

# il Diabete

Vol. 36, N. 2, luglio 2024



## – RASSEGNE

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

Alimenti e prevenzione delle malattie cardiovascolari

## – EDITORIALI

I trigliceridi come fattore di rischio cardiovascolare

## – AGGIORNAMENTI IN TEMA DI OBESITÀ

Lipodistrofie: quando magro non è sinonimo di metabolicamente sano

## – AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA

Effetti benefici di un nuovo composto omega-3

## – JOURNAL CLUB

## – MEDICINA TRASLAZIONALE

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

## – AGGIORNAMENTO IN TEMA DI TECNOLOGIE

Smartwatch, activity tracker e salute nella persona con diabete



# il Diabete

Organo ufficiale della  
Società Italiana di Diabetologia

## *Direttore Scientifico*

Sebastiano Squatrito (Catania)

## *Co-direttori*

Luca D'Onofrio (Roma, YoSID)

Carla Greco (Modena, YoSID)

Gloria Formoso (Chieti)

Lucia Frittitta (Catania)

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

## *Comitato di Redazione*

Benedetta Bonora (Padova)

Fabio Broglio (Torino)

Stefano Ciardullo (Milano)

Francesca Cinti (Roma-Cattolica)

Giuseppe Daniele (Pisa)

Angela Dardano (Pisa)

Ilaria Dicembrini (Firenze)

Antonio Di Pino (Catania)

Francesca Fiory (Napoli)

Luigi Laviola (Bari)

Anna Leonardini (Bari)

Roberta Lupoli (Napoli-Federico II)

Ernesto Maddaloni (Roma-Sapienza)

Daria Maggi (Roma-Campus)

Alessandro Mantovani (Verona)

Lorella Marselli (Pisa)

Matteo Monami (Firenze)

Mario Luca Morieri (Padova)

Antonio Nicolucci (Pescara)

Emanuela Orsi (Milano)

Pia Clara Pafundi (Napoli-Vanvitelli)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Francesca Porcellati (Perugia)

Ivana Rabbone (Torino)

Elena Succurro (Catanzaro)

Dario Tuccinardi (Roma-Campus)

## **CONSIGLIO DIRETTIVO SID**

### *Presidente*

Angelo Avogaro (Padova)

### *Presidente Eletto*

Raffaella Buzzetti (Roma)

### *Tesoriere*

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

### *Segretario*

Saula Vigili de Kreutzenberg (Padova)

### *Consiglieri*

Gloria Formoso (Chieti)

Mariangela Ghiani (Cagliari)

Luigi Laviola (Bari)

Giuseppe Lepore (Bergamo)

Maria Ida Maiorino (Napoli)

Raffaele Napoli (Napoli)

Andrea Natali (Pisa)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Salvatore Piro (Catania)

Sabrina Prudente (Roma)

Elena Succurro (Catanzaro)

## **UFFICIO DI PRESIDENZA SID 2022-2024**

Angelo Avogaro (Padova)

Agostino Consoli (Chieti)

Raffaella Buzzetti (Roma)

## *Responsabili di Redazione*

Andrea Tumminia (Catania)

Agostino Milluzzo (Catania)

Rosario Le Moli (Catania)

## Sommario

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

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

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

78 **Alimenti e prevenzione delle malattie cardiovascolari**

*Olga Vaccaro, Annalisa Giosuè, Marilena Vitale*

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

**I trigliceridi come fattore di rischio cardiovascolare**

*Mario Luca Morieri*

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

**Lipodistrofie: quando magro non è sinonimo di metabolicamente sano**

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

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

**Effetti benefici di un nuovo composto omega-3**

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

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

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

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

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

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

**Smartwatch, activity tracker e salute nella persona con diabete**

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

# il Diabete

---

Vol. 36, N. 2, luglio 2024

**Direzione Scientifica**

Sebastiano Squatrito, Catania

**Direttore Responsabile**

Mattia Righi

Associato all'Unione Stampa Periodica Italiana



Copyright © 2024 SID

Società Italiana di Diabetologia

CC BY 4.0 License

ISBN online 979-12-5477-486-1

ISSN online 1720-8335

DOI 10.30682/ildia2402

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

**Fondazione Bologna University Press**

Via Saragozza 10, 40123 Bologna

tel. (+39) 051 232 882

e-mail: [info@buponline.com](mailto:info@buponline.com)

[www.buponline.com](http://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.

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

## *Type 1 diabetes screening in Italy, preparatory project and practical implications*

Valentina Tiberi<sup>1</sup>, Umberto Agrimi<sup>2</sup>, Riccardo Bonfanti<sup>3</sup>, Emanuele Bosi<sup>4</sup>,  
Dario Iafusco<sup>5</sup>, Enza Mozzillo<sup>6</sup>, Carlo Ripoli<sup>7</sup>, Antonio D'Avino<sup>8</sup>, Flavia Pricci<sup>9</sup>,  
Olimpia Vincentini<sup>10</sup>, Marco Silano<sup>9</sup>, Valentino Cherubini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Materno-infantile, Azienda Ospedaliero Universitaria delle Marche, Ancona; <sup>2</sup>Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma; <sup>3</sup>Dipartimento di Pediatria, Istituto di ricerca sul diabete, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano; <sup>4</sup>Istituto di ricerca sul diabete, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano; <sup>5</sup>Dipartimento di Chirurgia Generale e Specialistica della Donna, dell'Infanzia e del Bambino, Centro Regionale del Diabete Pediatrico, Università degli Studi della Campania "L. Vanvitelli", Napoli; <sup>6</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Sezione di Pediatria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli; <sup>7</sup>Unità Operativa Diabetologia Pediatrica, ASL 8 Cagliari, Cagliari; <sup>8</sup>Presidente della FIMP (Federazione Italiana Medici Pediatri), Napoli; <sup>9</sup>Dipartimento di Malattie Cardiovascolari, Endocrino-Metaboliche e dell'Invecchiamento, Istituto Superiore di Sanità, Roma; <sup>10</sup>U.O. Alimentazione, Nutrizione e Salute, Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

DOI: <https://doi.org/10.30682//ildia2402a>

### ABSTRACT

*Type 1 diabetes (T1D) is a common and serious disease that affects children, adolescents, and young adults. Diagnosis is often with diabetic ketoacidosis (DKA), which poses serious health risks. Autoantibody studies have shown that presymptomatic stages can be identified before clinical diagnosis. Screening for autoantibodies in the general population could help reduce and prevent DKA. This review focuses on Italian law 130/2023 on population screening of T1D.*

### KEYWORDS

*Type 1 diabetes, population screening, pediatric diabetes, anti-islet autoantibodies, L. 130/2023.*

Il diabete mellito di tipo 1 (DMT1) è una malattia cronica che deriva dalla distruzione delle beta-cellule su base autoimmune. È la forma più frequente di diabete in età pediatrica e una delle malattie croniche infantili più comuni nel mondo (1), la sua incidenza è aumentata progressivamente negli anni a livello mondiale, con tassi di

crescita stimati che raggiungevano in Europa il 3%-4% per anno per tutto il periodo 1989-2013 (1-4). Negli anni successivi si è osservata, in alcuni paesi, una stabilizzazione dell'incidenza con un aumento significativo durante l'epidemia di COVID-19 (1).

Nel 1984 George Eisembarth ha proposto un modello di etiopatogenesi del DMT1, ancora oggi attuale, che prevede una fase preclinica di lunga durata (5), l'innescò del meccanismo di distruzione autoimmune delle cellule beta negli individui a rischio genetico, la comparsa di autoanticorpi anti-insula (AI), la progressiva distruzione delle beta-cellule fino alla comparsa di segni clinici. Negli ultimi decenni diverse ricerche hanno mirato a studiare le fasi precliniche della malattia, prima nei familiari di primo grado di persone con DMT1 e successivamente sulla popolazione generale (6).

L'Italia è stato il primo Paese al mondo a varare una legge per l'individuazione del diabete di tipo 1 e della celiachia nella popolazione pediatrica attraverso lo screening su base volontaria (Legge 15 settembre 2023, n. 130). La pie-

na applicazione della legge è preceduta da un progetto propedeutico che viene svolto in quattro regioni italiane e i cui risultati permetteranno di sviluppare al meglio il protocollo da applicare su tutto il territorio nazionale a partire dai primi mesi del 2025. Questa rassegna si focalizza sulle motivazioni che hanno spinto alla proposta di legge, sulla conduzione del progetto propedeutico e sulle aspettative che ci riserveranno i risultati.

### BISOGNI INSODDISFATTI DEL DIABETE DI TIPO 1

L'introduzione di nuovi farmaci e la diffusione delle tecnologie per la somministrazione dell'insulina hanno permesso importanti miglioramenti nella gestione della malattia, tuttavia, rimangono ancora oggi aperti alcuni bisogni insoddisfatti, tra cui l'elevata frequenza della chetoacidosi diabetica (DKA) alla diagnosi di diabete di tipo 1, la continua minaccia di ipoglicemia, il persistente peso quotidiano della gestione del diabete e il mancato raggiungimento di un controllo glicemico ottimale (7). D'altro canto, sebbene gli studi di ingegneria genetica per rendere invisibili le cellule insulino-secerenti prodotte dalle cellule staminali pluripotenti indotte stiano progredendo molto rapidamente, ad oggi il trapianto di cellule non è una opzione terapeutica applicabile nella pratica clinica per tutte le persone con DM1.

### FREQUENZA DELLA DKA ALL'ESORDIO DEL DIABETE

La DKA è una complicanza acuta grave del diabete la cui frequenza all'esordio è inaccettabilmente elevata e si registra un progressivo aumento in diversi paesi nel mondo (8). Oggi un bambino su tre ha la DKA al momento della diagnosi di diabete. Questa frequenza è particolarmente elevata in Italia dove si raggiungono valori del 40% (9). Nei bambini piccoli, al di sotto dei tre anni di vita, si arriva a punte del 60-70%. Durante la pandemia da COVID-19 si è assistito ad un aumento complessivo della DKA alla diagnosi che ha superato il 55% dei casi (10). Ogni anno purtroppo alcuni bambini muoiono per DKA. Il rischio di morbilità e mortalità, nei paesi industrializzati è di circa l'1% (8). Quando si presenta nella forma moderata e severa, la DKA causa danni al sistema nervoso centrale che possono essere permanenti. Anche un solo episodio di DKA che si presenta alla diagnosi di diabete è causa

di danni cognitivi che perdurano (11). Altre conseguenze della DKA sono legate al prolungamento del ricovero ospedaliero, peggiore controllo metabolico anche dopo molti anni dall'esordio del diabete e aumento della spesa sanitaria (12). Non da ultimo, è necessario ricordare come l'impatto psicologico per il bambino e la famiglia sia devastante quando il DM1 esordisce con DKA.

È ben noto che la causa principale della DKA è il ritardo della diagnosi di diabete. I sintomi iniziali di polidipsia e poliuria possono essere trascurati dalla famiglia e quando compaiono i segni della chetoacidosi, cioè vomito, mal di pancia, forte stanchezza, respiro difficoltoso, sonnolenza, non raramente si sospettano malattie dell'apparato gastroenterico o respiratorio prima del diabete, tutti fattori che comportano perdita di tempo.

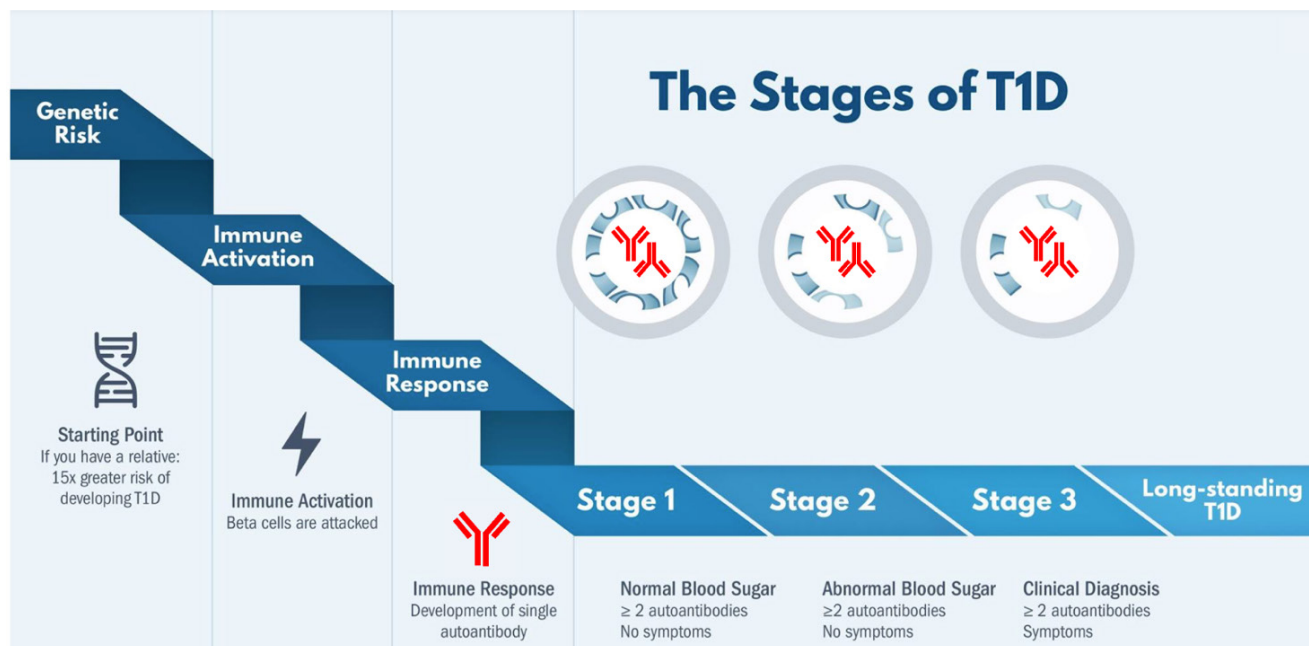
Allo scopo di prevenire la DKA sono state condotte negli anni passati campagne di sensibilizzazione sulla popolazione e sui sanitari che hanno fornito risultati soddisfacenti ma hanno richiesto sforzi organizzativi rilevanti (13) che ne limitano di fatto la diffusione. I programmi di screening attraverso la ricerca di AI nei familiari di primo grado e nella popolazione generale hanno dimostrato di essere efficaci nel ridurre in maniera significativa la prevalenza della DKA (14).

