20). L'HIF-1 attivo si lega a specifiche regioni del DNA e promuove la trascrizione di geni sensibili all'ossigeno che codificano per il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il fattore di derivazione stromale (SDF)-1, e l'eritropoietina (20). I fattori di crescita codificati consentono alle EPC di subire la migrazione transendoteliale e di passare nel sangue periferico dove vengono reclutate secondo gradienti ipossici attraverso l'espressione di SDF-1 indotta da HIF-1 (21). La mobilizzazione delle EPC dal midollo osseo dopo il danno ischemico risulta essere difettosa nei modelli murini con diabete rispetto ai controlli (22). Tale incapacità è stata associata a downregulation di HIF-1 α e al difettoso rilascio di fattori stimolanti il midollo, come VEGF e SDF-1, conducendo, infine, a un'angiogenesi compensatoria insufficiente

Figura 1 ◆ Meccanismi alla base della disfunzione endoteliale nel diabete

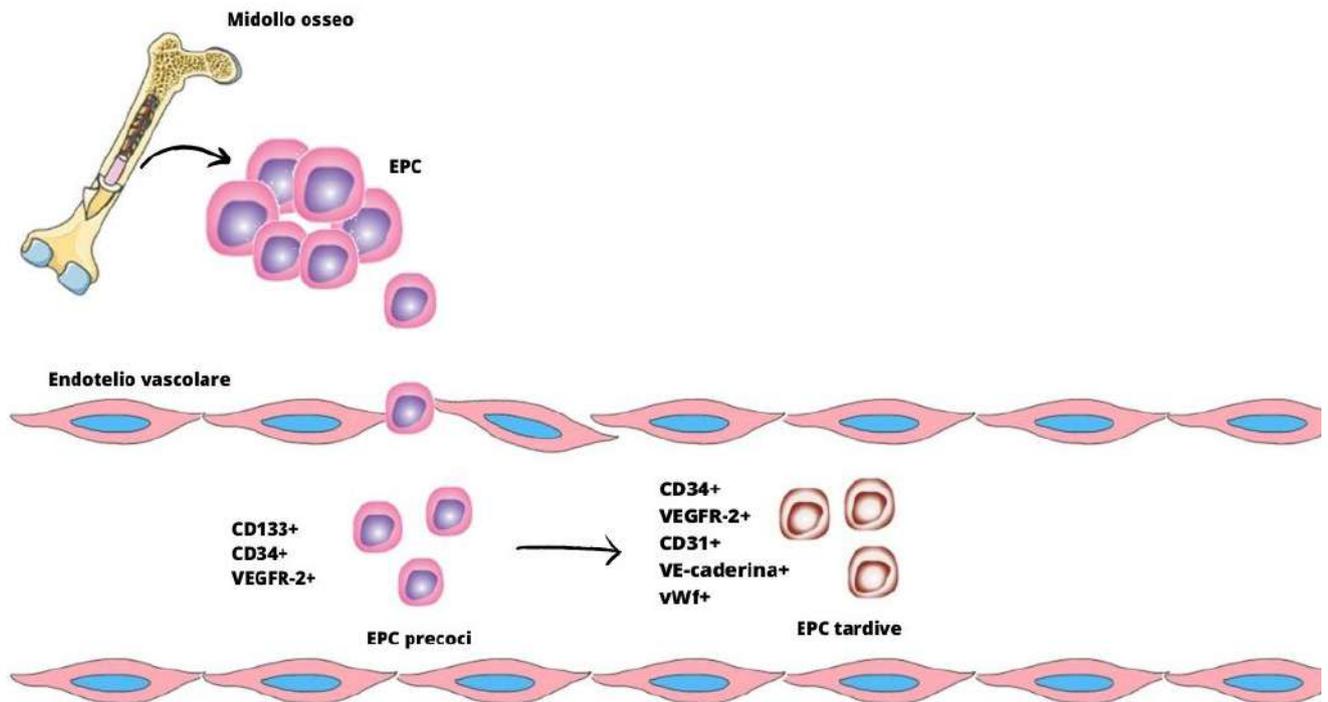


(21). Pertanto, un disequilibrio nei meccanismi di turnover endoteliale e una riduzione nella produzione e mobilitazione delle EPC potrebbero costituire i trigger che minano l'integrità dell'endotelio ed innescano l'aterogenicità del sistema vascolare a lungo termine (18). È stata osservata una correlazione tra i livelli circolanti di EPC e il grado di disfunzione endoteliale, al punto da definire la riduzione del numero di EPC come potenziale fattore predittivo di futuri eventi cardiovascolari (23).

EPC: IDENTIFICAZIONE, CLASSIFICAZIONE E RECLUTAMENTO

Le EPC sono state identificate per la prima volta nel 1997 da Asahara et al. come un sottogruppo di cellule mononucleate del sangue periferico con la capacità di differenziarsi in cellule endoteliali e di prendere parte ai processi di neoangiogenesi. Queste cellule sono caratterizzate da marcatori di linee ematopoietiche (CD34 e CD133) ed endoteliali (KDR, CD31 e vWf) (24-25). Esse derivano dal midollo osseo e possono essere mobilitate nella circolazione periferica in risposta a molti stimoli (26). Da un punto di vista funzionale le EPC condividono alcune proprietà tipiche sia delle cellule ematopoietiche che di quelle endoteliali. Una proprietà tipica delle cellule di origine ematopoietica è la loro capacità di dare origine ad unità formanti colonie (CFU), mentre la capacità di formare vasi capillari e produrre NO rientra nelle caratteristiche funzionali tipiche delle cellule endoteliali (27). Nel sangue periferico sono state identificate due sottopopolazioni di EPC: precoci e tardive (28). Le prime, quelle precoci, derivano dal midollo osseo e sono immediatamente immesse nel sistema circolatorio, si caratterizzano per i markers di superficie CD133/CD34/VEGFR-2, hanno una limitata capacità proliferativa e presentano un picco di crescita in terreni di coltura a 2-3 settimane. Le EPC tardive risultano invece positive ai markers CD34/VEGFR-2/CD31/VE-caderina e/o il fattore di von Willebrand (vWf); compaiono dopo 2-3 settimane di coltura e presentano una maggiore capacità proliferativa fino a 12 settimane (28) (Fig. 2).

Figura 2 ♦ Rilascio e migrazione delle cellule progenitrici endoteliali (EPC) in diversi stadi di maturazione a livello vascolare



Le EPC costituiscono le principali determinanti dei processi di omeostasi e riparazione endoteliale. La loro capacità di promuovere la rivascularizzazione di tessuti ischemici e danneggiati è stata esaminata sia in modelli animali che in cellule umane in coltura (29-30). Le EPC costituiscono un pool circolante di cellule in grado di formare un cerotto cellulare nei siti di lesione endoteliale, contribuendo così direttamente all'omeostasi e alla riparazione dell'endotelio vascolare. I livelli di EPC circolanti possono essere influenzati dall'età e dalla presenza di numerosi fattori di rischio cardiovascolari quali il fumo, la dislipidemia e il diabete. In particolare, è stato dimostrato che il numero e le proprietà funzionali delle EPC sono inversamente proporzionali ai fattori di rischio cardiovascolari (31).

Il rilascio di EPC dal midollo osseo è regolato da una varietà di fattori di crescita, enzimi, ligandi e recettori di superficie (32). La fase iniziale di attivazione delle EPC dipende dall'attività della metallo-proteinasi 9 (MMP-9) che favorisce la trasformazione del recettore di superficie (recettore di membrana Kit-mKitL) in recettore solubile (sKitL) (33). Topi con deficit di metallo proteinasi 9 (MMP9^{-/-}) o trattati con inibitori di tale citochina mostrano una ridotta mobilitazione di EPC circolanti (34). L'attivazione della forma solubile del recettore è seguita dal distacco delle cellule progenitrici primarie cKit⁺ dalle nicchie dello stroma del midollo osseo e dalla loro successiva migrazione verso la zona vascolare. Questa traslocazione attiva le cellule da uno stato quiescente ad uno stato proliferativo (35). Il VEGF, fattore di crescita endoteliale attivato anche da MMP-9, è considerato uno dei mediatori predominanti della mobilitazione delle EPC dal midollo osseo in seguito al danno tissutale (36-37). Molti altri fattori sono implicati nel processo di reclutamento, tutti attualmente utilizzati come agenti mobilizzanti di cellule staminali capaci di migliorarne anche la funzionalità; i più importanti sono costituiti dallo SDF-1 (ritenuto anche come il fattore che protegge le EPC dall'apoptosi), il fattore di crescita fibroblastico (FGF), il fattore di crescita placentare (PFC), l'eritropoietina e l'eNOS (38). L'assenza di quest'ultima nei modelli murini produce un deficit funzionale e numerico di cellule staminali endoteliali (34). Il rilascio in circolo di questi fattori, soprattutto il VEGF, può essere indotto da svariati stimoli, tra i quali il più potente è, come abbiamo visto, costituito dall'ischemia tissutale. I processi coinvolti nel reclutamento delle EPC sembrano essere simili a quelli del reclutamento di cellule staminali ematopoietiche (39). Le EPC stimulate verso la circolazione periferica si stabili-

scono, infatti, specificamente nei siti ischemici per stimolare processi di angiogenesi compensatoria. Una volta che le EPC sono state mobilitate dal midollo osseo alla circolazione periferica, iniziano a migrare verso l'area lesa attraverso un preciso processo di reclutamento definito "homing" (40). La direzione di questa migrazione è determinata secondo un gradiente di fattori angiogenici, come il VEGF-A, rilasciato dal tessuto ischemico. Le cellule arrivate in sede di danno possono partecipare alla rigenerazione vascolare e alla neovascolarizzazione (41). Entrambe le forme di EPC, precoci e tardive, contribuiscono ai processi di neovascolarizzazione in modi diversi. Le EPC precoci sembrano avere effetti paracrini attraverso il rilascio di citochine angiogeniche e proinfiammatorie (tra cui VEGF, HGF, fattore stimolante le colonie di granulociti macrofagi, MMP-9) (42) promuovendo l'angiogenesi, la sopravvivenza e la proliferazione di un numero maggiore di EPC dal midollo osseo al sito di danno endoteliale. D'altra parte, le EPC tardive producono una serie di segnali paracrini (ad es. MCP-1, IL-8 e MMP-2) (43) che favoriscono l'angiogenesi, e sembrano differenziarsi più velocemente in cellule endoteliali mature per essere successivamente incorporate nell'endotelio danneggiato (44). Dal momento che le EPC vengono reclutate soprattutto in risposta al danno vascolare, i livelli circolanti di queste cellule nel sangue periferico potrebbero essere utilizzati come biomarcatore di rischio cardiovascolare.

LO STUDIO DELLE EPC

Per lo studio delle EPC vengono principalmente utilizzate due metodiche: la citofluorimetria e le colture cellulari. La citofluorimetria permette la misurazione multiparametrica di caratteristiche fisiche e/o chimiche di cellule in sospensione all'interno di un fluido di trasporto (45). La quantizzazione delle EPC mediante citofluorimetria si basa sull'uso di specifici anticorpi diretti contro antigeni di superficie, quali i marcatori di staminalità (es. CD34, CD133, CD117) e i marcatori endoteliali (es. KDR, CD31, VECAM) (46). Tuttavia, ad oggi, non esiste ancora una combinazione antigenica riconosciuta a livello internazionale in grado di definire i singoli fenotipi di EPC.