### FASI PRESINTOMATICHE DEL DIABETE DI TIPO 1

Da diversi anni è noto che la fase clinica del diabete di tipo 1 è preceduta dalla comparsa di anticorpi anti-insulina pancreatici (AI) che sono considerati marcatori di malattia. Si distinguono gli anti-GAD (GADA), anti-insulina (IAA), anti-IA2 tirosina fosfatasi (IA-2A) e anti-trasportatore di zinco-8 (ZnT8A) (15). Nel 2012, lo studio BABYDIAB aveva dimostrato che il picco di comparsa degli autoanticorpi nei familiari di primo grado ad altro rischio genetico di DM1 avveniva tra i 9 mesi e i 2 anni di vita.

Gli studi condotti negli ultimi decenni utilizzando questi AI hanno permesso di aggiornare le conoscenze sulla storia naturale della malattia. Uno "Scientific Statement" di *JDRF, Endocrine Society e American Diabetes Association*, nel 2015 ha proposto una stadiazione del diabete presintomatico (16), stabilendo che la malattia è il risultato di un "continuum" che progredisce in modo sequenziale ma prevedibile prima della comparsa dei sintomi. La diagnosi di diabete di tipo 1 può essere fatta nello stadio 1, quando sono rilevabili due o più AI e la glicemia è ancora del tutto

**Figura 1** ♦ Progressione del DMT1 attraverso vari stadi della malattia. Lo stadio 1 della malattia identifica l'inizio del DMT1. Lo stadio 1 si verifica in presenza di 2 o più AI con funzione beta-cellulare ancora integra. Lo stadio 2 identifica la presenza di IA e iniziale riduzione della massa beta-cellulare. Lo stadio 3 si caratterizza per la progressiva distruzione delle beta-cellule associata alla presenza di sintomi della malattia. Mod. da (www.trialnet.org)



normale (Fig. 1). Lo stadio 2 è caratterizzato da due o più AI e disglicemia. La disglicemia nei vari studi è stata definita come glicemia a digiuno  $\geq 100\text{mg/dl}$  oppure  $\geq 110\text{mg/dl}$ , alterata tolleranza al glucosio con glicemia a 2 ore dall'OGTT  $\geq 140\text{mg/dl}$ , valori a tempi intermedi dell'OGTT  $\geq 200\text{mg/dl}$ , oppure  $\text{HbA}_{1c} \geq 5.7\%$  (15). Lo stadio 3 si caratterizza per la presenza di segni clinici di diabete (17).

#### PRINCIPALI STUDI SULLE FASI PRECLINICHE DEL DIABETE

Uno studio collaborativo di ampie dimensioni che riuniva coorti di bambini a rischio genetico di DMT1 di Colorado, Finlandia, e Germania (18), dimostrava che il rischio a 15 anni era di 0.4% nei bambini senza AI, del 12.7% se era presente un solo AI, del 61.6% se erano presenti due AI, del 79.1% se presenti tre AI. In questo studio anche alcuni bambini senza AI avevano sviluppato diabete dopo 15 anni. Dopo la sierconversione con due o più AI, la progressione verso il diabete era del 43.5% a 5 anni, 69.7% a 10 anni e 84.2% a 15 anni. Il 69.7% degli individui con AI multipli progrediva alla forma clinica di diabete a distanza

di 10 anni, mentre la progressione era dello 14.5% nella coorte di coloro che avevano un solo AI e dello 0.5% in chi non aveva AI. Nei bambini con AI multipli la progressione verso il diabete conclamato era del 43.5% a 5 anni e dell'84.2% a 10 anni. Per contro nei bambini con un solo AI la progressione verso il diabete era del 14.5% a 10 anni. Un lavoro collaborativo molto recente denominato Type 1 Diabetes Intelligence (T1DI) a cui avevano partecipato 5 coorti prospettiche di Finlandia (DIPP), Germania (BABYDIAD e BABYDIET), Svezia (DiPiS) e USA (DEW-IT) ha valutato il rischio di evoluzione verso lo stadio 3 sulla base della persistenza degli AI multipli nel corso del tempo. Il rischio a 15 anni che variava dal 18% se il riscontro di AI multipli era una volta sola e non c'erano altre positività al 88% in caso di AI multipli persistenti nella visita successiva, sottolineando l'importanza di un follow-up molto accurato nei pazienti con AI.

#### STUDI DI PREVENZIONE DEL DIABETE TIPO 1

Da molti anni nel mondo sono stati avviati diversi programmi di screening, che differiscono per tipo di analisi

effettuata, caratteristiche della popolazione scelta e ampiezza delle aree territoriali di provenienza dei soggetti screenati.

### Rischio genetico

Il DMT1 ha un rischio genetico rilevante attribuibile per il 30-50% alla regione HLA (1).

Nella popolazione generale, i bambini con il genotipo predisponente hanno un rischio del 5% di autoimmunità insulare e DMT1. I parenti di primo grado portatori dello stesso aplotipo HLA di un familiare affetto presentano un ulteriore aumento del rischio che raggiunge il 20%; in caso di genotipo ad alto rischio e più familiari di I grado con diabete di tipo 1, o gemello omozigote con diabete il rischio di sviluppare DMT1 arriva al 50% (19-20) (Fig. 2).

Altri 50 loci circa contribuiscono in misura minore al rischio di malattia (1, 21). È noto tuttavia che in circa il 90% delle nuove diagnosi di DMT1 non vi sia familiarità. Oram et al. (22) hanno sviluppato e convalidato un punteggio di rischio genetico T1D (GRS) che incorpora polimorfismi a singolo nucleotide (SNP-single nucleotide polymorphism) HLA e non HLA associati al DMT1 e si è dimostrato utile nel discriminare il DMT1 dal diabete di tipo 2, diabete monogenico e controlli (22). Più recentemente è stato messo a punto un sistema avanzato di

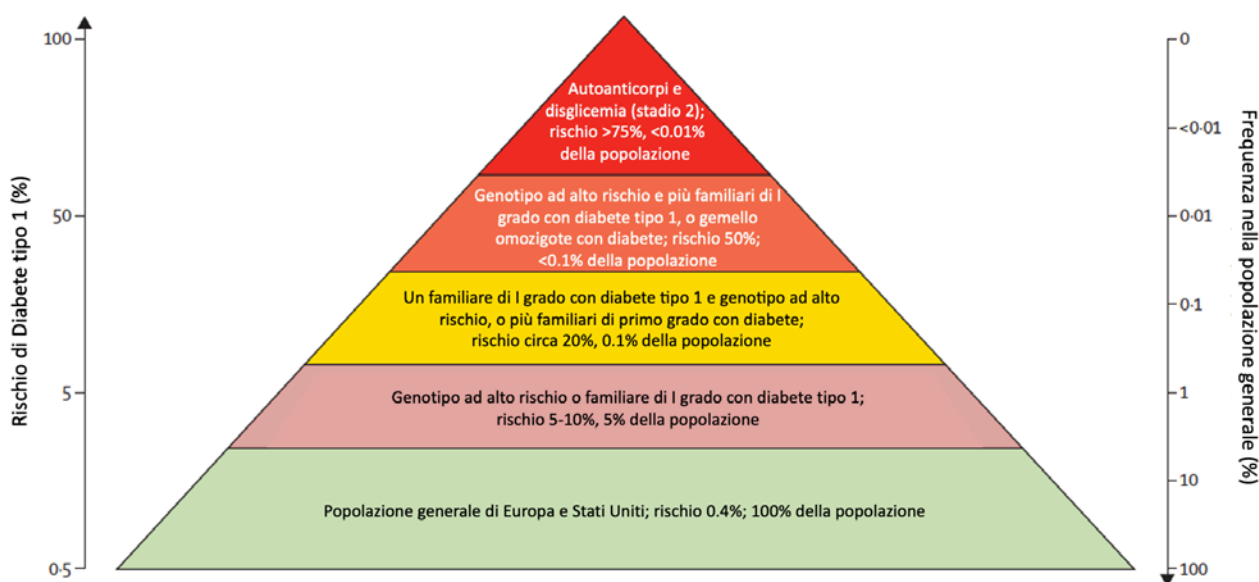
valutazione del rischio genetico denominato T1D GRS2 che è molto efficace nella valutazione del rischio genetico nell'adulto e contribuire a migliorare il rischio genetico neonatale (23). La riduzione dei costi e la diffusione della tecnica SNP permetteranno di contribuire allo screening di popolazione.

### Programmi di screening su neonati

Utilizzando lo screening per l'HLA, che permette di arricchire la coorte di individui idonei allo screening degli AI, lo studio TEDDY (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young) sta raccogliendo dati da oltre 8.000 neonati HLA geneticamente a rischio, la maggior parte (90%) senza un parente noto con DMT1. Questi neonati vengono seguiti per 15 anni al fine di monitorare la comparsa di AI e quindi di diabete, con documentazione dei fattori ambientali che potrebbero contribuire allo sviluppo della malattia (24).

Lo studio sulla previsione e prevenzione del diabete di tipo 1 (DIPP), attivo in tre ospedali universitari finlandesi dal 1994, che coprono insieme circa il 25% della coorte di nascita della Finlandia, ha sottoposto a screening oltre 250.000 neonati. In questo studio, dopo consenso dei genitori, viene valutata la suscettibilità conferita dall'HLA al DMT1 attraverso sangue cordonale. Quasi il 10% dei

**Figura 2** ♦ Rischio durante la vita di sviluppare DMT1 confrontato con il livello di rischio della popolazione generale. A sinistra il rischio di sviluppare diabete nel corso della vita; a destra la frequenza del diabete nella popolazione generale. Nelle aree più alte il rischio di sviluppare diabete è più alto ma interessa una quota percentuale più piccola di popolazione. Mod. da (19)





soggetti sottoposti a screening dopo aver mostrato di essere portatore di genotipi HLA predisponenti, viene invitato al follow-up fino ai 15 anni di età o alla diagnosi di DMT1 (25).

Lo studio neonatale BABYSCREEN avviato nel 2018 a Helsinki, in Finlandia, valuta la suscettibilità genetica al DMT1 e alla malattia celiaca; esso analizza cellule del sangue cordonale per gli alleli HLA che conferiscono un alto rischio a queste due patologie di interesse. I soggetti identificati a rischio maggiore per entrambe le malattie sono invitati a sottoporsi al test degli autoanticorpi per entrambe le malattie a 1, 2 e 3 anni di età. Dei 9.000 bambini sottoposti a screening, il 6,0% era considerato ad alto rischio genetico per il diabete di tipo 1, il 15,0% ad alto rischio genetico per la celiachia e il 4,1% ad alto rischio genetico per entrambe le malattie (6).

Tre programmi recentemente avviati negli Stati Uniti sono il programma Combined Antibody Screening for Celiac and Diabetes Evaluation (CASCADE), il progetto Sanford Population Level Estimation of T1D Risk Genes in Children (PLEDGE) e il progetto Precision Individualized Medicine for Diabetes (PRiMeD).

#### **Programmi di screening successivi al primo anno di vita**

Diversi programmi utilizzano gli AI per lo screening primario nei bambini dopo il periodo neonatale, tra cui ASK (Autoimmunity Screening for Kids, Colorado), T1Detect (Stati Uniti) ed Early Detection of Type 1 Diabetes (Frída) ed Early Detection of Type 1 diabete and Hypercholesterolemia in Bassa Sassonia (Frídolin) (Germania). I familiari di soggetti affetti sono inclusi in questi programmi. Questi studi condotti sulla popolazione generale, seppur in aree geografiche ristrette, sono specifici per l'identificazione del DMT1 agli stadi 1 e 2. Ogni studio possiede caratteristiche peculiari per ottimizzazione di arruolamento e follow-up.

Il programma ASK esteso ai soggetti di età compresa tra 1 e 17 anni residenti in Colorado, negli Stati Uniti, ad esempio ha come obiettivo la diagnosi precoce del DMT1, la prevenzione della DKA e identificazione di soggetti da indirizzare a studi di prevenzione. Esso testa la presenza di AI per diabete e di anticorpi anti transglutaminasi tissutale (tTGA) per celiachia (26).

Nel 2020 JDRF ha avviato il programma T1Detect che ha lo scopo di fornire collegamenti online tra individui di età  $\geq 1$  anno a un laboratorio commerciale (Enable Bio-

sciences) il quale utilizza un portale online per fornire il materiale necessario ad eseguire lo screening a domicilio con un approccio basato sull'analisi degli spot di sangue. I partecipanti ricevono un kit per la raccolta che viene poi spedito per posta per la misurazione di GADA, IA2A e IAA. I positivi allo screening degli AI vengono contattati dal laboratorio e viene loro offerto supporto individuale e/o online (27).

Il programma Frída avviato nel 2015 in alcune aree della Germania ha coinvolto i pediatri del territorio per lo screening degli AI di bambini sani compresi tra 1,75 e 10,99 anni. Attraverso questo programma, sono stati identificati i fattori che predicono la progressione dallo stadio 1 allo stadio 2 o al diabete conclamato, tra cui obesità, positività IA2A e HbA1c  $>5,7\%$ , e dal test da carico orale al glucosio orale (OGTT) a 60 minuti a livelli nel terzile più alto (28).

#### **La Legge n. 130/2023 sullo screening del diabete di tipo 1 in Italia**

Con la Legge n. 130 del 15 settembre 2023 l'Italia è diventata la prima nazione al mondo ad approvare lo screening in tutta la popolazione pediatrica per DMT1 e Malattia Celiaca (MC) su tutto il territorio nazionale (29).