Lo studio delle EPC può avvenire anche mediante coltura cellulare in vitro. Le cellule mononucleate da sangue periferico, ottenute in seguito a centrifugazione mediante gradiente di densità con Ficoll-Paque, vengono lavate con PBS, seminate su piastre precedentemente coartate con fibronectina e coltivate in mezzo di crescita (FBS, VEGF e altri fattori di crescita). Tra i vari protocolli proposti, due sono i più importanti. Il primo consiste nel re-impiantare, dopo 48 ore, le cellule non adese in un terreno di fibronectina per 3 giorni. Questa procedura viene chiamata CFU-assay in riferimento alla capacità delle cellule di formare colonie CFU-EC (colony forming units-endothelial cells). L'altra procedura è più lunga, ha una durata di 14-28 giorni e consiste nel monitorare lo sviluppo e la morfologia delle cellule endoteliali cambiando il terreno ogni 2-3 giorni. Si può dedurre che la citofluorimetria venga utilizzata per quantificare il numero di cellule, la coltura cellulare per studiarne le caratteristiche funzionali (45). Ad ogni modo, la citofluorimetria risulta essere la tecnica maggiormente usata per la quantizzazione delle EPC nei trial clinici, anche se il fenotipo antigenico delle EPC circolanti è ancora molto dibattuto.

EPCS E COMPLICANZE MACROVASCOLARI DEL DIABETE

Il diabete mellito è associato ad un aumentato rischio di disfunzione endoteliale e di malattie cardiovascolari (47). L'integrità dell'apparato vascolare è definita dall'equilibrio tra danno vascolare (conseguente alla disfunzione endoteliale) e riparazione endoteliale. Il diabete si associa ad una compromissione dei processi di riparazione del danno endoteliale e dei meccanismi di angiogenesi post-ischemica compensatoria. Esiste una forte correlazione tra i livelli circolanti di EPC, valutati mediante citofluorimetria, e lo spessore carotideo medio-intimale (CIMT), l'estensione del circolo collaterale coronarico e la funzione endoteliale, suggerendo l'importanza di queste cellule come potenziali biomarcatori di rischio cardiovascolare indipendente (48-49).

A conferma del ruolo protettivo indiretto delle EPC sul sistema cardiovascolare, una riduzione del loro numero è stata associata ad un aumento di incidenza di eventi cardiovascolari in diverse popolazioni, inclusi pazienti con diabete e sindrome metabolica (49-50). Uno studio condotto da Vasa et al., ha dimostrato che il numero e la funzione delle EPC

circolanti in pazienti con precedente malattia coronarica risultavano inversamente associate con i fattori di rischio cardiovascolare (51). Molti studi hanno mostrato che le EPC sono ridotte in numero e appaiono disfunzionali in pazienti con diabete di tipo 1 e 2. In particolare, sono stati osservati livelli circolanti di EPC del 30-50% più bassi negli individui con il diabete, rispetto a soggetti sani di pari età (52). La deplezione di EPC nel diabete sembra persistere per lungo tempo, ed è peggiore nei pazienti con complicanze avanzate del diabete. In uno studio su 51 pazienti con diabete di tipo 2 e 17 controlli sani, i livelli di CD34⁺KDR⁺ risultavano correlare negativamente con la gravità dell'arteriopatia periferica (PAD) (53). Inoltre, i pazienti con diabete e PAD mostravano ulteriore compromissione della funzione delle EPC rispetto ai pazienti senza PAD. Oltre ad una riduzione dei livelli circolanti, il diabete è associato anche ad una disfunzione delle EPC. Infatti, uno studio cross-sectional su 74 giovani con diabete di tipo 1 senza complicanze ha messo in evidenza anomalie della funzione endoteliale, un aumento dello spessore medio intimale e una riduzione della conta di EPC associati ad alti livelli di marcatori infiammatori e protrombotici (hsCRP, IL-6 e PAI-1), quando confrontati ai controlli sani (54). Inoltre, i livelli circolanti delle EPC CD34⁺KDR⁺ risultano già ridotti in giovani soggetti con diabete di tipo 1, quando confrontati ai controlli sani, soprattutto in quelli con controllo glicemico subottimale, una lunga durata di malattia e la presenza di segni iniziali di macroangiopatia (55). Questo conferma come anomalie dei meccanismi di riparazione endoteliale siano già comuni in giovani adulti con diabete di tipo 1 prima dello sviluppo di un danno vascolare clinicamente manifesto. Infine, suggerisce la possibilità di utilizzare la riduzione dei livelli circolanti di EPC come un potenziale nuovo approccio per identificare le persone con diabete a rischio di malattie cardiovascolari fin dalla giovane età.

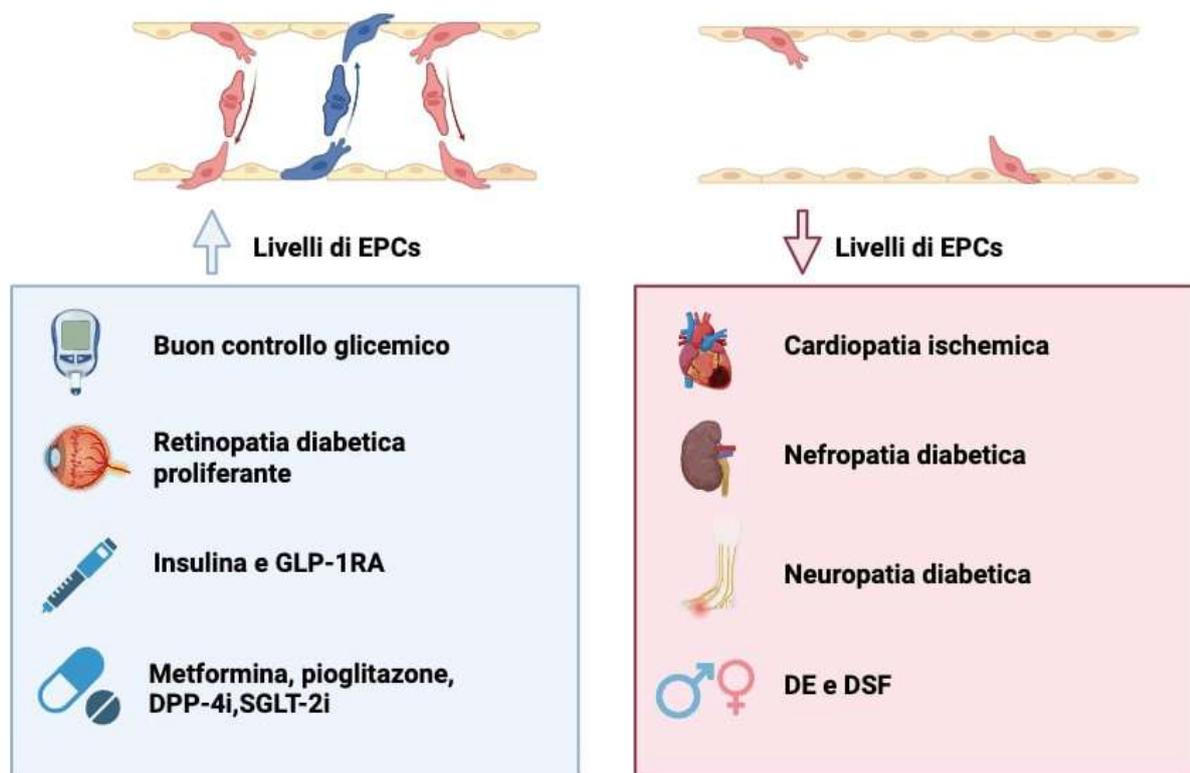
EPCS E COMPLICANZE MICROVASCOLARI DEL DIABETE

Le complicanze microvascolari del diabete comprendono la retinopatia, la nefropatia e la neuropatia diabetica. Esse si sviluppano come conseguenza di danni strutturali e funzionali alla microcircolazione degli organi bersaglio. Le caratteristiche morfologiche tipiche includono ispessimento della membrana basale dei piccoli vasi, perdita di copertura pericitica, rarefazione capillare, eccesso di deposizione dei componenti della matrice extracellulare (ECM) con conseguente ridotta perfusione, alterazioni atrofiche e fibrosi (56). Tali complicanze possono interferire in modo significativo con la qualità di vita dei pazienti e contribuire alla maggiore morbilità e alla mortalità dei pazienti con diabete. Il diabete di tipo 2, infatti, è la principale causa di cecità e di amputazione non traumatica nel mondo. Anche se la patogenesi delle anomalie vascolari dipende largamente da un danno intracellulare innescato dall'iperglicemia e dallo stress ossidativo, la compromissione dei processi di riparazione endoteliale nel diabete, soprattutto attraverso la diminuzione dei pool e della migrazione di cellule rigenerative vascolari di derivazione midollare, potrebbe giocare un ruolo importante nello sviluppo delle microangiopatie diabetiche (2). In uno studio osservazionale prospettico su una coorte di 187 pazienti affetti da diabete di tipo 2 seguiti per circa 4 anni, i soggetti con retinopatia o neuropatia, così come quelli con aterosclerosi asintomatica, mostravano livelli più bassi di EPC CD34⁺ (precursori indifferenziati delle EPC) e di CD133⁺KDR⁺ rispetto a quelli senza complicanze (57). Inoltre, indipendentemente da fattori confondenti quali l'età, il sesso, il livello di HbA_{1c} e la durata del diabete, bassi livelli delle cellule CD34⁺ risultavano fattori predittivi indipendenti di esordio o della progressione della nefropatia, della retinopatia e della microangiopatia diabetica (57). Anche nel diabete di tipo 1 di lunga durata, i livelli circolanti di EPC sembrano correlare con il grado di complicanze, come mostrato nello studio sui pazienti con diabete di tipo 1 da almeno 50 anni, definiti come medalists del Joslin Diabetes Center (58). I medalists del Joslin Diabetes Center senza complicanze legate al diabete presentano infatti livelli normali di EPC circolanti, suggerendo quindi un importante ruolo dei livelli di EPC nello sviluppo delle complicanze microvascolari del diabete.

EPC e retinopatia diabetica

L'iperglicemia altera la microcircolazione retinica provocando un aumento della permeabilità capillare, fuoriuscita di proteine dai vasi e una progressiva riduzione del flusso sanguigno nella retina. L'ischemia retinica e il rilascio di

Figura 3 ◆ Condizioni associate ad una riduzione o ad un aumento dei livelli circolanti di EPC nel diabete



Abbreviazioni: DE, disfunzione erettile; DPP-4i, inibitori della dipeptidil-peptidasi 4; DSF, disfunzione sessuale femminile; GLP-1RA, analoghi recettoriali del glucagon-like peptide 1; SGLT-2i, inibitori del cotrasportatore di sodio-glucosio 2.

fattori angiogenici stimolano la formazione di nuovi vasi sanguigni e microaneurismi, con sviluppo e progressione della retinopatia diabetica (59). In condizioni di ipossia, le cellule retiniche rilasciano fattori neurotrofici che possono stimolare la mobilizzazione delle EPC e potenziano le loro caratteristiche angiogeniche (60). In uno studio osservazionale prospettico su pazienti con diabete di tipo 2 e PAD, la presenza di retinopatia avanzata o proliferativa era associata ad un maggior numero di cellule KDR⁺ e ad un più alto potenziale clonogenico delle EPC in vitro (61). Allo stesso modo, Asnaghi et al. hanno messo in evidenza che le EPC di pazienti con diabete di tipo 1 con retinopatia proliferativa presentavano un maggiore potenziale clonogenico (62). Da queste premesse sembra che il ruolo delle EPCs sia diversificato nelle varie fasi della retinopatia diabetica, differendo notevolmente dalle altre complicanze del diabete. L'eccesso di EPC potrebbe contribuire ai processi di angiogenesi retinica patologica, come già mostrato in modelli sperimentali (Fig. 3). Questa diversa risposta delle EPC, che si osserva in corso di retinopatia diabetica proliferante e che differisce dalle altre complicanze, è denominata "paradosso diabetico". Questo "paradosso" potrebbe complicare ulteriormente il possibile utilizzo delle EPC quali marcatori di rischio cardiovascolare nel diabete (61). Sono necessari studi più ampi e di più lunga durata per meglio definire il ruolo delle EPC nella retinopatia avanzata.