Gli obiettivi della campagna di screening italiana sono molteplici. L'obiettivo più ambizioso è sicuramente quello di porre le basi per una cura futura della patologia, anche in considerazione del fatto che a novembre 2022 la Food and Drug Administration (FDA) negli Stati Uniti ha approvato l'uso terapeutico del Teplizumab (30), il primo farmaco capace di modificare il corso del DMT1 (disease-modifying). Nello studio TN10 che ha portato alla sua approvazione per l'uso terapeutico, infatti è stato dimostrato come una somministrazione di 15 giorni di questo monoclonale anti-CD-3 possa ritardare la diagnosi clinica del DMT1 in media di 24 mesi e, in un'analisi successiva, fino a 32,5 mesi (31). Oltre a Teplizumab, sono in corso studi di prevenzione con altre terapie (clinical trial reg. n. NCT01773707 e NCT03428945, ClinicalTrials.gov).

Obiettivi certamente più immediati della campagna di screening in Italia sono l'identificazione di bambini e adolescenti a rischio o con DMT1 e/o MC non ancora diagnosticati, o con forme asintomatiche della malattia, con prevenzione e riduzione dei rischi di una diagnosi tardiva o mancata e dell'incidenza della DKA all'esordio. Lo screening consentendo inoltre una diagnosi più tem-

pesta del DMT1 e permettendo un avvio più precoce di una terapia fornirà la possibilità di instaurare un buon controllo glico-metabolico già dall'inizio della patologia che si è dimostrato essere un fattore favorevole per il mantenimento di un buon controllo della malattia nel tempo (32).

Un altro aspetto sicuramente da considerare è l'impatto psicologico dell'informazione che il bambino ha il rischio di DMT1 sul bambino stesso e sulla famiglia, infatti in letteratura è descritto come una diagnosi inattesa di DMT1 possa causare alti tassi di depressione, problemi di adattamento e stress (33); programmi di screening su popolazioni ristrette hanno riportato un migliore adattamento dei bambini e delle loro famiglie alla diagnosi con un miglioramento della qualità della vita relativamente al diabete e riduzione dello stress genitoriale rispetto ai controlli (34).

L'Istituto Superiore di Sanità nell'ambito del progetto di screening per il DMT1 e Malattia Celiaca ha sponsorizzato uno studio propedeutico di fattibilità chiamato D1Ce. Questo progetto pilota partito a marzo 2024 ha compre-

so un campione di 5.363 bambini appartenenti a quattro regioni italiane, Campania, Lombardia, Marche e Sardegna (Fig. 3), esperti nel campo dello screening del DMT1 e ha permesso di sviluppare le principali caratteristiche in termini di fattibilità, monitoraggio e follow-up che saranno poi riportate allo screening su scala nazionale.

Lo screening per AI si basa sul prelievo di sangue capillare prelevato da polpastrello, eseguito da pediatri di libera scelta e rivolto a bambini appartenenti a tre classi di età: 2-2,9, 6-6,9 e 10-10,9 anni, scelte sulla base dei picchi di sieroconversione AI riportati in letteratura (35-37). L'utilizzo di sangue capillare raccolto su cartoncino è una metodica già utilizzata in Italia per lo Screening Neonatale Esteso e si è dimostrata ideale per lo screening stesso in quanto facile e veloce da eseguire, poco costosa e scarsamente dolorosa. Il suo utilizzo, reso possibile grazie alla messa a punto di un innovativo saggio per la misurazione contemporanea degli AI in formato automatizzabile ELISA (38), verrà poi confermato con tecnica LIPS.

Partecipanti allo studio ognuno con compiti precisi sono sicuramente l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), i pediatri

**Figura 3** ♦ Programmi di monitoraggio proposti sulla base dei risultati dello screening. I colori indicano il rischio di evoluzione verso la forma clinica di diabete.

Età (anni)	Precedente Screening	Risultati a screening precedente	Risultati allo screening corrente	Test di conferma anticorpale	Pattern del glucosio ematico	Monitoraggio
2-2,9	No		Neg			● Ripetizione dello screening a 6-6,9 anni
2-2,9	No		Pos	Neg	Normoglicemia	● Ripetizione dello screening a 6-6,9 anni
2-2,9	No		Pos	Pos S-IA	Normoglicemia	● Programma per rischio intermedio
2-2,9	No		Pos	Pos M-IA	Normoglicemia	● Monitoraggio come Stadio 1
2-2,9	No		Pos	Pos S o M-IA	Disglicemia	● Monitoraggio come Stadio 2
6-6,9	No		Neg			● Ripetizione dello screening a 10-10,9 anni
6-6,9	No		Pos	Neg		● Ripetizione dello screening a 10-10,9 anni
6-6,9	Sì	Neg	Neg			● Stop screening
6-6,9	Sì	Pos S-IA	Neg	Neg	Normoglicemia	● Ripetizione dello screening a 10-10,9 anni
6-6,9	Sì	Pos S-IA	Pos	Pos S-IA	Normoglicemia	● Monitoraggio come rischio intermedio
6-6,9	Sì	Pos S-IA	Pos	Pos M-IA	Normoglicemia	● Monitoraggio come Stadio 1
6-6,9	Sì	Pos S-IA	Pos	Pos S o M-IA	Disglicemia	● Monitoraggio come Stadio 2
10-10,9	No		Neg			● Stop screening
10-10,9	No		Pos			● Stop screening
10-10,9	Sì	Neg	Neg			● Stop screening
10-10,9	Sì	Pos S-IA	Neg	Neg	Normoglicemia	● Stop screening
10-10,9	Sì	Pos S-IA	Pos	Pos S-IA	Normoglicemia	● Monitoraggio come rischio intermedio
10-10,9	Sì	Pos S-IA	Pos	Pos M-IA	Normoglicemia	● Monitoraggio come Stadio 1
10-10,9	Sì	Pos S-IA	Pos	Pos S o M-IA	Disglicemia	● Monitoraggio come Stadio 2

Neg: negativo; Pos: positivo; Pos S-IA: positività a singolo anticorpo; Pos M-IA: positività a più anticorpi; Pos S o M-IA: positività a 1 o più anticorpi

di libera scelta (PLS), i centri clinici altamente specializzati in DMT1 e celiachia e Laboratori centralizzati.

L'ISS avrà il ruolo di coordinatore dello studio per la predisposizione del protocollo e degli accordi di collaborazione, preparazione e diffusione del materiale informativo, preparazione di questionari da sottoporre alle famiglie, organizzazione della logistica, gestione centralizzata del database dello studio, elaborazione ed analisi dei dati ottenuti dallo screening.

I PLS si occuperanno di reclutare i bambini, acquisire il consenso informato e l'informativa della privacy, somministrare il questionario anamnestico ai genitori dei soggetti da screenare, raccogliere i campioni biologici (capillare e cartoncini), preparare la spedizione dei campioni. Compileranno il questionario di fattibilità dello studio e saranno loro dopo aver ricevuto l'esito delle misurazioni effettuate dal laboratorio di riferimento a comunicarne l'esito ai genitori.

I centri clinici specialistici per DMT1 e celiachia avranno il compito di supportare e coinvolgere i PLS disponibili a partecipare allo studio. Avranno un compito di supporto scientifico ai PLS sui temi clinici specifici del DMT1 e della celiachia in ambito pediatrico. Si occuperanno della presa in carico dei casi positivi agli autoanticorpi o che necessitano di approfondimenti diagnostici; essi faranno da collegamento tra territorio e l'ISS.

I laboratori centralizzati si occuperanno della determinazione degli autoanticorpi specifici per DMT1 (anti-GAD; anti-IA2; anti-ZnT8; anti-IA) e celiachia (anti-transglutaminasi-IgA e IgG, TGA) su siero e di DQ2/DQ8 sul campione proveniente dal cartoncino di Guthrie (39).

### **Cambiamento dello scenario nella prevenzione**

La Legge n. 130 del 15 settembre 2023 rappresenta una svolta epocale sullo scenario della prevenzione del DMT1 a livello mondiale. Questo tipo di iniziativa, che per la prima volta coinvolge tutti i bambini di un intero territorio nazionale, indipendentemente dai fattori di rischio, necessita di una stretta collaborazione tra tutti gli stakeholders, inclusi gli operatori sanitari, le associazioni di pazienti, le aziende interessate. È però necessario il coinvolgimento di tutta la società, compresi coloro che si occupano di comunicazione, in quanto la diffusione di informazioni permetterà alla maggior parte della popolazione di usufruire dei vantaggi dello screening.

Saranno certamente impegnati in questa campagna medici sia del territorio che ospedalieri, ma non vanno dimenticati gli altri operatori sanitari come infermieri e psicologi che avranno il compito fondamentale di supportare le famiglie nel percorso assistenziale. I PLS saranno tra gli attori principali di questo progetto, la loro partecipazione tuttavia è su base volontaria; quindi, una adesione incompleta potrebbe determinare la mancata diagnosi di casi potenzialmente positivi.

Essendo l'obiettivo principale di questo screening nazionale la riduzione dell'incidenza della DKA, sarà interessante valutarne l'andamento dell'incidenza nel tempo una volta che lo screening sarà pienamente attivo. Un obiettivo secondario sarà anche l'individuazione di pazienti che possono beneficiare di terapie innovative o che potranno contribuire a svilupparne di nuove partecipando a trial e studi scientifici.

Lo studio pilota D1Ce porterà verosimilmente ad una diagnosi in stadio preclinico di 1-2 casi di DMT1, bisogna quindi considerare che la maggior parte dei casi incidenti saranno ancora diagnosticati per vie ordinarie, andrà quindi attentamente valutato il rapporto costo/beneficio da imputare a questo screening.

La partecipazione su base volontaria delle famiglie inoltre potrebbe predisporre allo sviluppo di disuguaglianze in quanto quelle con problematiche socio-culturali specifiche potrebbero più facilmente o con più difficoltà accettare di rientrare nello screening portando ad una distorsione del campione. Il coinvolgimento di figure professionali specifiche come infermieri e psicologi riuscirà a ridurre il potenziale aumento del carico di ansia genitoriale fornendo ai soggetti interessati il tempo e il supporto necessario per adattarsi in modo migliore alla diagnosi?

In un periodo, inoltre, in cui il Sistema Sanitario Nazionale non gode di buona salute sarà essenziale uno sforzo economico ulteriore da parte dello Stato al fine di reperire il personale necessario allo svolgimento dello screening stesso, evitando un sovraccarico del personale già impiegato negli ospedali e sul territorio. Andranno regolamentati inoltre gli accessi ospedalieri dei soggetti che risulteranno positivi o che necessiteranno di follow-up specifico, sarà necessario sviluppare una esenzione apposita al fine di evitare che i costi gravino sulle tasche delle famiglie?

Un ulteriore punto che andrà valutato e discusso dagli esperti sarà la gestione terapeutica dell'iperglicemia

precoce nel DMT1 (stadio 2), in quanto bambini e ragazzi in questo stadio possono essere molto sensibili all'insulina.

### Monitoraggio degli individui a rischio

Il monitoraggio dei minori con autoanticorpi multipli, individuati dallo screening, richiede particolari attenzioni. Nella Figura 3 sono riportati in forma schematica i possibili risultati suddivisi per le diverse età previste dal progetto propedeutico. I colori del semaforo rappresentano il livello di attenzione che va dato al risultato dello screening. In tutti i casi in cui saranno presenti autoanticorpi sarà di importanza fondamentale l'educazione terapeutica e il supporto psicologico per il minore e la famiglia. Quando si comunica che un individuo, apparentemente sano, ha un'alta probabilità di ammalarsi di DMT1 il supporto dello psicologo è indispensabile.

La presenza di un solo autoanticorpo suggerisce che il rischio di evoluzione verso la forma clinica è basso; tuttavia, se la positività per lo stesso autoanticorpo persiste nel tempo la probabilità a 15 anni arriva al 45% (40).

Il monitoraggio di coloro che si trovano nello stadio 1 prevede la verifica semestrale degli autoanticorpi, il controllo random della glicemia, dell'HbA1c e il supporto psicologico. Ogni tre mesi è possibile un contatto telefonico da parte dell'infermiere del team per assicurarsi che non si presentino sintomi.

Infatti, i minori con due o più autoanticorpi che rifiutano il percorso di follow-up hanno la probabilità di esordio con DKA uguale alla popolazione che non è controllata con screening (9). Lo stadio 2 prevede visite più ravvicinate perché il rischio di evoluzione verso lo stadio 3 arriva al 50% già dopo due anni (41). In questi casi, il controllo con CGM permette di segnalare una elevata probabilità di progressione quando l'iperglicemia al di sopra della soglia di 140 mg/dl supera il 18% nelle 24 ore (42). Nello studio propedeutico l'uso dell'OGTT viene riservato a casi particolari in quando è più invasivo rispetto al CGM, richiede l'accesso ospedaliero nei piccoli pazienti.

### Impatto sul Sistema Sanitario

Lo screening di popolazione è in fase iniziale o di progettazione in molti paesi; pertanto, l'impatto sui sistemi sanitari è solo ipotizzabile sulle esperienze condotte su popolazioni limitate.

L'analisi dei dati riportati dallo studio Frída dimostra che se l'implementazione dello screening fosse esteso a tutta la Germania, mantenendosi la frequenza di casi presintomatici osservati negli ultimi venti anni, si avrebbe un aumento della richiesta di assistenza nei centri specialistici di circa il 60% e parallelamente ci si potrebbe attendere una riduzione dei costi del diabete legati alla riduzione delle complicanze (43).

Da questo deriva che l'impegno del sistema sanitario dovrà essere indirizzato a garantire personale adeguato nei centri di riferimento assicurandosi di adeguarlo all'aumento del fabbisogno previsto per l'aumento delle richieste. Sarà inoltre necessario avere la certificazione dei laboratori che doseranno gli AI a conferma della positività dello screening. Dal momento che la comunicazione del rischio di progressione verso la forma clinica di diabete avviene su un individuo apparentemente sano, è necessaria la massima attenzione e sicurezza nella conferma di positività.