EPC e nefropatia diabetica

Il diabete è una delle principali cause di insufficienza renale, che a sua volta costituisce un fattore prognostico sfavorevole per eventi cardiovascolari (63). Pazienti con insufficienza renale cronica presentano una riduzione dei livelli circolanti di EPC (64), sebbene non siano stati condotti studi specifici in pazienti con malattia renale cronica diabetica. Se da un lato non sono state evidenziate alterazioni nelle colture cellulari delle EPC di pazienti con diabete di tipo 1 con nefropatia rispetto a quelli senza (65), Dessapt et al. hanno trovato livelli più bassi di CD34⁺ e CD34⁺CD133⁺ in pazienti

con microalbuminuria rispetto a quelli senza (66). Infine, il trapianto di rene sembra in grado di ripristinare il pool di EPC endogene, dotate di maggiori proprietà angiogeniche (67). Infatti, le cellule renali sono disposte a produrre l'eritropoietina (EPO) e la dimetil arginina asimmetrica (ADMA) che possono influenzare i livelli di EPCs. Nei pazienti con malattia renale cronica, in particolare, l'ADMA si accumula e inibisce eNOS, riducendo così la biodisponibilità di NO e di conseguenza la mobilizzazione e la funzione delle EPC (68). Inoltre, nei pazienti con danno renale cronico, vi è una ridotta biodisponibilità di EPO che a sua volta riduce il numero e la funzione delle EPC (68). Inoltre, il fenotipo CD34⁺ è risultato predittivo di progressione di albuminuria nel diabete di tipo 2 (69). Tali cellule potrebbero avere un ruolo nel rallentare la progressione della nefropatia diabetica e il loro livello può rappresentare un marker prognostico per la progressione di questa complicanza (69). La relazione tra sviluppo di nefropatia diabetica ed alterazioni nel numero di EPC necessita di ulteriori studi nel futuro.

EPC e neuropatia diabetica

Nella neuropatia diabetica, l'iperglicemia impatta negativamente sulle cellule neurali causando una microangiopatia dei vasa nervorum. Le EPC sembrano svolgere un ruolo importante nell'omeostasi del microcircolo nei neuroni e nei nervi e il loro esaurimento o la loro disfunzione potrebbe accelerare la progressione della neuropatia diabetica. Non sono noti, al momento, studi clinici che hanno valutato la relazione tra EPC e neuropatia diabetica. Naruse et al. hanno dimostrato come l'iniezione intramuscolare di EPC derivate dal sangue del cordone ombelicale umano migliorava il supporto vascolare nervoso, ripristinando la velocità di conduzione del nervo sciatico e il flusso sanguigno in modelli murini con diabete di tipo 1 (70). Nella sindrome del piede diabetico, che è una complicanza tardiva del diabete, si osserva una riduzione della sintesi locale di VEGF e disfunzione endoteliale (71). Questi cambiamenti possono contribuire ad una risposta angiogenica anomala. L'angiogenesi compromessa porta all'ischemia tissutale. Una conseguenza dell'ischemia di lunga durata è lo sviluppo di ferite che non guariscono e nei casi più gravi necrosi, per i quali l'unica terapia efficace è l'amputazione (71). Questa è un'area di notevole interesse, tenuto conto che un approccio terapeutico con EPC potrebbe rappresentare un potenziale trattamento per la neuropatia diabetica (70, 72), che attualmente è una condizione molto disabilitante a lungo termine.

EPC E SESSUALITÀ

EPC e disfunzioni sessuali femminili

Secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) il benessere sessuale è uno stato di benessere fisico, emotivo, mentale e sociale in relazione alla vita sessuale (73). La sessualità nelle persone con diabete può essere interessata da problematiche o vere e proprie disfunzioni che ricadono sulla salute e sul benessere psichico del singolo individuo e della coppia. Le disfunzioni sessuali femminili (DSF) costituiscono un gruppo eterogeneo di disordini, caratterizzati da un disturbo clinicamente significativo che può verificarsi in una o più fasi della risposta sessuale nella donna. Il diabete, soprattutto quando non ben compensato ed associato ad altri fattori di rischio, sembra impattare negativamente sulla funzione sessuale femminile, influenzando significativamente la qualità della vita delle donne affette (74). Diverse evidenze scientifiche riportano una più alta prevalenza di DSF nelle donne con diabete rispetto alle donne sane. Di recente è stata messa in evidenza una riduzione dei livelli circolanti di EPC associata ad una peggiore funzione sessuale durante le tre fasi del ciclo mestruale in un gruppo di giovani donne con diabete di tipo 1, quando confrontate a donne di pari età sane (75). In particolare, livelli significativamente più bassi di cellule CD34⁺ e CD34⁺CD133⁺ nella fase ovulatoria e di cellule CD34⁺KDR⁺ nella fase ovulatoria e nella fase luteinica sono state osservate nelle donne diabetiche rispetto al gruppo di controllo, suggerendo che la mobilizzazione ciclica delle EPC durante il ciclo mestruale che normalmente si osserva nelle donne sane è invece depressa nelle donne con diabete, anche nel contesto di una normale variazione ciclica degli ormoni ipofisari e ovarici circolanti. Infine, il numero di EPC risultava predittivo del punteggio finale del Female Sexual Function Index (FSFI), suggerendo per la prima volta una possibile relazione tra angiogenesi e funzione sessuale nelle giovani donne in età fertile. Resta da

chiarire se queste disfunzioni possano essere correlate all'aumento del rischio cardiovascolare delle giovani donne con diabete di tipo 1 (75).

EPC e disfunzione erettile

La disfunzione erettile (DE) rappresenta la forma più frequente di disfunzione sessuale maschile ed è definita come la persistente incapacità di raggiungere o mantenere l'erezione del pene per un rapporto sessuale di successo (76). In questo contesto i livelli circolanti di EPC potrebbero essere coinvolti nei meccanismi che associano il diabete alla DE, in quanto la loro diminuzione nel sangue periferico può rappresentare un segno precoce di disfunzione endoteliale (77). Soggetti con diabete di tipo 2 e DE presentano, infatti, una ridotta riserva di EPC ed un'alterazione della loro funzione endoteliale (78). Anche nell'ambito del diabete di tipo 1 sono stati osservati ridotti livelli di EPC in soggetti con DE rispetto a controlli sani di pari sesso ed età. In particolare, uno studio cross-sectional su 118 pazienti con diabete di tipo 1 ha messo in evidenza una conta significativamente inferiore di cellule CD34⁺KDR⁺CD133⁺ nei pazienti con DE rispetto a pazienti diabetici di pari età senza DE (79). Inoltre, i livelli circolanti di EPC CD34⁺KDR⁺ e di quelle CD34⁺KDR⁺CD133⁺ mostravano una correlazione positiva con i livelli di testosterone e lo score totale dell'IIEF-5, suggerendo che i livelli circolanti di queste cellule possono avere un ruolo importante nella funzione sessuale maschile nel diabete di tipo 1 ed un loro basso livello possa essere espressione di lesione endoteliale precoce. Inoltre, sia gli studi clinici che quelli pre-clinici suggeriscono che gli androgeni regolano la funzione endoteliale e svolgono un ruolo importante nello sviluppo e maturazione delle EPC (80). La correlazione positiva tra i livelli di testosterone e le EPC dimostrata in questo studio può fornire un'ulteriore prova del coinvolgimento degli androgeni nel mantenimento della funzione endoteliale e nel meccanismo di riparazione vascolare, ma sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere i meccanismi con cui il testosterone regola l'omeostasi vascolare.

CONTROLLO GLICEMICO E TERAPIA DEL DIABETE

È ormai noto che per prevenire le complicanze micro e macrovascolari, un controllo glicemico ottimale è assolutamente necessario e auspicabile nei pazienti con diabete (81). L'iperglicemia è un importante fattore di rischio per disfunzione endoteliale e per lo sviluppo di aterosclerosi (82). Tuttavia, i primi segni di disfunzione endoteliale possono iniziare già nelle prime fasi della patologia, in pazienti con normale glicemia a digiuno ma ridotta tolleranza ai carboidrati. Infatti, la riduzione dei livelli circolanti di CD34⁺ (il fenotipo più "precoce" di EPC) e di CD34⁺KDR⁺ è stata dimostrata già in fase precoce nella storia naturale del diabete in soggetti con ridotta tolleranza ai carboidrati sottoposti ad un carico orale con 75 g di glucosio (OGTT) (83). Inoltre, l'esposizione prolungata e ripetuta ad alti livelli di glicemia dopo 1 ora dal pasto costituisce un fattore di rischio per la progressione di placche ateromasiche e malattia cardiovascolare (84). Lo stato di infiammazione e di scarso compenso glicemico indotto dall'iperglicemia, soprattutto se per lungo tempo, possono influenzare negativamente la salute dell'endotelio, determinando così un aumento del rischio di malattia cardiovascolare (22).

In particolare, una correlazione inversa tra i valori di glicemia o HbA_{1c} e i livelli di EPC è stata osservata nei pazienti con diabete (85). Allo stesso tempo, diversi studi, in prevalenza osservazionali, hanno mostrato che un miglioramento del controllo glicemico era associato ad un incremento dei progenitori cellulari. Il miglioramento dei valori glicemici può addirittura riportare i livelli di EPC verso i valori normali, purché venga effettuato in maniera costante per almeno 6 mesi (86). In particolare, il miglioramento del controllo glicemico in vivo risultava associato ad un aumento dei livelli di EPC e ad un miglioramento della loro funzionalità, con una forte correlazione tra diminuzione di HbA_{1c} e miglioramento della capacità funzionale (87). Questi risultati sono stati confermati in uno studio osservazionale longitudinale su 190 bambini con diabete di tipo 1 e 34 controlli sani, in cui la riduzione dei livelli di HbA_{1c} correleva con l'aumento delle EPC (55). Tuttavia, al fine di prevenire il danno vascolare, è importante non solo ridurre i livelli di HbA_{1c}, ma anche prevenire e migliorare la variabilità glicemica che è espressione dell'andamento delle medie della glicemia, in termini di frequenza ed ampiezza delle relative oscillazioni. In uno studio osservazionale prospettico di

6 mesi condotto su 106 pazienti con diabete di tipo 1, l'uso della terapia insulinica intensiva mediante microinfusore, risultava associata ad una riduzione dei principali indici di variabilità glicemica e ad un aumento dei livelli di EPC, rispetto alla terapia insulinica multi-iniettiva (88). Il miglioramento dei principali indici di variabilità glicemica, testimoniato da una riduzione del MAGE e della deviazione standard, e l'aumento dei livelli circolanti di cellule EPC è stato ulteriormente confermato nel follow-up di 2 anni nella stessa casistica di pazienti (89). L'ottimizzazione della gestione clinica del controllo glicemico e dei principali indici di variabilità glicemica nei pazienti con diabete costituisce il primo passo per salvaguardare la salute endoteliale e migliorare il numero e il potenziale angiogenico delle EPC (90).

Metformina e EPC

Secondo le linee guida nazionali ed internazionali, la metformina costituisce il farmaco di prima scelta per il trattamento del diabete di tipo 2. Il suo uso è stato associato ad un miglioramento del controllo glicemico e dei livelli circolanti di progenitori endoteliali. In uno studio su 47 pazienti con diabete di tipo 2, l'uso di metformina e glicazide era associato ad un miglioramento nel numero e nella funzione delle EPC circolanti CD45⁺CD34⁺VEGFR2⁺ (91). Tale reperto è stato ulteriormente confermato anche in soggetti con diabete di nuova diagnosi, in cui l'uso della metformina per 16 settimane induceva un notevole aumento dello stesso fenotipo di EPC (92). Infine, un trattamento volto a correggere più fattori di rischio cardiovascolare comprendente metformina, statine, aspirina e bloccanti del recettore dell'angiotensina per 90 giorni si è dimostrato efficace nel determinare un aumento del numero di EPC rispetto ai soggetti non sottoposti a terapia (93). Diversi meccanismi potrebbero essere alla base delle proprietà positive della metformina sul numero e la funzionalità delle EPC: in primis l'aumento della produzione e della biodisponibilità di NO. I pazienti con diabete hanno una ridotta espressione di eNOS e un ridotto rilascio di NO (94). Aumentare la biodisponibilità di NO può migliorare la sopravvivenza e la funzione delle EPC (94). In uno studio di Chakraborty et al., il trattamento con metformina in una casistica di pazienti affetti da diabete di tipo 2 mostrava un aumento del livello di NO (95). Inoltre, la metformina sembra ridurre lo stress ossidativo. Quest'ultimo gioca un ruolo importante nella regolazione della sopravvivenza delle EPC. Le EPC di soggetti sani mostrano, infatti, una maggiore espressione degli enzimi antiossidanti intracellulari quali catalasi, glutatione perossidasi e superossido dismutasi rispetto alle EPC di pazienti con diabete (96). Questo suggerisce che le EPC nei pazienti diabetici siano più suscettibili allo stress ossidativo (96). È stato dimostrato che la metformina riduce i marcatori dello stress ossidativo nei pazienti con diabete di tipo 2 (97).

Sulfaniluree ed EPC

Le sulfaniluree sono agenti ipoglicemizzanti molto efficaci, ampiamente utilizzati nel passato per i pazienti con diabete di tipo 2, tuttavia, sono associate ad aumentato rischio di ipoglicemie. Pochi studi hanno valutato l'effetto del trattamento con sulfaniluree sulle EPC circolanti. Uno studio condotto su 33 soggetti con diabete di tipo 2 di nuova diagnosi, in seguito a trattamento con gliclazide per 12 settimane ha rilevato un significativo aumento del numero di EPC circolanti (CD45⁺CD34⁺VEGFR2⁺). Non è chiaro se questo sia un effetto diretto del farmaco o solo una conseguenza del miglioramento del controllo glicemico (98).

Pioglitazone ed EPC

Il trattamento con l'agonista recettoriale PPAR- γ pioglitazone, appartenente alla classe dei tiazolidinedioni, può modulare l'espressione di diversi geni, coinvolti nei processi di gluco- e lipotossicità (99). In un modello murino di diabete di tipo 2, il trattamento con pioglitazone sembra aumentare le EPC circolanti, diminuire l'apoptosi delle EPC in vitro e aumentare la neoangiogenesi (100). Negli studi clinici l'uso del pioglitazone risulta più efficace della metformina nell'aumentare i livelli di EPC, in particolare il fenotipo CD34⁺VEGFR2⁺, e la loro migrazione dopo due mesi di trattamento, un effetto questo probabilmente indipendente dal controllo glicemico (101). Inoltre, in uno studio condotto su 14 soggetti con ridotta tolleranza al glucosio il pioglitazone ha mostrato di migliorare la vitalità delle EPC in vitro (102). L'effetto benefico del pioglitazone sulle EPC può dipendere in parte dall'aumentata produzione di NO (103). Inoltre, l'attivazione di PPAR- γ induce la riprogrammazione dei macrofagi verso il fenotipo anti-infiammatorio, favorendo

così la mobilitazione di cellule staminali ed EPC nel torrente circolatorio (104-105). È stato inoltre dimostrato che il trattamento con pioglitazone aumenta l'adiponectina che ha effetti antinfiammatori (106), aumenta l'attività delle telomerasi, le proteine stabilizzanti i telomeri e riduce l'espressione dei markers di senescenza delle EPC (107).

Incretine ed EPC

La classe delle incretine è ampiamente utilizzata per il trattamento del diabete di tipo 2. Essa comprende gli analoghi recettoriali del GLP-1 (GLP-1RA) e gli inibitori della dipeptidil-peptidasi-4 (DPP-4i). Un esiguo numero di studi ha dimostrato l'abilità di alcuni DPP-4i di aumentare i livelli di progenitori cellulare in soggetti con diabete. In particolare, sitagliptin e vildagliptin sono risultati più efficaci di glimepiride e glibenclamide, rispettivamente, nel migliorare i livelli delle EPC, aumentando l'espressione della CXCL12, chemochina utile nei meccanismi di reclutamento delle EPC (108-109). Inoltre, la combinazione terapeutica di saxagliptin e metformina è risultata associata ad un aumento funzionale delle EPC circolanti CD34⁺ ed un miglioramento dei parametri metabolici, della funzione renale, della rigidità arteriosa e della pressione arteriosa sistolica in una casistica di 21 pazienti con diabete di tipo 2 (110). Per quanto riguarda gli effetti dei GLP-1RA sulla salute endoteliale, i dati sono ancora limitati, ma molto promettenti. In esperimenti in vitro, il trattamento con GLP-1 sembra migliorare la capacità di proliferazione e differenziazione dei fenotipi di EPC CD34⁺CD133⁺, CD133⁺VEGFR2⁺ e CD34⁺VEGFR2⁺ (111). Inoltre, la somministrazione del GLP-1 sembra ridurre la senescenza delle cellule endoteliali indotta da specie reattive dell'ossigeno (112). Negli uomini, la terapia con dulaglutide per 12 settimane apportava un miglioramento nel numero e nella funzione delle EPC CD34⁺CD133⁺VEGFR2⁺ rispetto alla sola metformina, in un trial condotto su 60 pazienti con diabete di tipo 2 (113). Gli effetti benefici dei GLP-1RA sulle EPC rispetto alla metformina, è confermato anche da un recente studio cross-sectional condotto su 154 soggetti con diabete di tipo 2 in cui gli individui trattati con liraglutide o dulaglutide da almeno 12 mesi mostravano un maggiore numero dei fenotipi di EPC CD34⁺CD133⁺, CD133⁺KDR⁺, e CD34⁺CD133⁺KDR⁺ rispetto a quelli trattati con metformina (114). Inoltre, il numero delle cellule CD34⁺CD133⁺KDR⁺ risultava fattore predittivo indipendente di score più alti ai test cognitivi (114). Diversi meccanismi possono essere coinvolti negli effetti benefici dei GLP-1RA e DPP-4i sul numero e la funzione delle EPC. Il GLP-1 sembra stimolare la produzione di NO, ridurre i pathway infiammatori e migliorare lo stress ossidativo (115). La somministrazione di GLP-1RA durante un pasto in soggetti con diabete di tipo 2 ha ridotto i principali marcatori di stress ossidativo (116). Tali proprietà antinfiammatorie e antiossidanti degli agonisti del GLP-1 e degli inibitori della DPP-4 possono contribuire ad aumentare la sopravvivenza e la funzione delle EPC.

SGLT-2i ed EPC

Gli inibitori del cotrasportatore sodio glucosio (SGLT-2i) sono farmaci innovativi per il miglioramento del controllo glicemico, promuovendo l'escrezione urinaria di glucosio. SGLT-2 è espresso soprattutto a livello renale. Le evidenze sugli effetti degli SGLT-2i sulle EPC sono ancora molto limitate. Il trattamento con SGLT-2 per almeno 6 mesi comporta un miglioramento del controllo glicemico ed un aumento dei livelli di EPC, potenziando l'espressione di aldeide deidrogenasi, enzima dotato di proprietà benefica sui vasi (117). Ad ogni modo le evidenze sono ancora esigue e i meccanismi ancora poco conosciuti (118).

Insulina ed EPC

L'insulina costituisce il farmaco di scelta nel diabete di tipo 1 e una delle strategie terapeutiche nel diabete di tipo 2. Gli effetti dell'insulina sulle EPC derivano soprattutto da studi preclinici e alcuni studi clinici, e sono alquanto contrastanti. Il trattamento con insulina in modelli animali con diabete di tipo 1 era associato ad un miglioramento della mobilitazione e della funzione delle EPC (119). Tuttavia, la somministrazione di insulina in modelli murini non mostrava alcun effetto sulla produzione e mobilitazione di EPC dal midollo osseo (120). Studi in vitro hanno riportato che le EPC CD34⁺VEGFR2⁺, isolate da sangue periferico di soggetti con diabete di tipo 2, trattate per 6 giorni con insulina mostravano un aumento della mobilitazione, della produzione di NO e della capacità di formare colonie (121-122).

Inoltre, la terapia con insulina glargine o insulina NPH per 4 mesi aumentava significativamente la differenziazione *ex vivo* delle EPC nei pazienti con diabete di tipo 2, rispetto al trattamento ipoglicemizzante orale (123). L'insulina potrebbe avere effetti benefici sulle EPC, stimolando la produzione di NO, migliorando i markers di stress ossidativo e il controllo glicemico dei pazienti con diabete (124).

CONCLUSIONI

Il diabete è una patologia metabolica cronica associata ad un aumentato rischio cardiovascolare. Lo stato di cronica (o persistente) iperglicemia induce l'espressione di molte chemochine e interleuchine infiammatorie, aumenta la produzione di specie reattive dell'ossigeno, riduce la disponibilità di NO, risultando in uno stato di disfunzione endoteliale a livello vascolare. L'alterazione dell'omeostasi endoteliale, in cui i meccanismi di danno non sono adeguatamente compensati dall'attivazione dei processi di riparo sembrano giocare un ruolo importante nello sviluppo delle complicanze del diabete. Le EPC sono cellule di derivazione ossea deputate al mantenimento della salute endoteliale, vasculogenesi e riparo endoteliale. Soggetti con diabete di tipo 1 e 2 presentano ridotti livelli di EPC e alterazioni nella loro funzione. In questo contesto, le EPC potrebbero avere un ruolo patogenetico nello sviluppo delle complicanze micro e macrovascolari, così come nelle disfunzioni sessuali nel diabete. Il miglioramento del controllo glicemico e della variabilità glicemica sembrano impattare positivamente sul numero e la funzionalità delle EPC. Molti farmaci normalmente usati nella terapia del diabete sembrano capaci di migliorare il numero e/o la funzionalità delle EPC. Ulteriori studi clinici di maggiore durata e su casistiche più ampie sono necessari per meglio esaminare i meccanismi di legame tra salute endoteliale e diabete mellito.