Se la frequenza di autoanticorpi anti-insulina riscontrata dal progetto propedeutico fosse sovrapponibile a quella osservata nella Baviera, ci aspetteremmo due casi su 1000 nello stadio 1, due su 10.000 nello stadio 2 e due su 10.000 nello stadio 3 (28).

La valutazione degli effetti nel lungo periodo permetterà valutazioni più approfondite del rapporto costo/beneficio oltre che dei risultati in termini di qualità di vita dei bambini e delle famiglie.

### Registro clinico degli individui a rischio di diabete di tipo 1

L'avvio dello screening di popolazione e l'individuazione dei casi positivi suggerisce l'urgenza di istituire un registro clinico per il monitoraggio dei casi a rischio di DMT1. Il controllo prospettico e accurato dei casi in cui si sono rilevati uno o più AI sarà supporto di grande utilità per informare le persone a prevenire la DKA oltre che proporre nuovi trattamenti e opportunità di ricerca per la prevenzione del DMT1. Il registro sarà anche strumento per medici e operatori sanitari utile a fornire i consigli più idonei alle persone a rischio. Il registro sarà popolato con i dati che arrivano dall'Istituto Superiore di Sanità che organizza lo screening di popolazione e dovrà essere una struttura che raccoglie minori e adulti a rischio di DMT1. Inoltre, il registro clinico italiano permetterà collegamenti con altri registri internazionali per aumentare le conoscenze sulla fase presintomatica

del DMT1 e individuare i possibili sistemi di prevenzione. I dati del registro saranno anche fonte informativa basilare per la programmazione sanitaria nel nostro Paese.

## CONCLUSIONI

I programmi di screening e monitoraggio del DMT1 sulla popolazione pediatrica generale permetteranno di ridurre drasticamente la DKA e apriranno la strada alla prevenzione.

Sebbene oggi siano ipotizzabili interventi per ritardare la diagnosi di alcuni anni non è possibile escludere che il periodo senza segni clinici di diabete possa essere esteso nel tempo. Sono allo studio infatti diversi farmaci in grado di agire sulla catena di eventi che inducono il danno della beta-cellula. L'approvazione da parte della FDA del Teplizumab ha posto basi importanti per la gestione terapeutica futura di questa patologia. La diagnosi negli stadi pre-sintomatici potrebbe inoltre offrire ai bambini e alle loro famiglie l'opportunità di partecipare a studi clinici, con l'obiettivo di ritardare le manifestazioni cliniche della malattia. Il programma di screening nazionale approvato in Italia con la Legge n. 130 del 15 settembre 2023 ha in primis l'obiettivo di abbattere l'incidenza della DKA che è da sola causa di morbilità, mortalità e costi sanitari. È prevedibile che la diagnosi del DMT1 in fase presintomatica, comporti un aumento del carico assistenziale per i centri specialistici che avranno in cura i bambini a rischio e un impegno notevole per i pediatri del territorio che eseguono il prelievo capillare. D'altro canto, la riduzione della DKA alla diagnosi e il miglioramento del controllo metabolico produrranno una riduzione delle complicanze a lungo termine.

## BIBLIOGRAFIA

1. Libman I, Haynes A, Lyons S, Pradeep P, Rwagasor E, Tung JY, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2022 Dec; 23(8):1160-1174.
2. Tuomilehto J, Ogle GD, Lund-Blix NA, Stene LC. Update on Worldwide Trends in Occurrence of Childhood Type 1 Diabetes in 2020. *Pediatr Endocrinol Rev PER*. 2020 Mar; 17(Suppl 1):198-209.
3. Ogle GD, James S, Dabelea D, Pihoker C, Svensson J, Maniam J, 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.
4. Patterson CC, Harjutsalo V, Rosenbauer J, Neu A, Cinek O, Skrivarhaug T, et al. Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989-2013: a multicentre prospective registration study. *Diabetologia*. 2019 Mar; 62(3):408-417.
5. Flier JS, Underhill LH, Eisenbarth GS. Type I Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 1986 May 22; 314(21):1360-1368.
6. Sims EK, Besser REJ, Dayan C, Geno Rasmussen C, Greenbaum C, Griffin KJ, et al. Screening for Type 1 Diabetes in the General Population: A Status Report and Perspective. *Diabetes*. 2022 Apr 1; 71(4):610-623.
7. Cherubini V, Chiarelli F. Autoantibody test for type 1 diabetes in children: are there reasons to implement a screening program in the general population? A statement endorsed by the Italian Society for Paediatric Endocrinology and Diabetes (SIEDP-ISPED) and the Italian Society of Paediatrics (SIP). *Ital J Pediatr*. 2023 Jul 19; 49(1):87.
8. Glaser N, Fritsch M, Priyambada L, Rewers A, Cherubini V, Estrada S, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar state. *Pediatr Diabetes*. 2022 Nov; 23(7):835-856.
9. Cherubini V, Grimsmann JM, Åkesson K, Birkebaek NH, Cinek O, Dovč K, et al. Temporal trends in diabetic ketoacidosis at diagnosis of paediatric type 1 diabetes between 2006 and 2016: results from 13 countries in three continents. *Diabetologia*. 2020 Aug; 63(8):1530-1541.
10. Birkebaek NH, Kamrath C, Grimsmann JM, Aakesson K, Cherubini V, Dovc K, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on long-term trends in the prevalence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of paediatric type 1 diabetes: an international multicentre study based on data from 13 national diabetes registries. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2022 Nov; 10(11):786-794.
11. Aye T, Mazaika PK, Mauras N, Marzelli MJ, Shen H, Hershey T, et al. Impact of Early Diabetic Ketoacidosis on the Developing Brain. *Diabetes Care*. 2019 Mar 1; 42(3):443-449.

12. Shrestha SS, Zhang P, Barker L, Imperatore G. Medical Expenditures Associated With Diabetes Acute Complications in Privately Insured U.S. Youth. *Diabetes Care*. 2010 Dec 1; 33(12):2617-2622.
13. Vanelli M, Chiari G, Ghizzoni L, Costi G, Giacalone T, Chiarelli F. Effectiveness of a prevention program for diabetic ketoacidosis in children. An 8-year study in schools and private practices. *Diabetes Care*. 1999 Jan 1; 22(1):7-9.
14. Hummel S, Carl J, Friedl N, Winkler C, Kick K, Stock J, et al. Children diagnosed with presymptomatic type 1 diabetes through public health screening have milder diabetes at clinical manifestation. *Diabetologia*. 2023 Sep; 66(9):1633-1642.
15. Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, Chiang JL, Dabelea D, Gottlieb PA, et al. Staging Presymptomatic Type 1 Diabetes: A Scientific Statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2015 Oct 1; 38(10):1964-1974.
16. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes*. 2017 Feb 1; 66(2):241-255.
17. Besser REJ, Bell KJ, Couper JJ, Ziegler A, Wherrett DK, Knip M, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: Stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2022 Dec; 23(8):1175-1187.
18. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, et al. Seroconversion to Multiple Islet Autoantibodies and Risk of Progression to Diabetes in Children. *JAMA*. 2013 Jun 19; 309(23):2473.
19. Dayan CM, Korah M, Tatovic D, Bundy BN, Herold KC. Changing the landscape for type 1 diabetes: the first step to prevention. *The Lancet*. 2019 Oct; 394(10205):1286-1296.
20. Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, et al. HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk. *Diabetes*. 2008 Apr 1; 57(4):1084-1092.
21. Redondo MJ, Steck AK, Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2018 May; 19(3):346-353.
22. Oram RA, Redondo MJ. New insights on the genetics of type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2019 Aug; 26(4):181-187.
23. Sharp SA, Rich SS, Wood AR, Jones SE, Beaumont RN, Harrison JW, et al. Development and Standardization of an Improved Type 1 Diabetes Genetic Risk Score for Use in Newborn Screening and Incident Diagnosis. *Diabetes Care*. 2019 Feb 1; 42(2):200-207.
24. TEDDY Study Group. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec; 1150(1):1-13.
25. Pöllänen PM, Ryhänen SJ, Toppari J, Ilonen J, Vähäsalo P, Veijola R, et al. Dynamics of Islet Autoantibodies During Prospective Follow-Up From Birth to Age 15 Years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Dec 1; 105(12):e4638-51.
26. Steck AK, Dong F, Geno Rasmussen C, Bautista K, Sepulveda F, Baxter J, et al. CGM Metrics Predict Imminent Progression to Type 1 Diabetes: Autoimmunity Screening for Kids (ASK) Study. *Diabetes Care*. 2022 Feb 1; 45(2):365-371.
27. JDRF. T1Detect: Learn About Type 1 Diabetes Risk Screening. 2024. T1Detect: Learn About Type 1 Diabetes Risk Screening. Available from: <https://www.jdrf.org/t1d-resources/t1detect/>.
28. Ziegler AG, Kick K, Bonifacio E, Haupt F, Hippich M, Dunstheimer D, et al. Yield of a Public Health Screening of Children for Islet Autoantibodies in Bavaria, Germany. *JAMA*. 2020 Jan 28; 323(4):339.
29. Legge 15 settembre 2023, n. 130 Disposizioni concernenti la definizione di un programma diagnostico per l'individuazione del diabete di tipo 1 e della celiachia nella popolazione pediatrica. (23G00140) (GU Serie Generale n. 226 del 27-09-2023). Sep 27, 2023.
30. Herold KC, Gitelman SE, Gottlieb PA, Knecht LA, Raymond R, Ramos EL. Teplizumab: A Disease-Modifying Therapy for Type 1 Diabetes That Preserves  $\beta$ -Cell Function. *Diabetes Care*. 2023 Oct 1; 46(10):1848-1856.
31. Herold KC, Bundy BN, Long SA, Bluestone JA, DiMeglio LA, Dufort MJ, et al. An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. *N Engl J Med*. 2019 Aug 15; 381(7):603-613.
32. Duca LM, Reboussin BA, Pihoker C, Imperatore G, Saydah S, Mayer-Davis E, et al. Diabetic ketoacidosis at diagnosis of type 1 diabetes and glycemic control over time: The SEARCH for diabetes in youth study. *Pediatr Diabetes*. 2019 Mar; 20(2):172-179.
33. Whittemore R, Jaser S, Chao A, Jang M, Grey M. Psychological Experience of Parents of Children With Type 1 Diabetes: A Systematic Mixed-Studies Review. *Diabetes Educ*. 2012 Jul; 38(4):562-579.

34. Smith LB, Liu X, Johnson SB, Tamura R, Elding Larsson H, Ahmed S, et al. Family adjustment to diabetes diagnosis in children: Can participation in a study on type 1 diabetes genetic risk be helpful? *Pediatr Diabetes*. 2018 Aug; 19(5):1025-1033.
35. Parikka V, Nääntö-Salonen K, Saarinen M, Simell T, Ilonen J, Hyöty H, et al. Early seroconversion and rapidly increasing autoantibody concentrations predict prepubertal manifestation of type 1 diabetes in children at genetic risk. *Diabetologia*. 2012 Jul; 55(7):1926-1936.
36. Ghalwash M, Dunne JL, Lundgren M, Rewers M, Ziegler AG, Anand V, et al. Two-age islet-autoantibody screening for childhood type 1 diabetes: a prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2022 Aug; 10(8):589-596.
37. Chmiel R, Giannopoulou EZ, Winkler C, Achenbach P, Ziegler AG, Bonifacio E. Progression from single to multiple islet autoantibodies often occurs soon after seroconversion: implications for early screening. *Diabetologia*. 2015 Feb; 58(2):411-413.
38. Ziegler AG, Haupt F, Scholz M, Weininger K, Wittich S, Löbner S, et al. 3 Screen ELISA for High-Throughput Detection of Beta Cell Autoantibodies in Capillary Blood. *Diabetes Technol Ther*. 2016 Nov; 18(11):687-693.
39. Istituto Superiore di Sanità [Internet]. 2024. D1Ce screen. Available from: <https://www.iss.it/d1ce-legge-sullo-screening>.
40. Frohnert BI, Ghalwash M, Li Y, Ng K, Dunne JL, Lundgren M, et al. Refining the Definition of Stage 1 Type 1 Diabetes: An Ontology-Driven Analysis of the Heterogeneity of Multiple Islet Autoimmunity. *Diabetes Care*. 2023 Oct 1; 46(10):1753-1761.
41. Weiss A, Zapardiel-Gonzalo J, Voss F, Jolink M, Stock J, Haupt F, et al. Progression likelihood score identifies substages of presymptomatic type 1 diabetes in childhood public health screening. *Diabetologia*. 2022 Dec; 65(12):2121-2131.
42. Steck AK, Dong F, Taki I, Hoffman M, Simmons K, Frohnert BI, et al. Continuous Glucose Monitoring Predicts Progression to Diabetes in Autoantibody Positive Children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 Aug 1; 104(8):3337-3344.
43. Bonifacio E, Winkler C, Achenbach P, Ziegler AG. Effect of population-wide screening for presymptomatic early-stage type 1 diabetes on paediatric clinical care. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2024 Jun; 12(6):376-378.