BIBLIOGRAFIA

1. Brøns C, Grønnet LG. Mechanisms in endocrinology: Skeletal muscle lipotoxicity in insulin resistance and type 2 diabetes: a causal mechanism or an innocent bystander?. *Eur J Endocrinol* 176: R67-R78, 2017.
2. Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, et al. Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms. *Diabetes Care* 34(Suppl 2): S285-S290, 2011.
3. McEwen LN, Karter AJ, Waitzfelder BE, et al. Predictors of mortality over 8 years in type 2 diabetic patients: Translating Research Into Action for Diabetes (TRIAD). *Diabetes Care* 35(6): 1301-1309, 2012.
4. Marx, Nikolaus et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiovascular disease in patients with diabetes. *European heart journal*, ehad192. 25 Aug. 2023.
5. Secrest AM, Washington RE, Orchard TJ. Mortality in Type 1 Diabetes. In: Cowie CC, Casagrande SS, Menke A, et al. eds. *Diabetes in America*. 3rd ed. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (US); August 2018.
6. Secrest AM, Becker DJ, Kelsey SF, et al. Cause-specific mortality trends in a large population-based cohort with long-standing childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetes* 59: 3216-3222, 2010.
7. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119, 2005.
8. Maiorino MI, Bellastella G, Giugliano D, Esposito K. Cooling down inflammation in type 2 diabetes: how strong is the evidence for cardiometabolic benefit?. *Endocrine* 55: 360-365, 2017.
9. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 108: 1527-1532, 2003.
10. Jarvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, et al. Endothelial dysfunction and increased arterial intima media thickness in children with type 1 diabetes. *Circulation* 109: 1750-1755, 2004.
11. Kirton JP, Xu Q. Endothelial precursors in vascular repair. *Microvasc Res* 79: 193-199, 2010.
12. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874, 2002.
13. Katakami N. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *J Atheroscler Thromb* 25(1): 27-39, 2018.

14. Meza CA, La Favor JD, Kim DH, Hickner RC. Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS?. *Int J Mol Sci* 20: 3775, 2019.
15. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 85: 342-350, 2001.
16. Diodati JG, Dakak N, Gilligan DM, et al. Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation* 98: 17-24, 1998.
17. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, et al. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 117: 2417-2426, 2004.
18. Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, et al. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1728-1730, 2002.
19. Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4748-4753, 2000.
20. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10: 858-864, 2004.
21. Marfella R, D'Amico M, Di Filippo C, et al. Myocardial infarction in diabetic rats: role of hyperglycaemia on infarct size and early expression of hypoxia-inducible factor 1. *Diabetologia* 45: 1172-1181, 2002.
22. Fadini GP. A reappraisal of the role of circulating (progenitor) cells in the pathobiology of diabetic complications. *Diabetologia* 57: 4-15, 2014.
23. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353: 999-1007, 2005.
24. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997.
25. Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Characterization of endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 1-2, 2005.
26. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 45: 321-325, 2005.
27. Quirici N, Soligo D, Caneva L, et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol* 115: 186-194, 2001.
28. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, et al. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res* 93: 1023-1025, 2003.
29. Crosby JR, Kaminski WE, Schattman G, et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res* 87: 728-730, 2000.
30. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 8: 498-508, 2004.
31. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348: 593-600, 2003.
32. Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol* 11: 18-25, 2007.
33. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1185-1189, 2003.
34. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9: 1370-1376, 2003.
35. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109: 625-637, 2002.
36. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Endothelial Progenitors in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1263: 85-115, 2020.
37. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. *Cell* 176: 1248-1264, 2019.

38. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor1 effects on ex-vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 107: 1322-1328, 2003.
39. Pitchford SC, Furze RC, Jones CP, et al. Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow. *Cell Stem Cell* 4, 62-72, 2009.
40. Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, et al. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 33: 1362-1368, 2002.
41. Asahara T, Masuda H, Takahashi T et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85: 221-228, 1999.
42. Zhang Y, Ingram DA, Murphy MP et al. Release of proinflammatory mediators and expression of proinflammatory adhesion molecules by endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1675-H1682, 2009.
43. Yoon CH, Hur J, Park KW et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 112: 1618-1627, 2005.
44. Spring H, Schüler T, Arnold B, et al. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18111-18116, 2005.
45. Fadini GP, Baesso I, Albiero M, et al. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis* 197: 496-503, 2008.
46. Longo M, Di Meo I, Caruso P, et al. Circulating levels of endothelial progenitor cells are associated with better cognitive function in older adults with glucagon-like peptide 1 receptor agonist-treated type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 200: 110688, 2023.
47. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J* 34: 2436-2443, 2013.
48. Tokgozoglu L, Yorgun H, Gurses KM, et al. The association between circulating endothelial progenitor cells and coronary collateral formation. *Atherosclerosis* 219: 851-854, 2011.
49. Fadini GP, Maruyama S, Ozaki T, et al. Circulating progenitor cell count for cardiovascular risk stratification: a pooled analysis. *PLoS* 5: e11488, 2010.
50. Fadini GP, de Kreutzenberg S, Agostini C et al. Low CD34+ cell count and metabolic syndrome synergistically increase the risk of adverse outcomes. *Atherosclerosis* 207: 213-219, 2009.
51. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89: E1-E7, 2001.
52. Fadini GP, Ciciliot S, Albiero M. Concise Review: Perspectives and Clinical Implications of Bone Marrow and Circulating Stem Cell Defects in Diabetes. *Stem Cells* 35: 106-116, 2017.
53. Fadini GP, Miorin M, Facco M, et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 45: 1449-1457, 2005.
54. Sibal L, Aldibbiat A, Agarwal SC, et al. Circulating endothelial progenitor cells, endothelial function, carotid intima-media thickness and circulating markers of endothelial dysfunction in people with type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria. *Diabetologia* 52: 1464-1473, 2009.
55. Hortenhuber T, Rami-Mehar B, Satler M et al. Endothelial progenitor cells are related to glycemic control in children with type 1 diabetes over time. *Diabetes Care* 36: 1647-1653, 2013.
56. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615-1625, 2005.
57. Rigato M, Bittante C, Albiero M, et al. Circulating Progenitor Cell Count Predicts Microvascular Outcomes in Type 2 Diabetic Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 100: 2666-2672, 2015.
58. Hernandez SL, Gong JH, Chen L, et al. Characterization of circulating and endothelial progenitor cells in patients with extreme-duration type 1 diabetes. *Diabetes Care* 37: 2193-2201, 2014.
59. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, et al. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia* 49: 3075-3084, 2006.

60. Liu X, Li Y, Liu Y, et al. Endothelial progenitor cells (EPCs) mobilized and activated by neurotrophic factors may contribute to pathologic neovascularization in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 176: 504-515, 2010.
61. Fadini GP, Sartore S, Baesso I, et al. Endothelial progenitor cells and the diabetic paradox. *Diabetes Care* 29: 714-716, 2006.
62. Asnaghi V, Lattanzio R, Mazzolari G, et al. Increased clonogenic potential of circulating endothelial progenitor cells in patients with type 1 diabetes and proliferative retinopathy. *Diabetologia* 49: 1109-1111, 2006.
63. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet* 356: 147-152, 2000.
64. Choi JH, Kim KL, Huh W, et al. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1246-1252, 2004.
65. Reinhard H, Jacobsen PK, Lajer M et al. Endothelial progenitor cells in long-standing asymptomatic type 1 diabetic patients with or without diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract* 118: c309-c314, 2011.
66. Dessapt C, Karalliedde J, Hernandez-Fuentes M et al. Circulating vascular progenitor cells in patients with type 1 diabetes and microalbuminuria. *Diabetes Care* 33: 875-877, 2010.
67. Herbrig K, Gebler K, Oelschlaegel U, et l. Kidney transplantation substantially improves endothelial progenitor cell dysfunction in patients with end-stage renal disease. *Am J Transplant* 6: 2922-2928, 2006.
68. Thum T, Tsikas D, Stein S, et al. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 46: 1693-1701, 2005.
69. Makino H, Okada S, Nagumo A et al. Decreased circulating CD34+ cells are associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabet Med* 26: 171-173, 2009.
70. Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, et al. Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes* 54: 823-1828, 2005.
71. Drela E, Stankowska K, Kulwas A, Rość D. Endothelial progenitor cells in diabetic foot syndrome. *Adv Clin Exp Med* 21: 249-254, 2012.
72. Jeong JO, Kim MO, Kim H et al. Dual angiogenic and neurotrophic effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy. *Circulation* 119: 699-708, 2009.
73. WHO, 2006; Convened International Technical Consultation on Sexual Health, p. 4, chapter 3.
74. Basson R, Berman J, Burnett A, et al. Report of the international consensus development conference on female sexual dysfunction: definitions and classifications. *J Urol* 163: 888-893, 2000.
75. Maio A, Maiorino MI, Longo M, et al. Change in Circulating Levels of Endothelial Progenitor Cells and Sexual Function in Women With Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 18; 107: e3910-e3918, 2022.
76. NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. *JAMA* 270: 83-90, 1993.
77. Dimmeler S, Zeiher AM, Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med* 82: 671-677, 2004.
78. Murata M, Tamemoto H, Otani T, et al. Endothelial impairment and bone marrow-derived CD34(+)/133(+) cells in diabetic patients with erectile dysfunction. *J Diabetes Investig* 3: 526-533, 2012.
79. Maiorino MI, Bellastella G, Petrizzo M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in type 1 diabetic patients with erectile dysfunction. *Endocrine* 49: 415-421, 2015.
80. Foresta C, Zuccarello D, De Toni L et al. Androgens stimulate endothelial progenitor cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Clin Endocrinol* 68: 284-289, 2008.
81. König M, Lamos EM, Stein SA, Davis SN. An insight into the recent diabetes trials: what is the best approach to prevent macrovascular and microvascular complications? *Curr Diabetes Rev* 9: 371-381, 2013.
82. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, et al. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130: 963-974, 2000.
83. Fadini GP, Pucci L, Vanacore R, et al. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia* 50: 2156-2163, 2007.
84. Xu J, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation* 120: 1266-1286, 2009.

85. Menegazzo L, Albiero M, Avogaro A, Fadini GP: Endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. *Biofactors* 38: 194-202, 2012.
86. Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Mariano V et al. Optimized glycaemic control achieved with add-on basal insulin therapy improves indexes of endothelial damage and regeneration in type 2 diabetic patients with macroangiopathy: a randomized crossover trial comparing detemir versus glargine. *Diabetes Obes Metab* 13: 718-725, 2011.
87. Churdchomjan W, Kheolamai P, Manochantr S, et al. Comparison of endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes with good and poor glycemic control. *BMC Endocr Disord* 10: 5, 2010.
88. Maiorino MI, Casciano O, Della Volpe E, et al. Reducing glucose variability with continuous subcutaneous insulin infusion increases endothelial progenitor cells in type 1 diabetes: an observational study. *Endocrine* 52: 244-252, 2016.
89. Longo M, Scappaticcio L, Bellastella G, et al. Alterations in the Levels of Circulating and Endothelial Progenitor Cells Levels in Young Adults with Type 1 Diabetes: A 2-Year Follow-Up from the Observational METRO Study. *Diabetes Metab Syndr Obes* 13: 777-784, 2020.
90. Wils J, Favre J, Bellien J. Modulating putative endothelial progenitor cells for the treatment of endothelial dysfunction and cardiovascular complications in diabetes. *Pharmacol Ther* 170: 98-115, 2017.
91. Chen LL, Liao YF, Zeng TS, et al. Effects of metformin plus gliclazide compared with metformin alone on circulating endothelial progenitor cell in type 2 diabetic patients. *Endocrine* 38: 266-275, 2010.
92. Liao YF, Chen LL, Zeng TS, et al. Number of circulating endothelial progenitor cells as a marker of vascular endothelial function for type 2 diabetes. *Vasc Med* 15: 279-285, 2010.
93. Reinhard H, Jacobsen PK, Lajer M, et al. Multifactorial treatment increases endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 53: 2129-2133, 2010.
94. Hamed S, Brenner B, Roguin A. Nitric oxide: a key factor behind the dysfunctionality of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus type-2. *Cardiovasc Res* 91: 9-15, 2011.
95. Chakraborty A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract* 93: 56-62, 2011.
96. He T, Peterson TE, Holmuhamedov EL, et al. Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 2021-2027, 2004.
97. Skrha J, Prázný M, Hilgertová J, et al. Oxidative stress and endothelium influenced by metformin in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Pharmacol* 63: 1107-1114, 2007.
98. Chen LL, Yu F, Zeng TS, et al. Effects of gliclazide on endothelial function in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol* 659: 296-301, 2011.
99. Betteridge DJ. CHICAGO, PERISCOPE and PROactive: CV risk modification in diabetes with pioglitazone. *Fundam Clin Pharmacol* 23: 675-679, 2009.
100. Gensch C, Clever YP, Werner C, et al. The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* 192: 67-74, 2007.
101. Wang CH, Ting MK, Verma S, et al. Pioglitazone increases the numbers and improves the functional capacity of endothelial progenitor cells in patients with diabetes mellitus. *Am Heart J* 152: 1051.e1-1051.e10518, 2006.
102. Spigoni V, Picconi A, Cito M, et al. Pioglitazone improves in vitro viability and function of endothelial progenitor cells from individuals with impaired glucose tolerance. *PLoS One* 7: e48283, 2012.
103. Yu X, Chen P, Wang H, et al. Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction in those with impaired glucose regulation among the first-degree relatives of type 2 diabetes mellitus patients. *Med Princ Pract* 22: 156-160, 2013.
104. Agarwal R. Anti-inflammatory effects of short-term pioglitazone therapy in men with advanced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F600-F605, 2006.
105. Mori Y, Itoh Y, Obata T, et al. Effects of pioglitazone vs glibenclamide on postprandial increases in glucose and triglyceride levels and on oxidative stress in Japanese patients with type 2 diabetes. *Endocrine* 29: 143-148, 2006.
106. Esposito K, Maiorino MI, Di Palo C, et al. Effects of pioglitazone versus metformin on circulating endothelial microparticles and progenitor cells in patients with newly diagnosed type 2 diabetes--a randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab* 13: 439-445, 2011.

107. Werner C, Gensch C, Pöss J, et al. Pioglitazone activates aortic telomerase and prevents stress-induced endothelial apoptosis. *Atherosclerosis* 216: 23-34, 2011.
108. Fadini GP, Boscaro E, Albiero M et al. The oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes: possible role of stromal-derived factor-1alpha. *Diabetes Care* 33: 1607-1609, 2010.
109. Dei Cas A, Spigoni V, Cito M et al. Vildagliptin, but not glibenclamide, increases circulating endothelial progenitor cell number: a 12-month randomized controlled trial in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 16: 27, 2017.
110. Dore FJ, Domingues CC, Ahmadi N, et al. The synergistic effects of saxagliptin and metformin on CD34+ endothelial progenitor cells in early type 2 diabetes patients: a randomized clinical trial. *Cardiovasc Diabetol* 17: 65, 2018.
111. Xiao-Yun X, Zhao-Hui M, Ke C, et al. Glucagon-like peptide-1 improves proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells via upregulating VEGF generation. *Med Sci Monit* 17: BR35-BR41, 2011.
112. Oeseburg H, de Boer RA, Buikema H, et al. Glucagon-like peptide 1 prevents reactive oxygen species-induced endothelial cell senescence through the activation of protein kinase A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 1407-1414, 2010.
113. Xie D, Li Y, Xu M, et al. Effects of dulaglutide on endothelial progenitor cells and arterial elasticity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 21: 200, 2022.
114. Longo M, Di Meo I, Caruso P, et al. Circulating levels of endothelial progenitor cells are associated with better cognitive function in older adults with glucagon-like peptide 1 receptor agonist-treated type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 200: 110688, 2023.
115. Chai W, Dong Z, Wang N, et al. Glucagon-like peptide 1 recruits microvasculature and increases glucose use in muscle via a nitric oxide-dependent mechanism. *Diabetes* 61: 888-896, 2012.
116. Ceriello A, Esposito K, Testa R, et al. The possible protective role of glucagon-like peptide 1 on endothelium during the meal and evidence for an “endothelial resistance” to glucagon-like peptide 1 in diabetes. *Diabetes Care* 34: 697-702, 2011.
117. Hess DA, Terenzi DC, Trac JZ et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin increases circulating provascular progenitor cells in people with type 2 diabetes mellitus. *Cell Metab* 30: 609-613, 2019.
118. Fadini GP: SGLT-2 inhibitors and circulating progenitor cells in diabetes. *Cell Metab* 31: 883, 2020.
119. Dong L, Kang L, Ding L, et al. Insulin modulates ischemia-induced endothelial progenitor cell mobilization and neovascularization in diabetic mice. *Microvasc Res* 82: 227-236, 2011.
120. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest* 117: 1249-1259, 2007.
121. Humpert PM, Djuric Z, Zeuge U, et al. Insulin stimulates the clonogenic potential of angiogenic endothelial progenitor cells by IGF-1 receptor-dependent signaling. *Mol Med* 14: 301-308, 2008.
122. Hamed S, Brenner B, Aharon A, et al. Nitric oxide and superoxide dismutase modulate endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 8: 56, 2009.
123. Oikonomou D, Kopf S, von Bauer R, et al. Influence of insulin and glargine on outgrowth and number of circulating endothelial progenitor cells in type 2 diabetes patients: a partially double-blind, randomized, three-arm unicenter study. *Cardiovasc Diabetol* 13: 137, 2014.
124. Siegelaar SE, Kulik W, van Lenthe H, et al. A randomized clinical trial comparing the effect of basal insulin and inhaled mealtime insulin on glucose variability and oxidative stress. *Diabetes Obes Metab* 11: 709-714, 2009.

a cura di Giuseppe Defeudis

Policlinico Universitario Campus Bio-Medico di Roma

Diabete mellito dopo trattamento con ocrelizumab per sclerosi multipla primariamente progressiva ♦ Diabetes mellitus after ocrelizumab treatment for primary progressive multiple sclerosis

Marco Grasso^{1,2}, Vera Frison^{1,2}, Nino Cristiano Chilelli^{1,2}, Alessio Filippi^{1,2}, Giorgia Costantini^{1,2}, Cristina Vilotti³, Natalino Simioni¹

¹UOSD Diabetologia, Ospedale Cittadella;

²UOC Medicina Generale, Ospedale Cittadella;

³UOC Neurologia, Ospedale Cittadella

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2303g>

ABSTRACT

Objectives: immune reconstitution therapies, which include antibody-based cell-depleting therapies targeting CD20+ (ocrelizumab, ofatumumab) or CD52+ (alemtuzumab) leukocytes, are approved for the treatment of multiple sclerosis. Autoimmune thyroid disease is the most common adverse effect of treatment with alemtuzumab, but some cases of autoimmune diabetes have been reported. To date, diabetes mellitus has not been reported after CD20-targeting monoclonal antibodies therapy.

Case Report: a 41-year-old man with primary progressive multiple sclerosis was diagnosed with diabetes mellitus six months following the first ocrelizumab infusion. He experienced polyuria and polydipsia, but not other symptoms as visual loss or weight loss. We started a basal-bolus insulin therapy, with progressive and relatively rapid improvement of glycemic control. To note, C-peptide resulted indicative of a preserved beta-cell activity and autoantibodies were negative. To present date, the patient reached an excellent control with metformin. **Conclusions:** this is the first case of diabetes mellitus reported after ocrelizumab administration. The timing of onset and course are similar to alemtuzumab-induced autoimmune diseases, usually interpreted as an “immune reconstitution syndrome”; however, ocrelizumab cell count depletion appears inferior in duration and cell population affected. This case suggests the need for screening and follow-up of glycemic status in patients treated with ocrelizumab.

As a novel therapeutic antibody, further investigation is required to elucidate the correlation between hyperglycemia and ocrelizumab.

KEYWORDS

Ocrelizumab, diabetes mellitus, multiple sclerosis, immune reconstitution therapy.

INTRODUZIONE

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica, neurodegenerativa demielinizzante del sistema nervoso centrale, dovuta a una disregolazione della risposta immunitaria adattativa (1).

Lo sviluppo delle terapie di immunoricostituzione ne ha profondamente cambiato la storia clinica. Il meccanismo d'azione delle terapie di ricostituzione immunitaria prevede l'eliminazione del repertorio immunitario patogenico del paziente attraverso un'immunosoppressione intensa e di breve durata con deplezione dei linfociti, e successivamente la ricostituzione di un nuovo sistema immunitario, al fine di ristabilirne una corretta tolleranza (1).

Queste includono, tra gli altri, farmaci a base di anticorpi monoclonali diretti contro leucociti che esprimono

sulla loro superficie CD20+ (ocrelizumab, ofatumumab) o CD52+ (alemtuzumab). Dopo il trattamento con alemtuzumab, circa il 34-41% dei pazienti sviluppa una sindrome da ricostituzione immunitaria, con comparsa di disordini autoimmuni. La ghiandola endocrina maggiormente interessata è la tiroide, e la manifestazione autoimmune più frequente è il Morbo di Basedow (2-3).

Ocrelizumab è un anticorpo umanizzato di seconda generazione diretto contro l'antigene CD20, approvato per il trattamento dei pazienti adulti affetti da SM primariamente progressiva (1-4). La somministrazione avviene per via endovenosa, alla posologia di 600 mg, ogni 24 settimane.

Le più comuni reazioni avverse dovute alla somministrazione di ocrelizumab sono reazioni correlate all'infusione, motivo per cui i pazienti vengono premedicati con metilprednisolone e antistaminico. Altri eventi riportati più di frequente sono le infezioni delle vie aeree superiori e delle vie urinarie, più raramente infezioni opportunistiche e leucoencefalopatia multifocale progressiva (4). A oggi, il diabete mellito non è stato riportato tra gli effetti collaterali dei pazienti trattati con anticorpi monoclonali diretti contro CD20.

In questo articolo descriviamo un caso di diabete mellito scompensato, diagnosticato dopo la somministrazione di ocrelizumab, con rapido miglioramento.

CASO CLINICO

Un uomo di 41 anni, di origine albanese, ha ricevuto diagnosi di sclerosi multipla primariamente progressiva nel 2019, esordita con paraparesi ingravescente.

Decorso clinico. Dal punto di vista anamnestico, la madre era affetta da tiroidite di Hashimoto e non vi era storia familiare di diabete mellito o patologie cardio-cerebrovascolari. Non fumatore, assunzione solo occasionale di alcolici, in trattamento con lamivudina per epatite B cronica e baclofene per la gestione dei sintomi neurologici.

In seguito al riscontro radiologico di malattia attiva alla risonanza magnetica e alla progressione della sintomatologia neurologica, nel luglio 2021 è stato avviato il trattamento con ocrelizumab.