# Alimenti e prevenzione delle malattie cardiovascolari

## *Nutrition and cardiovascular disease*

Olga Vaccaro, Annalisa Giosuè, Marilena Vitale

Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia,  
Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildiaz402b>

### ABSTRACT

*We review the evidence for food choices aimed at reducing cardiovascular disease (CVD). Low consumption of red meat, processed meat, and salt and increased intake of plant-based foods – whole grains, fruits, vegetables, legumes, and nuts – are linked with reduced CV risk. The same applies for the replacement of animal and tropical fats with olive oil and polyunsaturated fat rich oils. Moderate consumption of wine, coffee and tea is associated with a reduced CV risk, whereas soft drinks substantially increase CV risk. New data support the replacement of high glycemic index (GI) foods with whole grains and low GI foods, and a moderate consumption of fermented dairy as appropriate choices for the reduction of CVD.*

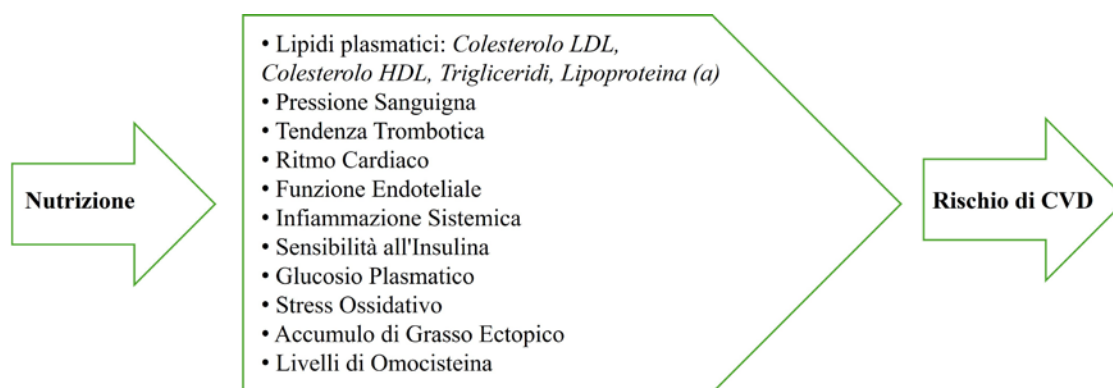
### KEYWORDS

*Coronary heart disease, cardiovascular disease, prevention, nutrition, food choices.*

Le malattie cardiovascolari (CVD) rimangono tra le prime cause di mortalità e morbilità e sono in aumento nei paesi emergenti. La relazione tra nutrizione e CVD è stata ampiamente studiata nell'ultimo secolo e, anche se molti aspetti rimangono da chiarire, è tuttavia evidente che la dieta abituale è tra i principali fattori che modulano il rischio cardiovascolare (1). Inizialmente l'attenzione è stata attratta dalla relazione tra grassi della dieta e lipidi plasmatici, ma successivamente si è compreso che la

composizione della dieta modula il rischio di malattia cardiovascolare arteriosclerotica attraverso molteplici effetti sui maggiori fattori di rischio, i.e. pressione arteriosa, ritmo cardiaco, coagulazione, omeostasi glicemica ed insulino-resistenza, stress ossidativo, infiammazione subclinica, funzione endoteliale, microbioma ecc. (Fig. 1) (2). La ricerca sulla relazione tra dieta e salute ha spostato sempre di più l'attenzione dai nutrienti della dieta agli alimenti ed ai modelli alimentari (3). Questo è giustificato dal fatto che la forma fisica degli alimenti (matrice), la specifica combinazione tra macro/micronutrienti e composti bioattivi non-nutrienti ha un ruolo importante nel determinare gli effetti metabolici e l'impatto sulla salute, al di là della composizione in nutrienti. Inoltre, altri fattori come la combinazione degli alimenti nel pasto, i metodi di cottura ed i processi industriali a cui sono sottoposti, possono modulare la biodisponibilità di nutrienti e composti bioattivi ed i loro effetti metabolici. Questo approccio presenta anche l'indubbio vantaggio di facilitare la comunicazione e la traduzione dei risultati della ricerca in raccomandazioni cliniche fruibili da personale medico non specializzato e dal pubblico laico. In questo articolo saranno esaminate le recenti evidenze sulla relazione tra alimenti/gruppi alimentari ed incidenza e mortalità per cardiopatia ischemica (CHD) o malattie cardiovascolari (CVD), le più comuni e severe manifestazioni della arteriosclerosi.



**Figura 1** ♦ Meccanismi biologici intermedi che mediano la relazione tra dieta e malattie cardiovascolari (CVD). Mod. da (2)

### ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE

**Legumi** - Molte, anche se non tutte, metanalisi di studi prospettici mostrano una relazione inversa tra consumo di legumi e incidenza di CHD (4-5). Prendendo come riferimento la categoria di non-consumo, un consumo di circa 100g di legumi a settimana (una porzione) si associa ad una riduzione del 9% della incidenza di CHD (4), l'effetto protettivo aumenta con la quantità di legumi consumata con una riduzione del rischio di circa il 14% per un consumo di 400g a settimana (quattro porzioni) (4-5). I risultati sono qualitativamente simili per l'incidenza di eventi CV; mentre nessuna relazione significativa è riportata con la mortalità per CHD o CVD (4). Una recente revisione sistematica ha riportato una significativa riduzione del rischio CV per una sostituzione di circa 50g di carne rossa o processata con circa 125g di legumi (6). L'effetto protettivo dei legumi è supportato anche da altre linee di evidenza. I legumi, oltre all'alto contenuto proteico, sono una fonte di fibre viscosi che hanno documentati effetti benefici sui lipidi plasmatici e sulla risposta glicemica ed insulinemica post-prandiale (7); inoltre, sono ricchi di micronutrienti (potassio, magnesio e folati) e di composti fenolici che hanno documentati effetti benefici su molti fattori di rischio cardiovascolare. Diversi studi controllati e randomizzati hanno dimostrato che il consumo di legumi si associa ad una riduzione del colesterolo LDL, della apolipoproteina B, un marcatore di rischio CV, della glicemia e della emoglobina glicata, della insulino-sensibilità, della pressione arteriosa, e dei marcatori della infiammazione (5). Una ulteriore considerazione riguarda l'impatto ambientale. I legumi sono una fonte proteica sostenibile in quanto la produzione si associa ad un basso

livello di emissione di gas serra e di bassa impronta idrica ed arricchiscono il suolo attraverso la fissazione dell'azoto riducendo l'uso di fertilizzanti. Alla luce di queste evidenze, un consumo di legumi fino a quattro porzioni a settimana, cioè maggiore di quanto attualmente raccomandato dalle società di cardiologia (8-9), dovrebbe essere incoraggiato; in particolare se i legumi sono utilizzati in sostituzione della carne rossa e processata e di alimenti ad alto indice glicemico, ricchi di amidi e zuccheri, che, al contrario, si associano ad un aumento del rischio CV.

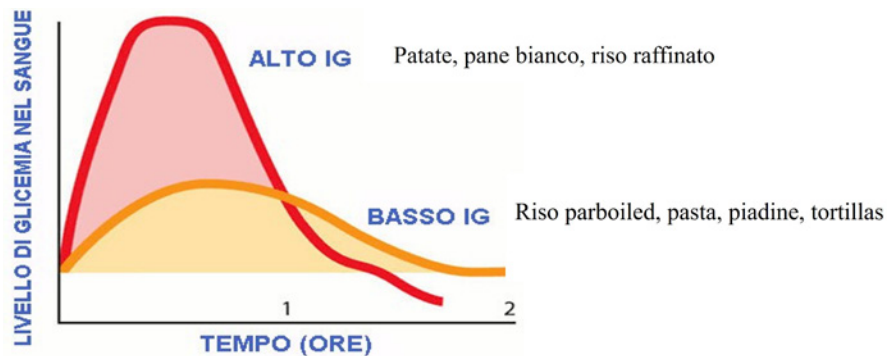
**Frutta e verdura** - Dalla maggior parte degli studi di coorte emerge una relazione inversa tra consumo di frutta e verdura ed incidenza di eventi cardiovascolari fatali e non fatali (4, 10-11). Un elevato consumo di verdure (quintile più alto) rispetto ad uno scarso consumo di questi alimenti (quintile più basso) si associa ad una riduzione di incidenza di CHD tra 8% e 18% con una riduzione massima del 21% per un consumo di circa 400g al giorno (due porzioni) e ad una riduzione fino al 34% della mortalità per CHD, i dati sono simili per CVD (4, 10-11). Tuttavia, questo effetto benefico non è condiviso da alcuni vegetali ricchi di amido e con elevato indice glicemico come ad esempio le patate. Anche il consumo di frutta fresca è associato ad una riduzione importante della incidenza e mortalità per CHD e CVD, ma i dati presentano una maggiore eterogeneità. Le più recenti ed esaustive metanalisi indicano che un consumo di circa 400g al giorno di frutta fresca (due porzioni al giorno) si associa ad una riduzione del 10% della incidenza e 21% della mortalità per CHD. Queste quantità si associano anche con una riduzione del 21% della incidenza di CVD e del 32% della mortalità per CVD (4, 10-11). Effetti protettivi sono anche riportati per i succhi di sola frutta,

ma si perdono se si consumano succhi di frutta addizionati di zucchero, o frutta in scatola o sciroppata; alimenti che invece sono associati ad un aumento documentato del rischio cardiovascolare (3-4, 12). Le persone che consumano una dieta ricca di frutta e verdura spesso hanno uno stile di vita salutare, per esempio più probabilmente sono non fumatori, praticano esercizio fisico ecc. e questo potrebbe confondere l'interpretazione dei risultati degli studi di osservazione, tuttavia, ci sono diversi meccanismi biologicamente plausibili che supportano il ruolo protettivo del consumo di frutta e verdura. Frutta e verdure sono ricche di fibre solubili ed insolubili che hanno un ruolo documentato nel migliorare i maggiori fattori di rischio cardiovascolare (i.e. lipidi, glucosio, insulino-sensibilità) sia a digiuno, che nella fase post-prandiale (7). Inoltre, sono ricche di potassio e povere di sodio ed il rapporto potassio/sodio della dieta è stato consistentemente associato a livelli più bassi di pressione arteriosa, un maggiore fattore di rischio CV. Infine, frutta e verdura sono ricche di polifenoli il cui consumo ha effetti antiossidanti, migliora l'omeostasi glicemica, riduce i lipidi plasmatici e l'infiammazione sistemica ed interagisce con il microbiota intestinale favorendo lo sviluppo di ceppi batterici con effetti metabolici positivi (13-14). Sulla base di queste evidenze si può raccomandare il consumo quotidiano di due porzioni di circa 200g rispettivamente di frutta e di verdure come una misura efficace per la prevenzione delle malattie CV.

**Cereali** - Sono i maggiori costituenti della dieta ed includono numerosi ed eterogenei alimenti. Dal punto di vista nutrizionale si possono identificare tre maggiori categorie: cereali raffinati con elevato indice glicemico (ad esempio pane bianco e riso bianco), cereali raffinati con basso indice glicemico (per esempio pasta, riso parboiled, tortillas), cereali integrali. Questi alimenti differiscono per la velocità di digestione ed assorbimento dei carboidrati in essi contenuti che, a sua volta, modula la risposta metabolica. Questa caratteristica viene misurata dall'indice glicemico (GI) che è appunto la misura standardizzata della velocità e della entità della risposta glicemica a 50g di carboidrati consumati sotto forma di specifici alimenti (Fig. 2) (15). Il GI è basso se <55, intermedio se tra 56 e 69, alto se >=70. La quantità di cereali consumata moltiplicata per l'indice glicemico degli alimenti viene definita carico glicemico. Diverse metanalisi di studi prospettici riportano un aumento del rischio cardiovascolare con l'aumento dell'indi-

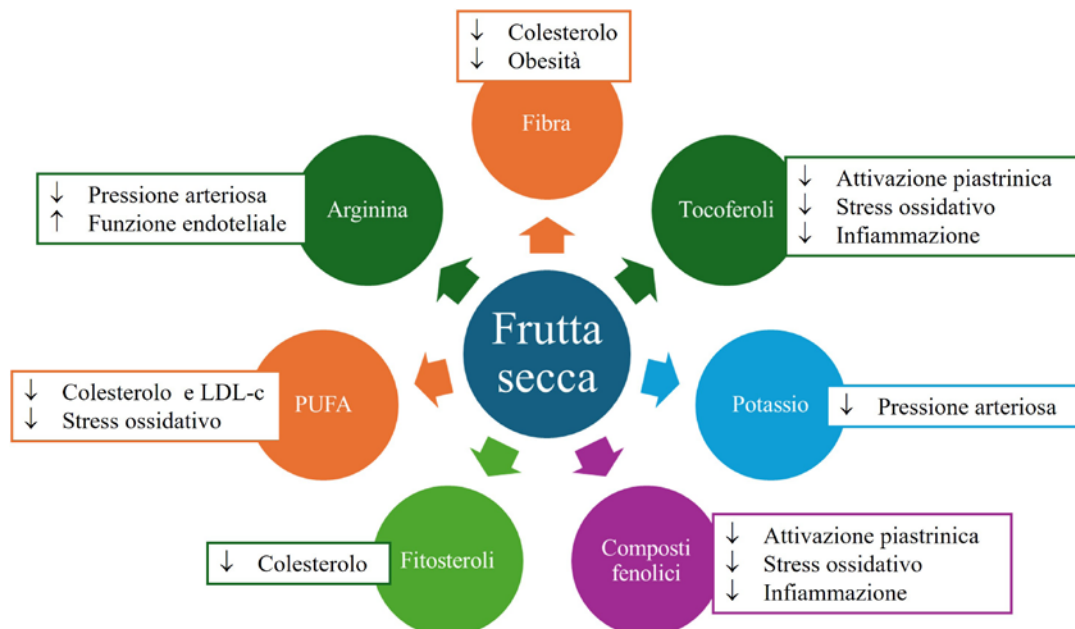
ce glicemico della dieta, il ruolo del carico glicemico è più discusso. Un recente studio condotto su 137.851 partecipanti di diversi continenti con un follow-up medio di 9,5 anni riporta un aumento del rischio di eventi CV fatali e non fatali del 21% nelle persone senza precedenti eventi e del 51% nelle persone con precedenti eventi (16) associato a diete ad alto indice glicemico rispetto a diete a basso indice glicemico (i.e. quintile più alto verso quintile più basso). Un consumo giornaliero di circa 98g di cereali ad alto indice glicemico si associa ad un aumento del 66% del rischio di CHD (17). Gli effetti negativi degli alimenti ad alto indice glicemico sono in larga parte la conseguenza del rapido assorbimento dei carboidrati in essi contenuti che induce un rapido ed elevato picco glicemico post-prandiale che, a sua volta, influenza altre vie metaboliche (risposta insulinemica, lipidi, insulino-sensibilità, stress ossidativo ecc.) in senso pro-aterogeno (18). Per quanto riguarda i cereali integrali (pane integrale, riso integrale, farro, orzo, avena ecc.) consistenti evidenze indicano che il loro consumo è associato ad una riduzione del rischio di CHD tra il 26% ed il 34%; una riduzione significativa di circa 8% è già osservabile per un consumo giornaliero di circa 30g. Gli effetti protettivi sono mediati dal miglioramento di molteplici fattori di rischio come insulino-sensibilità, lipidi, infiammazione, stress ossidativo e sono dovuti in larga parte al contenuto in fibre insolubili che raggiungendo il colon indigerite, vengono degradate dai batteri intestinali producendo acidi grassi a catena corta (acetato, butirrato, propionato) con effetti benefici sul metabolismo glucidico e lipidico (7, 19). Pertanto, per la prevenzione delle malattie CV è appropriato consumare con moderazione cereali raffinati ed altri alimenti ad alto indice glicemico, limitando il consumo a due porzioni a settimana e dando la preferenza a cereali raffinati a basso indice glicemico e cereali integrali che dovrebbero essere consumati quotidianamente.