Nel gennaio 2022, in occasione degli esami di controllo precedenti la seconda somministrazione di ocrelizumab, l'esame delle urine ha evidenziato glicosuria (>1000 mg/dl) e proteinuria, in assenza di chetonuria. Seguiva un prelievo per HbA_{1c}, che evidenziava un diabete mellito

francamente scompensato. È stata pertanto richiesta una consulenza diabetologica presso la nostra Unità. Alla nostra osservazione il paziente presentava pressione arteriosa e frequenza cardiaca nella norma (135/80 mmHg, 70 bpm), con un BMI di 24,6 kg/m². L'esame obiettivo risultava negativo per elementi di rilievo. Riferiva poliuria e polidipsia nelle settimane precedenti, ma negava altri sintomi come calo ponderale e riduzione del visus.

Sono stati pertanto richiesti ulteriori esami per valutarne lo status endocrino-metabolico e autoimmunitario, riassunti schematicamente in Tabella 1. L'autoimmunità è risultata negativa, con C-peptide conservato (2.7 ng/ml). Indagando gli esiti di analisi precedenti, si riscontravano due valori suggestivi di alterata glicemia a digiuno, il primo nel 2009 e il secondo nel 2019; non vi erano però riscontri glicemici alterati più recenti.

In considerazione dello scompenso glicemico è stato raccomandato uno stretto monitoraggio con glicemia capillare (4-5 stick/giorno) e avvio di terapia insulinica con schema basal-bolus: nello specifico glargine U-100 26 UI, glulisina 10 UI prima di colazione, 12 UI a pranzo e 10 UI a cena. È stato educato alla gestione di un algoritmo per la titolazione dell'insulina rapida secondo lo schema GestIO (5). Nelle settimane successive il paziente è stato seguito in telemedicina: con cadenza settimanale/bisettimanale inviava il diario glicemico e, in base ai valori riscontrati, venivano suggerite le modifiche da apportare fino alla successiva rivalutazione.

Il miglioramento del compenso glicemico è stato progressivo e relativamente rapido. I valori glicemici si mostravano mediamente più elevati al risveglio, con riduzione durante la giornata. Da un importante fabbisogno insulinico di 58 UI totali della prima osservazione (0.75 U/Kg), è stato regolarmente ridotto: 43 UI (0.56 UI/kg) dopo 2 settimane, 36 UI (0.47 UI/kg) dopo un mese, 24 UI (0.31 UI/kg) alla sesta settimana.

Successivamente glulisina è stata interrotta, glargine U-100 ridotta a 12 UI ed è stata introdotta terapia con metformina, alla posologia di 500 mg due volte al giorno. Quattro mesi dopo la prima visita, si sospendeva anche la somministrazione di glargine.

All'ultima visita diabetologica del giugno 2022 il paziente aveva mantenuto un eccellente compenso glicemico (HbA_{1c} 5,9%) con metformina 500 mg due volte al giorno. Nell'anno successivo, alle successive rivalutazioni neurologiche pre-infusione, si confermava l'ottimo compenso.

DISCUSSIONE

Il presente caso clinico presenta alcuni aspetti peculiari. Il paziente affetto da patologia autoimmunitaria è stato ricoverato per un franco scompenso glicemico dopo sei mesi dalla prima somministrazione di ocrelizumab, con

sintomi tipici, in assenza di chetonemia o chetonuria. Ha richiesto il trattamento con un fabbisogno insulinico non indifferente; successivamente, è diventato asintomatico e il diabete è stato adeguatamente controllato con metformina.

Il paziente riportava familiarità per autoimmunità, con la tiroidite cronica linfocitaria della madre. Vi erano stati precedenti riscontri di glicemia alterata a digiuno tredici e due anni prima, che non era stata ulteriormente indagata. Gli esami biochimici hanno mostrato una funzione beta-cellulare conservata, senza evidenza di malattia endocrina autoimmune: risultati negativi infatti autoanticorpi anti-GAD, anti-IA2, anti-insulina pancreatica, anti-recettore del TSH (TRAb), anti-tireoglobulina, anti-tireoperossidasi, anti-surrene, APCA, anti-transglutaminasi.

L'esordio e il decorso della malattia diabetica in questo paziente ricalcano in maniera importante le modalità riportate in un altro caso clinico, in cui la patologia endocrinologica che si presentava dopo sei mesi dalla prima somministrazione di ocrelizumab era il morbo di Basedow (6). In quell'occasione, però, l'autoimmunità tiroidea era risultata positiva per TRAb, e l'ipertiroidismo si è risolto spontaneamente senza necessità di terapia con farmaci antitiroidei. Come per il nostro paziente, le successive somministrazioni del farmaco non hanno determinato riesacerbazione della malattia.

Le ipotesi che è possibile formulare sono due, di senso opposto: un preesistente diabete, insorto casualmente prima o durante terapia con ocrelizumab e mitigato dal trattamento stesso; oppure, un diabete indotto dal farmaco. Indagando la prima ipotesi, è noto che l'incidenza di diabete mellito di tipo 1 (DMT1) è aumentata nei pazienti affetti da SM (7) mentre meno chiara risulta l'associazione con il diabete mellito di tipo 2 (DMT2) (8-9).

Non disponiamo di misurazioni della glicemia immediatamente precedenti la somministrazione di ocrelizumab, pertanto non è del tutto inverosimile che il paziente potesse già aver sviluppato il diabete, resosi manifesto dopo l'infusione del farmaco, tanto più considerando l'alterata glicemia a digiuno.

Un altro anticorpo monoclonale anti-CD20, rituximab, è stato oggetto di interesse per il trattamento di varie forme di diabete mellito. Un trial di fase II aveva evidenziato una preservazione a breve termine della funzione beta cellulare nei pazienti affetti da DM1 in trattamento con il

farmaco rispetto al placebo, ma senza modificare in maniera rilevante la storia della malattia (10).

Alcuni case report hanno descritto l'efficacia del trattamento con rituximab in forme severe e refrattarie della sindrome di Hirata, ottenendo risoluzione delle ipoglicemie (11-15). Infine, sempre nell'ambito di case report, rituximab ha migliorato il controllo glicemico in una forma rara di diabete, l'insulinoreistenza di tipo B, condizione caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi circolanti diretti contro il recettore dell'insulina (16-17).

In soggetti non affetti da diabete mellito, i dati appaiono contrastanti: rituximab non si associa ad alterazioni della glicemia in pazienti affetti da artrite reumatoide (18), correlandosi in alcuni studi a un rischio inferiore di sviluppare diabete rispetto ad altri immunosoppressori come azatioprina e MMF (19); al contempo, però, l'iperglicemia viene descritta come una reazione avversa nei pazienti affetti da tumore (20)

In merito a ocrelizumab, vi è un unico case report (21) che ha mostrato un importante miglioramento del controllo glicemico con netta riduzione della posologia di insulina pochi mesi dopo l'infusione in una paziente affetta da SM, con diagnosi di DM1 ventun anni prima. In quell'occasione, però, si trattava della prima somministrazione del farmaco; nel nostro caso, della seconda.

Pertanto, si potrebbe ipotizzare che il nostro paziente fosse già affetto da diabete mellito, magari una forma rara, resosi manifesto dopo la prima somministrazione di ocrelizumab, e successivamente trattato dalla seconda infusione.

In considerazione della seconda ipotesi, cioè diabete indotto, favorito o slatentizzato dal trattamento con ocrelizumab, il meccanismo d'azione alla base potrebbe essere la sindrome da immunoricostruzione.

Come anticipato nell'introduzione, tale sindrome si presenta soprattutto dopo la somministrazione di alemtuzumab, un anticorpo monoclonale diretto contro CD52, una molecola di superficie espressa ad alti livelli in linfociti T e B e meno rappresentata in cellule dell'immunità innata, ma non presente sulle cellule staminali emopoietiche (HSCs). Dopo la deplezione linfocitaria, le HSC iniziano un lento ripopolamento, inizialmente ad opera di linfociti B, laddove linfociti CD4+ e CD8+ impiegano anche anni prima di raggiungere i livelli pre-trattamento. Il ripopolamento avviene a opera di linfociti

B naive, con prolungata deplezione dei linfociti B della memoria (22).

Non è perfettamente compreso come i cambiamenti del repertorio linfocitario possano correlarsi con la comparsa di malattie autoimmuni dopo questa breve e intensa immunosoppressione, ma l'ipotesi più probabile è che sia connesso al recupero sproporzionatamente rapido di cellule B rispetto alle cellule T, che potrebbe condurre un'espansione disregolata delle cellule B autoreattive. Il picco di incidenza di disordini autoimmunitari post alemtuzumab si ha dopo due-tre anni e, come nel nostro caso, in un terzo dei casi si ha un miglioramento progressivo. A oggi, però, queste condizioni non sono state riportate in pazienti trattati con anticorpi monoclonali anti CD20 (22).

In letteratura sono riportati alcuni casi clinici di comparsa del DM1 dopo somministrazione di alemtuzumab (23-24). Nel primo caso, una paziente con riscontro di positività anticorpale per gli anti-GAD prima dell'inizio della terapia ha sviluppato DM1 dopo trenta mesi dalla prima somministrazione del farmaco (23). Nel secondo report (24), due pazienti hanno sviluppato DM1 rispettivamente dopo ventisei e ventidue mesi dall'inizio della terapia con alemtuzumab. Nei tre casi l'esordio è stato descritto sempre come acuto, accompagnato o preceduto dallo sviluppo di tiroidite. Non è riportata la posologia di insulina e se permaneva la necessità di trattamento sostitutivo; inoltre, non è mai indicato il dosaggio del C-peptide.

Rituximab e ocrelizumab, invece, agiscono interagendo con CD20, molecola espressa soprattutto da linfociti B e dal 5% di linfociti T, inducendo la riduzione della conta linfocitaria; il numero di linfociti CD4+ e CD8 rimane sostanzialmente invariato (22). La successiva ripopolazione avviene a opera di linfociti B con fenotipo differente rispetto a quello pre-trattamento, principalmente da cellule immature, con minor produzione di citochine proinfiammatorie (TNF, IL-6 e GM-CSF) e aumentata di IL-10 (22). In alcuni modelli sperimentali, però, le cellule mieloidi dopo il trattamento con anti-CD20 presentano uno stato di aumentata attivazione con pattern proinfiammatorio; pertanto, una deplezione indiscriminata e non selettiva dei linfociti B potrebbe determinare la perdita della loro funzione regolatrice sulle APC mieloidi (25-28). Secondo tale aspetto, l'ipotesi di immunoricostruzione

potrebbe rimanere plausibile, ma con un meccanismo patofisiologico differente.

Non è ancora chiaro se questi aspetti possono essere sicuramente associati a patologia autoimmune dopo ocrelizumab, ma sembrerebbero in parte spiegare l'esacerbazione di altre malattie in pazienti in trattamento con rituximab, come rettocolite ulcerosa e pemfigoide bolloso (29-32).

Confrontando le due ipotesi, per quanto entrambe plausibili, appare più verosimile l'ipotesi di un diabete mellito indotto o slatentizzato da ocrelizumab, piuttosto che risolto dallo stesso. Le circostanze, l'esordio e il decorso della malattia nel nostro paziente, caratterizzata da esordio tardivo rispetto alla somministrazione del farmaco, con transitorio scompenso e successivo miglioramento spontaneo sono simili a quelle da tiroiditi indotte da alemtuzumab e al caso clinico sopra riportato di Basedow dopo ocrelizumab (2, 6).