**Frutta secca con guscio** - La frutta secca è molto nutriente ed è stata consumata dall'uomo fin da tempi antichissimi. In questo gruppo alimentare sono compresi diversi frutti e semi, quelli più comunemente consumati sono mandorle, noci, nocciole, anacardi, arachidi, noci del Brasile, pistacchi, pinoli, noci di macadamia. Le evidenze disponibili sono concordi nel documentare un effetto protettivo del consumo abituale di frutta secca sulla incidenza e mortalità per malattie cardiovascolari. Metanalisi di studi prospettici hanno dimostrato che il consumo abi-

**Figura 2** ◆ Indice Glicemico (IG) di diversi alimenti

tuale di frutta secca sia associa ad una riduzione del 19% e 25% di incidenza e mortalità per CVD rispettivamente, e ad una riduzione del 24% e 27% della incidenza e mortalità per CHD. Ci sono anche evidenze, sebbene meno numerose, di un effetto protettivo verso lo stroke e la fibrillazione atriale (4, 21). In una metanalisi di studi prospettici che ha valutato la relazione dose-risposta il consumo abituale di 28g di noci si associa ad una riduzione media del 25 % della incidenza di CHD, i dati su CVD sono simili (4). Nello studio PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterranea), uno studio di intervento randomizzato, 7000 persone ad alto rischio cardiovascolare sono state assegnate ad una dieta mediterranea con aggiunta di olio di oliva extrav-

gine (EVO), oppure frutta secca, oppure ad una dieta di controllo ridotta in grassi. Rispetto al gruppo di controllo il gruppo assegnato a frutta secca ha sperimentato, in cinque anni di osservazione, una riduzione del 30% della incidenza di eventi cardiovascolari, simile a quella osservata nel gruppo assegnato alla aggiunta di EVO (22). Per quanto riguarda i possibili meccanismi, studi in vitro ed in vivo hanno documentato che la frutta secca, oltre ad essere una fonte di fibre, i cui effetti sono stati già discussi (7), contiene una varietà di altre sostanze (acidi grassi polinsaturi, composti fenolici, minerali e vitamine) che hanno effetti benefici documentati sui maggiori fattori di rischio CV, sulla funzione endoteliale, lo stress ossidativo

**Figura 3** ◆ Principali componenti bioattivi della frutta secca con proprietà protettive sul rischio cardiovascolare. Mod. da (21)

e l'infiammazione (Fig. 3). Il contenuto di questi componenti varia a seconda dei diversi frutti e può subire modifiche con la conservazione ed i processi industriali che ne riducono la biodisponibilità (21). Entrare nei dettagli è al di là dello scopo di questa rassegna. Al momento, il consumo abituale di una manciata (circa 30g) di frutta secca mista, non salata, è una misura raccomandata per la prevenzione primaria e secondaria delle malattie CV (8-9).

### Alimenti di origine animale

**Carne** - La relazione tra consumo di carne e CHD è stata esplorata da due metanalisi di studi prospettici, entrambe indicano un eccesso di rischio di eventi coronarici fatali e non fatali associato al consumo abituale di carne. Per ogni aumento di 100g al giorno nel consumo di carne il rischio di CHD aumenta del 25% ed un incremento significativo è riportato anche per l'incidenza di CVD, mentre non si osserva nessuna relazione significativa con la mortalità per CHD/CVD (4). In questi lavori c'è una forte eterogeneità tra gli studi analizzati legata principalmente al fatto che non si fa distinzione tra i vari tipi di carne. La carne dal punto di vista nutrizionale è classificata come rossa (vitello, maiale, montone) o bianca (pollo, tacchino, coniglio), inoltre le carni possono essere consumate fresche o processate. Le principali caratteristiche nutrizionali dei diversi tipi di carne sono riportate in tabella 1. Inoltre, i metodi di cottura sono differenti per i diversi tipi di carne. Tutte queste differenze hanno una ricaduta sul profilo di rischio

cardiovascolare e l'occorrenza di eventi; pertanto, è necessario rivedere le evidenze relative ai diversi tipi di carne.

Per le carni processate due su tre metanalisi di studi prospettici indicano un aumento del rischio di CHD, il consumo giornaliero di una porzione di 50g si associa ad un aumento della incidenza di CHD tra il 27% ed il 44%. Una terza metanalisi non riporta relazione significativa con la incidenza di cardiopatia ischemica, ma riporta un aumento della mortalità cardiovascolare associato ad un elevato consumo di carne processata, in linea con altre tre metanalisi che hanno guardato alla mortalità CV (4). Il rischio relativo per un consumo alto verso un consumo basso (quintile 5 verso quintile 1) varia tra 1,02 e 1,27.

I dati relativi alla carne rossa non processata sono meno concordi, su tre metanalisi che esplorano la relazione con CHD, solo una riporta un aumento significativo del 27% della incidenza di CHD per un consumo quotidiano di circa 100g, le altre due non riportano nessuna associazione. Se si guarda agli esiti cardiovascolari nel loro complesso, tuttavia, le tre metanalisi concordemente riportano un aumento significativo della mortalità CV per un consumo giornaliero di 100g di carne rossa. In linea con questi dati, altri studi riportano una riduzione significativa del rischio CV se si riduce il consumo di carne rossa di tre porzioni a settimana. In questo contesto è anche utile ricordare che gli studi che hanno valutato l'effetto della sostituzione di carne rossa con alimenti proteici di origine vegetale (legumi, frutta secca, cereali integrali) o derivati

**Tabella 1** ♦ **Composizione nutrizionale (espressa per 100g) di diverse tipologie di carne**

	Carne rossa	Carne processata	Carne bianca
<b>Energia (Kcal)</b>	127	385	100
<b>Proteine (g)</b>	20.5	25.4	23.3
<b>Lipidi (g)</b>	5.0	31.0	0.8
<i>Acidi grassi saturi (g)</i>	1.94	10.47	0.3
<i>Acidi grassi monoinsaturi (g)</i>	1.9	14.5	0.22
<i>Acidi grassi polinsaturi (g)</i>	1.15	3.0	0.3
<b>Colesterolo (mg)</b>	71	104	60
<b>Carboidrati (g)</b>	0	0	0
<b>Sodio (mg)</b>	41	1560	33
<b>Potassio (mg)</b>	330	657	370
<b>Magnesio (mg)</b>	20	21	32
<b>Ferro (mg)</b>	1.9	1.2	0.4

Banca dati di composizione degli alimenti, CREA

del latte, hanno documentato una riduzione significativa del rischio cardiovascolare (23). Per la carne bianca gli studi sono meno numerosi e più eterogenei; recenti metanalisi di studi prospettici riportano una associazione neutra con incidenza o mortalità per CHD/CVD (24-25).

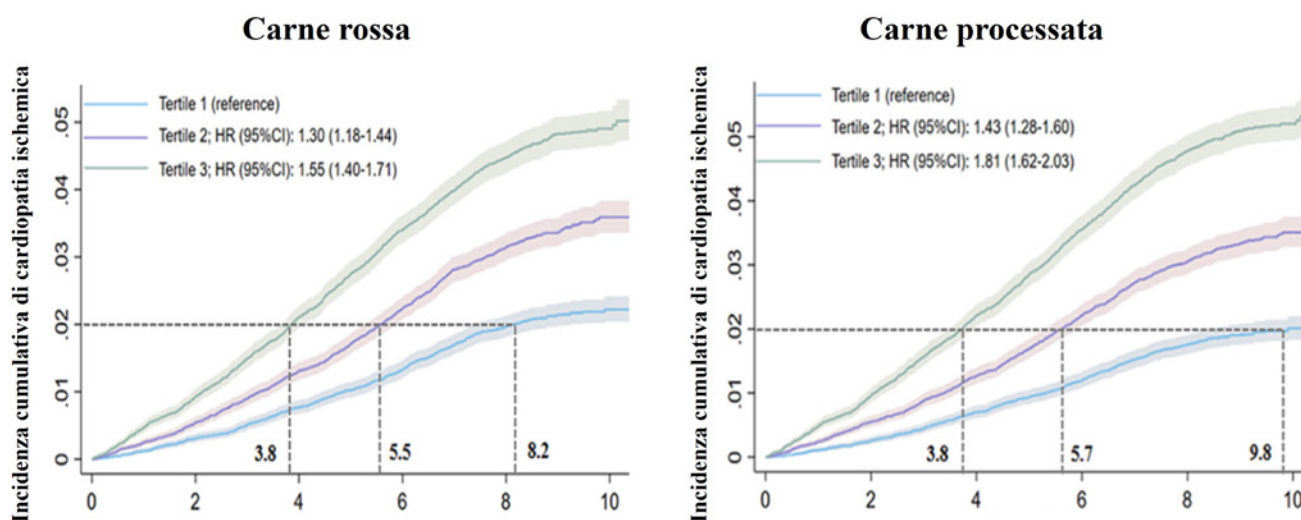
Per quanto riguarda la plausibilità biologica di questi dati occorre considerare che la carne bianca, rispetto alla carne rossa, a parità di peso è caratterizzata da minore contenuto di colesterolo, acidi grassi saturi e ferro eme (Tab. 1) che sono tutti associati ad aumento del rischio cardiovascolare. Inoltre, le carni processate, rispetto a quelle non processate, contengono più calorie, più colesterolo e più grassi saturi e naturalmente sale, nitrati ed altri additivi necessari per la conservazione (Tab. 1) che hanno effetti negativi ben documentati, soprattutto il sale, su omeostasi pressoria, insulino-sensibilità e funzione endoteliale. Studi recenti di metabolomica hanno identificato specifici marcatori del consumo di carne rossa e processata, la maggior parte riguarda lipidi e lipoproteine, ma anche aminoacidi aromatici e ramificati e trimetilmanina (26-27). Un recente studio condotto su una biobanca del Regno Unito ha documentato la relazione tra la concentrazione plasmatica di questi marcatori e l'incidenza di cardiopatia ischemica (27); individui nel tertile più alto, rispetto ad individui nel tertile più basso presentavano un aumento dell'incidenza di CHD di 55% e 81% rispettivamente per la carne rossa e la carne processata (Fig. 4). Per quanto questi dati non facciano

piena luce sui meccanismi molecolari attraverso cui il consumo di carni rosse e processate promuove l'aterogenesi, tuttavia forniscono supporto all'ipotesi di una relazione causa effetto.

In conclusione, le carni processate dovrebbero essere consumate occasionalmente; per le carni rosse non processate le evidenze sono meno stringenti, ma nel complesso suggeriscono che il consumo dovrebbe essere limitato a due porzioni a settimana. Carni bianche, derivati del latte, ed alimenti vegetali (principalmente legumi, ma anche frutta secca e cereali integrali) dovrebbero essere usati quotidianamente come fonti proteiche alternative più salutari e più ecosostenibili.

*Pesce* - Un consumo moderato di pesce è significativamente associato ad una ridotta incidenza e mortalità per malattie coronariche e CV in diverse metanalisi di studi prospettici (4, 28). Tuttavia, c'è una significativa eterogeneità tra gli studi analizzati, e questo, insieme ad altre evidenze, suggerisce la possibilità che la relazione con le malattie cardiovascolari possa variare con il tipo di pesce e/o con le procedure di cottura utilizzate in diverse aree geografiche e contesti culturali (28-30). Per quanto riguarda le quantità, una metanalisi dose-risposta di 15 studi di coorte riporta una riduzione del 12% nell'incidenza di CHD per un consumo di 4 porzioni di pesce a settimana (circa 100g al giorno) altri studi indicano che anche un consumo inferiore (100-150g a settimana) si associa ad

**Figura 4** ♦ Relazione tra la concentrazione plasmatica (tertili) di metaboliti di carne rossa o processata ed incidenza di cardiopatia ischemica



effetti protettivi statisticamente significativi anche se di minore entità (riduzione del 4-7% del rischio di CHD). Per un consumo superiore a 3-4 porzioni/settimana i dati sono meno chiari, una metanalisi di Jayedi riporta una relazione ad U suggerendo che per consumi alti la relazione possa spostarsi verso una associazione neutra o addirittura verso un aumento del rischio (29). Questo dato non si conferma in una successiva metanalisi che riporta una relazione lineare e inversa con gli eventi coronarici per un consumo di pesce al di sopra di 40g al giorno. I benefici del consumo di pesce sono attribuiti principalmente al contenuto di acidi grassi polinsaturi omega-3 che contribuiscono a controllare i trigliceridi plasmatici e l'infiammazione ed hanno proprietà antitrombotiche. Il contenuto in omega-3 è particolarmente elevato nel pesce grasso (pesce azzurro) e ci sono evidenze che i benefici cardiovascolari associati al consumo di pesce siano in larga parte da attribuire al consumo di pesci grassi (31). In sintesi, i dati indicano che consumare due/quattro porzioni di 150g di pesce a settimana riduce il rischio cardiovascolare. Per assunzioni più elevate sono emerse incoerenze che vanno chiarite approfondendo il ruolo di modalità di cottura, tipologia di pesce e contesti culturali associati al consumo di pesce. Per il momento, considerato anche l'impatto ecologico del consumo di pesce e l'evidenza favore del pesce grasso, è appropriato consigliare un consumo di due-quattro porzioni a settimana, privilegiando pesce azzurro di piccola taglia.

*Uova* - Diverse, anche se non tutte, le metanalisi di studi prospettici indicano che un consumo moderato di uova (uno al giorno) non si associa ad un aumento significativo del rischio di CHD/CVD, tuttavia la relazione dose-risposta non è lineare ed il rischio può aumentare per un consumo maggiore (4, 32). Le uova sono un alimento molto nutriente, contengono tutti gli aminoacidi essenziali, ma anche vitamine e minerali ed hanno un basso costo. La cautela nel consumo raccomandata per il passato nasce dal fatto che le uova sono ricche in colesterolo ed il loro consumo può contribuire ad innalzare la colesterolemia, il maggiore fattore di rischio CV. Tuttavia, la risposta al colesterolo della dieta è molto variabile ed in larga parte sotto il controllo genetico, le persone responsive presentano una insufficiente inibizione della sintesi endogena di colesterolo quando esposti ad una dieta ricca di colesterolo. Nella maggior parte delle persone che rispondo nor-

malmente, l'incremento della colesterolemia in risposta a 300-600mg di colesterolo introdotto con la dieta (il corrispondente di due uova) tre volte a settimana è modesto. Molti, ma non tutti, gli studi di osservazione ed i trials controllati e randomizzati che hanno valutato l'impatto del consumo di uova sui maggiori fattori di rischio CV, principalmente i lipidi plasmatici, non riportano un aumento della colesterolemia e degli altri fattori di rischio CV (pressione arteriosa, peso corporeo) in risposta ad un consumo moderato di uova (4, 32). L'apparente eterogeneità dei risultati di questi studi può essere spiegata da altre caratteristiche della dieta come contenuto di fibre e di grassi saturi. Le uova sono ricche in colesterolo, ma povere in grassi saturi e vengono consumate in contesti differenti: nei paesi asiatici sono generalmente consumate in pasti ricchi in vegetali e poveri in grassi saturi, mentre negli Stati Uniti e nell'Est Europa sono generalmente consumate insieme ad alimenti ricchi di grassi saturi e sale (burro, formaggi, latte) o carni processate (bacon, salsiccia ecc.). La combinazione con questi ultimi, piuttosto che il consumo di uova di per sé, può mediare l'aumento dei lipidi plasmatici e del rischio CV riportato in alcuni studi, soprattutto quelli condotti negli Stati Uniti. Pertanto, un consumo moderato di uova (fino ad uno al giorno) nel contesto di una dieta complessivamente povera di grassi saturi e ricca di fibre può essere consentito. Maggiore cautela occorre nelle persone con elevato rischio cardiovascolare, dislipidemia o con diabete.

*Latte e derivati* - Un elevato apporto di grassi saturi (SFA) è associato ad un aumento del rischio di malattie cardiovascolari mediato principalmente, dall'aumento del colesterolo plasmatico e dai suoi effetti aterogeni. Le principali società di cardiologia raccomandano che l'apporto energetico derivante dagli SFA non superi il 10% del totale (8-9). In questo contesto latte e derivati meritano attenzione perché sono una fonte importante di grassi saturi, largamente consumati in tutto il mondo (circa un quinto del totale negli Stati Uniti, 17-41% in Europa). Questo gruppo alimentare include prodotti con caratteristiche nutrizionali diverse che riguardano il contenuto di grassi, ma anche di altri nutrienti, il sale ed i metodi di preparazione (pastorizzazione, fermentazione, ecc.), tutti fattori che possono modulare l'impatto sulla salute cardiovascolare; pertanto, saranno riviste brevemente le evidenze relative ai singoli alimenti.

Per quanto riguarda il latte i dati nel complesso indicano una associazione neutra con eventi coronarici o cardiovascolari fatali e non fatali per un consumo fino a 200ml al giorno (4, 33). Per i prodotti fermentati (latte fermentato, formaggi e yogurt) sono disponibili due metanalisi di studi di coorte, entrambe riportano una relazione inversa tra consumo di prodotti fermentati ed incidenza di CVD, ed una relazione neutra con l'incidenza di CHD; la più recente ed esaustiva riporta una riduzione della incidenza di eventi cardiovascolari di circa il 17% associata al consumo di prodotti fermentati complessivamente considerati (34). Per il formaggio, in particolare, diverse metanalisi hanno riportato una associazione inversa con l'incidenza di CVD e CHD; due metanalisi che hanno valutato la relazione dose-risposta hanno mostrato una riduzione significativa di circa il 12% della incidenza di CHD per un consumo di 50g (una porzione standard di formaggio stagionato) al giorno (34). Per quanto riguarda lo yogurt le più recenti metanalisi riportano che un consumo giornaliero di circa 200g si associa con una riduzione di circa 8% del rischio di eventi cardiovascolari fatali e non fatali. I lavori che hanno valutato separatamente il consumo di prodotti a basso contenuto di grassi e prodotti interi non riportano significative differenze tra le due tipologie rispetto alla relazione con il rischio cardiovascolare.

L'evidenza che una dieta ricca in grassi saturi, di cui sono ricchi latte e derivati, contribuisce ad aumentare i livelli di colesterolo plasmatico, il più potente fattore di rischio CV, è il motivo per cui il consumo di latticini, specialmente quelli interi, è stato scoraggiato in passato. Tuttavia, nonostante l'elevato contenuto in acidi grassi saturi a lunga catena, alcuni dei quali si ritrovano anche nella carne (acido laurico, miristico, palmitico e stearico), latte e derivati contengono altri composti potenzialmente benefici per la salute CV come, ad esempio, acidi grassi saturi a media e corta catena, acidi grassi TRANS di derivazione naturale (i.e. prodotti dai ruminanti), acidi grassi polinsaturi, vitamine K1 e K2, e calcio (35). Queste caratteristiche nutrizionali possono spiegare il dato epidemiologico di una associazione neutra, o protettiva, con il rischio cardiovascolare nonostante l'elevato contenuto in grassi saturi. Un altro elemento da considerare è il ruolo dei probiotici contenuti nei prodotti fermentati (36-37). I probiotici promuovono la integrità dell'epitelio intestinale ed interagiscono con la flora intestinale modificandone la composizione e la funzione (36); favoriscono la crescita di ceppi batterici

che fermentano le fibre producendo acidi grassi a catena corta, specialmente butirrico, che riducono la produzione di citochine pro- infiammatorie, ed hanno effetti benefici su lipidi plasmatici, insulino-resistenza e pressione arteriosa (37). In sintesi, le evidenze supportano un moderato consumo di latte e formaggio (rispettivamente una tazza al giorno e, tre piccole porzioni a settimana) ed una porzione generosa di yogurt nella dieta quotidiana.

**Grassi e condimenti** - Le fonti alimentari di grassi sono definite in base alla composizione in acidi grassi (saturi, monoinsaturi o polinsaturi) (Tab. 2), ma i grassi e gli oli si differenziano anche per il contenuto di altri composti bioattivi come polifenoli, antiossidanti, vitamine e fitosteroli, con effetti dimostrati sulla salute cardiometabolica al di là della composizione in acidi grassi (38). Ci sono solide evidenze che il consumo di alimenti contenenti acidi grassi trans (acidi grassi che si formano dai grassi insaturi durante la cottura nei processi di preparazione di alcuni alimenti) si associa ad un aumento del rischio cardiovascolare. Una metanalisi di quattro studi prospettici ha dimostrato che un aumento del 2% della quantità di energia introdotta sotto forma di acidi grassi trans si associa ad un aumento del 23% della incidenza di CHD (39). Per quanto riguarda il burro le metanalisi di studi di coorte non riportano una associazione con l'incidenza di CHD/CVD per consumi alti verso consumi bassi. Occorre notare che gli studi metanalizzati sono pochi e che i consumi riportati sono quantitativamente modesti (da 9 a 25 grammi nei gruppi con consumo alto), pertanto questi dati non permettono di trarre conclusioni relative a consumi più elevati che sono abituali in molte popolazioni. Relativamente agli oli occorre distinguere l'olio di oliva, ricco in acidi grassi monoinsaturi (MUFA) dagli altri vegetali ricchi in acidi grassi polinsaturi (PUFA), soprattutto acido linoleico (Tab. 2). Tre metanalisi di studi prospettici che hanno esplorato la relazione tra consumo di olio di oliva ed incidenza di CHD, riportano una tendenza verso la riduzione, ma la significatività statistica si raggiunge solo in una, mentre gli studi che hanno preso in considerazione gli eventi cardiovascolari evidenziano in maniera concorde una riduzione significativa della incidenza di CVD (4, 38). In uno studio che ha valutato la relazione dose risposta un aumento di 5g nel consumo abituale di olio di oliva si associa ad una riduzione del 7% della incidenza di CHD, del 4% della incidenza di CVD e

**Tabella 2** ◆ **Composizione in acidi grassi (espressa per 100g) di diversi grassi ed oli**

	Acidi grassi saturi	Monoinsaturi	n-6 PUFA	n-3 PUFA
<b>Olio di canola</b>	7	63	19	9
<b>Olio di Cocco</b>	82	6	2	0
<b>Olio di mais</b>	13	28	53	1
<b>Burro</b>	63	26	3	0
<b>Lardo</b>	39	45	10	1
<b>Olio di oliva</b>	14	73	10	1
<b>Olio di palma</b>	49	37	9	0
<b>Olio di arachidi</b>	17	46	32	0
<b>Olio di soia</b>	16	23	50	7
<b>Olio di girasole (alto oleico)</b>	10	84	4	0
<b>Olio di girasole (alto linoleico)</b>	11	33	50	1

Banca dati di composizione degli alimenti, CREA

8% nella mortalità per CVD (40). Gli effetti protettivi del consumo di olio di oliva sono supportati anche dallo studio PREDIMED, un trial controllato e randomizzato, che ha dimostrato una riduzione del 30% della incidenza di eventi cardiovascolari in soggetti ad alto rischio assegnati ad una dieta mediterranea arricchita in olio di oliva extravergine, confrontati con il gruppo di controllo assegnato ad una dieta povera in grassi (22). Per gli oli vegetali ricchi in acido linoleico (olio di girasole, mais, arachidi e soia) due recenti ed esaustive metanalisi di studi prospettici una riduzione della incidenza e mortalità per eventi cardiovascolari, rispettivamente -7% e -13%, associata ad un elevato consumo di questi oli valutato mediante la misurazione di biomarcatori molto attendibili come lo spettro degli acidi grassi plasmatici (41-42).

Un ulteriore supporto alla comprensione della relazione tra grassi della dieta e CVD viene dagli studi di coorte e dai trials che hanno valutato l'effetto della sostituzione acidi grassi saturi (SFA) - i principali grassi presenti nel burro, nel grasso animale e negli oli tropicali (olio di palma ed olio di cocco) - con acidi grassi polinsaturi o monoinsaturi o con altri nutrienti, ad esempio i carboidrati. Diverse metanalisi di studi prospettici hanno dimostrato che la sostituzione del 5% di energia proveniente da grassi saturi con quantità isocaloriche di grassi polinsaturi si associa con una riduzione sostanziale della incidenza e della mortalità per CHD (rispettivamente tra il 9% ed

il 25% e tra il 13% ed il 26%) (4, 39, 43). Questi dati sono in linea con i risultati di una metanalisi di studi di intervento che riporta una riduzione di circa il 24% della incidenza di CHD quando i grassi saturi della dieta vengono sostituiti con oli vegetali ricchi di acidi grassi polinsaturi (44). I risultati degli studi osservazionali riguardanti la sostituzione isoenergetica di SFA con acidi grassi monoinsaturi (MUFA) sono meno concordanti, gli studi che hanno analizzato specificamente l'olio di oliva come fonte di MUFA riportano una riduzione significativa di circa il 15% della incidenza di CHD (40), quelli che hanno considerato tutte le fonti di MUFA, incluse quelle animali, non hanno mostrato differenze significative.

Il ruolo pro-aterogeno dei grassi saturi della dieta è anche sostenuto dai risultati di trials che hanno dimostrato una riduzione del colesterolo LDL quando gli acidi grassi saturi della dieta vengono sostituiti con monoinsaturi o polinsaturi (42); inoltre, gli studi in cui il burro è stato sostituito con oli vegetali ricchi in PUFA o MUFA hanno mostrato un miglioramento di insulino-sensibilità, pressione arteriosa ed infiammazione subclinica (45-46). In conclusione, gli oli vegetali sono una scelta alimentare più sana rispetto al burro, ai grassi animali in generale, ed agli oli tropicali. In particolare, per quanto riguarda la prevenzione cardiovascolare primaria l'olio di oliva dovrebbe essere privilegiato in considerazione dei risultati dello studio PREDIMED.



**Sale** - Studiare la relazione tra consumo di sale e CVD è complesso a causa di molti potenziali fattori di confondimento. Misurare il consumo di sale in modo accurato negli studi di osservazione è difficile, inoltre, le persone spesso riducono il consumo di sale per controllare l'ipertensione, un potente fattore di rischio cardiovascolare; infine, la sensibilità al sodio è molto variabile (47). In questo contesto è particolarmente interessante una metanalisi di studi in cui l'introito di sodio è stato stimato in modo rigoroso misurando l'escrezione urinaria delle 24 ore (48). Nel quartile più alto di escrezione di sodio il rischio di eventi aumenta del 60%, rispetto al quartile più basso (HR 1.6 - 95% CI 1.25-2.14 -) (49). Questi dati sono in linea con una recente metanalisi di studi di coorte che riporta con un aumento del 19% degli eventi cardiovascolari associato ad un elevato consumo di sodio, rispetto ad un consumo basso ed un ulteriore aumento del 6% del rischio per ogni aumento di un grammo nel consumo di sodio (49). Inoltre, i dati del follow-up osservazionale degli studi di intervento sulla prevenzione della ipertensione arteriosa dimostrano una riduzione del 25-30% degli eventi CV, ancora osservabile 10-15 anni dopo la chiusura del trial, nei gruppi assegnati ad una restrizione di sodio (50). Per quanto riguarda i possibili meccanismi, a parte l'effetto sulla pressione arteriosa, il sodio promuove l'ipertrofia ventricolare, la rigidità della parete arteriosa, l'insulino-resistenza, l'infiammazione sistemica e lo stress ossidativo (51). Al momento si raccomanda un consumo di sale non superiore a 5g al giorno, ma questa quantità è spesso superata. La maggior parte del sodio della dieta proviene da alimenti processati (carni, pesce, legumi in scatola) o da prodotti da forno (pane, grissini ecc.). Per ridurre il consumo di sale a livello di popolazione quindi, non solo bisogna ridurre la quantità di sale aggiunto agli alimenti, ma occorre rendere disponibili sul mercato prodotti a basso contenuto di sodio e promuoverne il consumo (47).