Sicuramente, rimangono alcuni dubbi legati a certi aspetti: gli autoanticorpi sono sempre rimasti negativi, la sintomatologia e lo scompenso glicemico non si sono ripresentati dopo ulteriori somministrazioni, non era noto il quadro metabolico immediatamente precedente la prima infusione (seppur alcuni riscontri di alterata glicemia a digiuno).

Da quanto in nostra conoscenza, questo rappresenta il primo caso di diabete mellito riscontrato dopo l'inizio del trattamento con ocrelizumab. Come limitazione del nostro report, non sono stati dosati gli autoanticorpi anti Zn-T8, non disponibili presso il nostro laboratorio.

In generale, questo caso suggerisce la necessità di screening per alterazioni glicemiche prima di ogni somministrazione di ocrelizumab, di modo da identificare i soggetti a rischio di diabete mellito o con malattia manifesta, per prevenire un eventuale scompenso glicemico.

Una volta identificati, tali pazienti andrebbero monitorati con stretto follow-up per valutare il fabbisogno insulinico, di modo da evitare l'ipoglicemia dovuta al rapido miglioramento.

Ovviamente, trattandosi di un farmaco di recente introduzione sono richiesti ulteriori studi e monitoraggi per verificare e confermare l'associazione con il diabete mellito e, eventualmente, individuarne fattori di rischio e meccanismi causali.

Tabella 1 ◆ Esami bioumorali

ESAMI	02/2009	08/2011	06/2019	01/2021	01/2022	02/2022	05/2022	07/2022	02/2023	08/2023
GB (x 10 ⁹ /l)	10,1	18.6	7.5	10,0	7.10	14,20		8.8	5.9	8.2
Hb (g/dl)	14,3	13.1	12.9	14,6	15.0	14,4		14.1	13.8	14.3
N (x 10 ⁹ /l)	5,7	15.3	4.30	6,08	4.25	11,9		5.49	3.01	5.07
L (x 10 ⁹ /l)	3,61	2.25	2.17	3,0	1.94	1,12		2.36	2.00	2.23
PLT (x 10 ⁹ /l)	280	210	291	308	273	284		308	269	251
Glu (mg/dl)	102	79	110			442	103		120	131
HbA1c (%)						10,1	5,9	5.5	5.6	5.7
HbA1c (mmol/mol)						87	40	37	38	39
C-peptide (ng/ml)						2,7				
Glicosuria (mg/dl)	0		0	0	>1000	250				
Proteinuria (mg/dl)	0		0	0	15	15				
Chetonuria (mg/dl)	0		0	0	0	0				
TSH (uUI/ml)			1.20			0,76		1,16		1.86
TRAb (U/l)						0			1.92	
Anti TPO (negativi se <60 U/ml)						45				
Anti TG (negativi se <4,5 U/ml)						<1,3				
Anti-surrene							Assenti			
Anti GAD 65 (U/ml)						<5				
Anti IA2 (U/ml)						0				
Anti insula (U/ml)						0				
Anti TTG (negativi se <7 U/ml)						<0.6				
APCA							Assenti			
AST (U/l)	44	24	26	33	47	25	32		34	30
ALT (U/l)	68	28	33	45	77	42	28		36	32
GGT (U/l)	77	66	49	69	88	61			30	28
Colesterolo tot (mg/dl)	201	159	193			251	167			
HDL (mg/dl)	45						47			
Trigliceridi (mg/dl)	143	57	186			121	63			
Creatinina (mg/dl)	0,86	0.99	0.68	0,83	0.78	0.73	0,83		0.84	0.76
eGFR (ml/min)	120	104	120	110	112	115	109		108	112
Fattore Reumatoide (U/ml)			<10			<10				
PCR (mg/dl)			0.30			0.75				

BIBLIOGRAFIA

1. Lünemann JD, Ruck T, Muraro PA, Bar'Or A, Wiendl H. Immune reconstitution therapies: concepts for durable remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 16(1): 56-62, 2020.
2. Muller I, Moran C, Lecumberri B, Decallonne B, Robertson N, Jones J, et al. 2019 European Thyroid Association Guidelines on the Management of Thyroid Dysfunction following Immune Reconstitution Therapy. *Eur Thyroid J* 8(4): 173-185, 2019.
3. Kazakou P, Tzanetakos D, Vakrakou AG, Tzartos JS, Evangelopoulos ME, Anagnostouli M, et al. Thyroid autoimmunity following alemtuzumab treatment in multiple sclerosis patients: a prospective study. *Clin Exp Med* 2023 Jan 15. doi: 10.1007/s10238-022-00981-3.
4. Lamb YN. Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis. *Drugs* 82(3): 323-334, 2022.
5. Bruttomesso D, Barbato GM (a cura di). La terapia insulinica in ospedale - GestIO. 2014.
6. Duarte DiB, Silva AM Da, Freitas C, Cardoso H. Graves' disease with spontaneous resolution following ocrelizumab in primary progressive multiple sclerosis. *Endocr Regul* 55(3): 169-173, 2021.
7. Marrosu MG, Cocco E, Lai M, Spinicci G, Pischedda MP, Contu P. Patients with multiple sclerosis and risk of type 1 diabetes mellitus in Sardinia, Italy: a cohort study. *The Lancet* 359(9316): 1461-1465, 2002.
8. Wens I, Dalgas U, Stenager E, Eijnde BO. Risk factors related to cardiovascular diseases and the metabolic syndrome in multiple sclerosis - A systematic review. Vol. 19, *Multiple Sclerosis Journal*, 2013, pp. 1556-1564.
9. Wens I, Dalgas U, Deckx N, Cools N, Eijnde BO. Does multiple sclerosis affect glucose tolerance? *Multiple Sclerosis Journal* 20(9): 1273-1276, 2014.
10. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Bundy B, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, et al. B-lymphocyte depletion with rituximab and β -cell function: Two-year results. *Diabetes Care* 37(2): 453-459, 2014.
11. Boro H, Gupta U, Singh C, Malhotra R, Khadgawat R. Continuous glucose monitoring and Rituximab treatment in insulin autoimmune syndrome. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* 15(6): 102294, 2021.
12. Saxon DR, McDermott MT, Michels AW. Novel management of insulin autoimmune syndrome with rituximab and continuous glucose monitoring. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 101(5): 1931-1934, 2016.
13. Church D, Hunter RW, Lyall M, Clarke C, Bastiaan Vliegthart AD, Dear JW, et al. Resolution of hypoglycemia and cardiovascular dysfunction after rituximab treatment of insulin autoimmune syndrome. Vol. 40, *Diabetes Care*. American Diabetes Association Inc.; 2017, p. e80-82.
14. Kroemer TM, Erler A, Tsourdi E, Gruber M, Tselmin S, Julius U, et al. Immunoabsorption followed by rituximab as a definitive treatment for insulin autoimmune syndrome (Hirata syndrome): A case report. Vol. 41, *Diabetes Care*. American Diabetes Association Inc.; 2018. p. e23-24.
15. Cappellani D, Macchia E, Falorni A, Marchetti P. Insulin autoimmune syndrome (Hirata disease): A comprehensive review fifty years after its first description. Vol. 13, *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. Dove Medical Press Ltd; 2020, pp. 963-978.
16. Malek M, Chong AY, Lupsa BC, Lungu AO, Cochran EK, Soos MA, et al. Treatment of type B insulin resistance: A novel approach to reduce insulin receptor autoantibodies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2010; 95(8): 3641-3647.
17. Iseri K, Iyoda M, Shikida Y, Inokuchi T, Morikawa T, Hara N, et al. Rituximab for the treatment of type B insulin resistance syndrome: a case report and review of the literature. *Diabetic Medicine* 34(12): 1788-1791.
18. Lin C, Ji H, Cai X, Yang W, Lv F, Ji L. The association between the biological disease-modifying anti-rheumatic drugs and the incidence of diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacol Res* 161: 105216, 2020.
19. Kridin K, Mruwat N, Ludwig RJ. Association of Rituximab with Risk of Long-term Cardiovascular and Metabolic Outcomes in Patients with Pemphigus. *JAMA Dermatol* 159(1): 56-61, 2023.
20. Silvestris N, Argentiero A, Beretta GD, Di Bartolo P, Montagnani M, Danesi R, et al. Management of metabolic adverse events of targeted therapies and immune checkpoint inhibitors in cancer patients: an Associazione Italiana Oncologia Medica (AIOM)/Associazione Medici Diabetologi (AMD)/Società Italiana Farmacologia (SIF) multidisciplinary consensus position paper. Vol. 154, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2020.

21. Duz OA, Bektas S, Askin AE, Birday E. An Unexpected Post-ocrelizumab Improvement in Glycaemic Control in a Patient with Multiple Sclerosis. *EMJ Diabetes*. 2022 Oct 24.
22. Sellner J, Rommer PS. Immunological consequences of “immune reconstitution therapy” in multiple sclerosis: A systematic review. Vol. 19, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2020.
23. Malmeström C, Lycke J, Andersson BA. First reported case of diabetes mellitus type 1 as a possible secondary autoimmune disease following alemtuzumab treatment in ms. *J Neurol* 261(1): 2016-2018, 2014.
24. Richter S, Wagner B, Celius EG. Two cases of diabetes mellitus type 1 after alemtuzumab treatment for multiple sclerosis: another probable secondary autoimmune disease. Vol. 266, *Journal of Neurology*. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG; 2019, pp. 1270-1271.
25. Häusler D, Häusser-Kinzel S, Feldmann L, Torke S, Lepennetier G, Bernard CCA, et al. Functional characterization of reappearing B cells after anti-CD20 treatment of CNS autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 115(39): 9773-9778, 2018.
26. Cencioni MT, Mattoscio M, Magliozzi R, Bar-Or A, Muraro PA. B cells in multiple sclerosis – from targeted depletion to immune reconstitution therapies. Vol. 17, *Nature Reviews Neurology*. Nature Research; 2021, pp. 399-414.
27. Weber MS, Prod'homme T, Patarroyo JC, Molnarfi N, Karnezis T, Lehmann-Horn K, et al. B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol* 68(3): 369-383, 2010.
28. Lehmann-Horn K, Schleich E, Hertenberg D, Hapfelmeier A, Kümpfel T, von Bubnoff N, et al. Anti-CD20 B-cell depletion enhances monocyte reactivity in neuroimmunological disorders. *J Neuroinflammation*. 2011 Oct 26; 8.
29. Batts AF, Jalalat SZ, Hunter-Ellul L, Wilkerson MG. Exacerbation of bullous pemphigoid after hand, foot, and mouth disease treated with rituximab. *JAAD Case Rep* 2(1): 7-9, 2016.
30. Shahmohammadi S, Sahraian MA, Shahmohammadi A, Doosti R, Zare-Mirzaie A, Naser Moghadasi A. A presentation of ulcerative colitis after rituximab therapy in a patient with multiple sclerosis and literature review. Vol. 22, *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. Elsevier B.V.; 2018, p. 22-26.
31. Goetz M, Atreya R, Ghalibafian M, Galle PR, Neurath MF. Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. *Inflamm Bowel Dis* 13(11): 1365-1368, 2007.
32. Fassi DE, Nielsen CH, Kjeldsen J, Clemmensen O, Hegehus L. Ulcerative colitis following B lymphocyte depletion with rituximab in a patient with Graves' disease. *Gut* 57(5): 714-715, 2008.