### **Bevande**

*Bevande zuccherate* - I dati disponibili indicano in maniera coerente che il consumo di bevande zuccherate è associato ad un aumento del rischio cardiovascolare. Diverse metanalisi di studi prospettici riportano che il consumo giornaliero di una bibita zuccherata (circa 250ml) si associa ad un aumento tra il 15% ed il 22% della incidenza di CHD, un aumento significativo si osserva anche per la mortalità per CHD e per l'incidenza e mortalità per CVD (4, 52). Gli

effetti avversi del consumo di queste bibite sono attribuiti all'elevato contenuto in zuccheri, soprattutto il fruttosio i cui effetti metabolici negativi sul metabolismo lipidico e glicidico sono ben documentati, come pure l'effetto di promozione dell'adiposità viscerale e della steatosi epatica (53). Per quanto riguarda le bevande dolcificate con sostanze ipocaloriche (sucralosio, aspartame, acesulfame) le evidenze sono meno stringenti. Queste bevande conservano il gusto dolce ma contengono pochissime calorie e sono ritenute da molti una scelta più salutare. Tuttavia, metanalisi recenti hanno riportato un marginale, ma significativo, aumento della incidenza di CHD e CVD associata al consumo di una porzione al giorno di queste bevande (4, 52). Inoltre, il loro consumo educa il palato al gusto dolce e nel lungo termine promuove il consumo di alimenti e bevande ricche di zuccheri (54), per cui, anche se i meccanismi che mediano l'aumento del rischio CV devono essere meglio studiati, il consumo abituale di questi prodotti è da sconsigliare.

*Bevande alcoliche* - Ci sono evidenze che un consumo moderato di vino o birra nella popolazione adulta sana, si associa ad una riduzione del rischio cardiovascolare (55-56). In particolare, una metanalisi di studi prospettici ha dimostrato che il consumo di 24 grammi di alcool (pari a due bicchieri di vino al giorno) si associa ad una riduzione del 32% dell'incidenza di malattie CV. In questo stesso studio il consumo di un bicchiere di birra al giorno, si associa alla riduzione del 20% della incidenza di CVD (55). I pochi dati relativi ad altre bevande alcoliche non sono conclusivi. L'analisi della relazione dose-risposta indica una relazione a J, cioè dopo una iniziale riduzione per consumi bassi-moderati, circa 10g al giorno per le donne e 20g al giorno per gli uomini, il rischio aumenta rapidamente per consumi più elevati.

Gli effetti protettivi di un moderato consumo di vino e birra sono attribuiti agli effetti benefici sul metabolismo lipidico, sulla insulino-sensibilità, infiammazione sistemica e coagulazione (57), in parte dovuti al contenuto in composti fenolici che mancano in altre bevande alcoliche. Tuttavia, consumi elevati promuovono aumento della pressione arteriosa, ipertrigliceridemia ed accumulo di grasso epatico, inoltre, l'alcool è una fonte di calorie e favorisce l'aumento di peso che a sua volta si associa ad un profilo di rischio CV avverso. Infine, bisogna ricordare che l'alcol è un fattore di rischio per alcuni

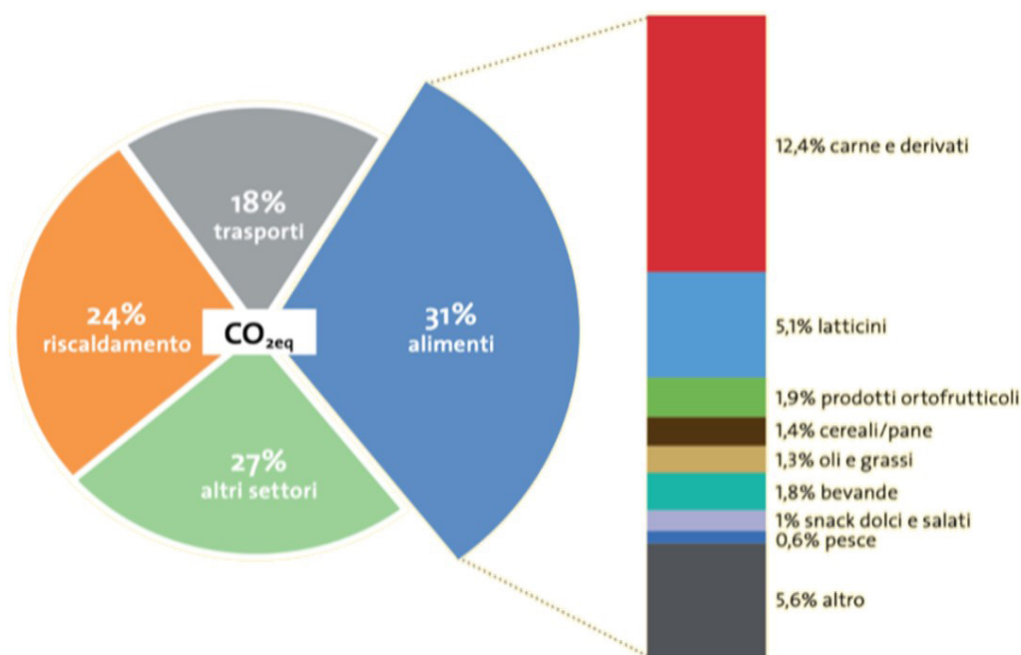
tipi di cancro. In sintesi, un moderato consumo di vino o birra in persone che già ne fanno uso e che non presentano controindicazioni, può essere tollerato, ma non va incoraggiato.

**Conclusioni** - Le scelte alimentari sono tra i maggiori determinanti della nostra salute, si stima che circa il 52% delle morti cardiovascolari sono attribuibili alla dieta (1). Dalle evidenze qui riviste emerge che un modello alimentare per la prevenzione delle malattie cardiovascolari deve privilegiare gli alimenti di origine vegetale: frutta, verdure e cereali integrali, limitando il consumo di cereali raffinati ed alimenti ricchi di amido con alto indice glicemico e zuccheri. Le fonti proteiche devono essere varie, soprattutto legumi e frutta secca, ma anche pesce, uova, latticini e carni bianche come fonti di proteine animali, in sostituzione di carni rosse e processate. L'olio di oliva o altri oli vegetali ricchi di acidi grassi polinsaturi sono i condimenti raccomandati. I dati a supporto di questo modello alimentare, in linea con le caratteristiche della dieta mediterranea, provengono in larga parte da studi di osservazione, ma anche da studi in vitro ed in vivo, che ne supportano la plausibilità biologica, chiarendo i meccanismi attraverso cui gli alimenti possono influen-

zare il profilo di rischio CV e l'occorrenza di eventi. Anche diversi trials sostengono (22, 57-58) queste conclusioni. L'adesione al modello alimentare dello studio DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) ricco in vegetali e frutta e povero in alimenti processati e sale, sia associata ad una riduzione del 5% degli eventi cardiovascolari (57). Il Lyon Diet Heart Study ha dimostrato che una dieta di tipo mediterraneo migliora il profilo di rischio CV e riduce l'occorrenza di re-infarto in persone con un precedente evento, al di là dell'uso di farmaci (58). Lo studio PREDIMED ha dimostrato una riduzione del 30% della incidenza di eventi cardiovascolari in soggetti ad alto rischio assegnati ad una dieta mediterranea arricchita in olio di oliva extravergine o con frutta secca, confrontati con il gruppo di controllo assegnato ad una dieta povera in grassi (22). A parte i benefici sulla salute, si possono fare anche altre considerazioni. Questo modello alimentare offre una varietà di scelte che può accogliere le esigenze di diverse culture facilitando l'implementazione. Infine, ma non meno importante, considerato che la nutrizione è responsabile di circa il 30% della emissione totale di gas serra, le scelte raccomandate per la riduzione del rischio cardiovascolare sono anche quelle con il minore impatto ambientale (59) (Fig. 5).

**Figura 5** ♦ Fattori determinanti le emissioni di gas serra nelle famiglie europee.

Elaborazione BCFN su Tukker A, Jansen B. Environmental impact of products. *Journal of Industrial Ecology*. 2006; 10(3)



**BIBLIOGRAFIA**

1. Pörschmann T, Meier T, Lorkowski S. Cardiovascular mortality attributable to dietary risk factors in 54 countries in the WHO European Region from 1990 to 2019: an updated systematic analysis of the Global Burden of Disease Study. *Eur J Prev Cardiol.* 2024 April 15; 136.
2. Hu FB, Willett WC. Optimal diets for prevention of coronary heart diseases. *JAMA.* 2002; 288:2569-2577.
3. Mozaffarian D. Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity: A Comprehensive Review. *Circulation.* 2016; 133(2):187-225.
4. Riccardi G, Giosuè A, Calabrese I, Vaccaro O. Dietary recommendations for prevention of atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2022; 118(5):1188-1204.
5. Mendes V, Niforou A, Kasdagli MI, et al. Intake of legumes and cardiovascular disease: A systematic review and dose-response meta-analysis. *NMCD.* 2023; 33(1):22-37.
6. Miller V, Micha R, Neuenschwander M, et al. Substitution of animal-based with plant-based foods on cardiometabolic health and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *BMC Med.* 2023; 21:404-406.
7. Bozzetto L, Costabile G, Della Pepa G, et al. Dietary Fibre as a Unifying Remedy for the Whole Spectrum of Obesity-Associated Cardiovascular Risk. *Nutrients.* 2018; 10(7):943.
8. Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, et al. 2021 ESC Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J.* 2021; 42:3227-3337.
9. Van Horn L, Carson JA, Appel LJ, et al. Recommended Dietary Pattern to Achieve Adherence to the American Heart Association/American College of Cardiology (AHA/ACC) Guidelines: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2016; 134:e505-e529.
10. Aune D, Giovannucci E, Boffetta P, et al. Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality-a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int J Epidemiol.* 2017; 46:1029-1056.
11. Wang DD, Li Y, Bhupathiraju SN, et al. Fruit and vegetable intake and mortality: results from 2 prospective cohort studies of US men and women and a meta-analysis of 26 cohort studies. *Circulation.* 2021; 143:1642-1654.
12. Scheffers FR, Boer JM, Wijga AH, et al. Substitution of pure fruit juice for fruit and sugar-sweetened beverages and cardiometabolic risk in European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-NL: a prospective cohort study. *Public Health Nutr.* 2022; 25(6):1504-1514.
13. Bozzetto L, Annuzzi G, Pacini G, et al. Polyphenol-rich diets improve glucose metabolism in people at high cardiometabolic risk: a controlled randomized intervention trial. *Diabetologia.* 2015; 58:1551-1560.
14. Annuzzi G, Bozzetto L, Costabile G, et al. Diets naturally rich in polyphenols improve fasting and postprandial dyslipidemia and reduce oxidative stress: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99:463-471.
15. Augustin LS, Kendall CW, Jenkins DJ, et al. Glycemic index, glycemic load and glycemic response: an International Scientific Consensus Summit from the International Carbohydrate Quality Consortium (ICQC). *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015; 25:795-815.
16. Jenkins D, Dehghan M, Mente SI, et al for the PURE Study Investigators. Glycemic Index, Glycemic Load, and Cardiovascular Disease and Mortality. *N Engl J Med.* 2021; 384:1312-1322.
17. Livesey G, Livesey H. Coronary heart disease and dietary carbohydrate, glycemic index, and glycemic load: dose-response meta-analyses of prospective cohort studies. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes.* 2019; 3:52-69.
18. Marshall S, Petocz P, Dube E, et al. The effect of replacing refined grains with whole grains on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials with GRADE clinical recommendation. *J Acad Nutr Diet.* 2020; 120:1859-1883.
19. Vetrani C, Costabile G, Luongo D, et al. Effects of whole-grain cereal foods on plasma short chain fatty acid concentrations in individuals with the metabolic syndrome. *Nutrition.* 2016; 32:217-221.
20. Glenn AJ, Aune D, Freisling H, et al. Nuts and cardiovascular disease outcomes: A review of the evidence and future directions. *Nutrients.* 2023; 15(4):911.
21. Olas B. The Cardioprotective Properties of Selected Nuts: Their Functional Ingredients and Molecular Mechanisms. *Foods.* 2024; 13(2):242.
22. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med.* 2018; 78(25):e34.

23. Al-Shaar L, Satija A, Wang DD, et al. Red meat intake and risk of coronary heart disease among US men: prospective cohort study. *BMJ*. 2020; 371:m4141.
24. Lupoli R, Vitale M, Calabrese I, et al. White Meat Consumption, All-Cause Mortality, and Cardiovascular Events: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Nutrients*. 2021; 13:676-679.
25. Ramel A, Nwaru BI, Lamberg-Allardt C. White meat consumption and risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis *Food Nutr Res*. 2023; 28:67.
26. Lépine G, Fouillet H, Rémond DF, et al. A Scoping Review: Metabolomics Signatures Associated with Animal and Plant Protein Intake and Their Potential Relation with Cardiometabolic Risk. *Adv Nutr*. 2021; 12:2112-2213.
27. Dong X, Zhuang Z, Zhao Y. Unprocessed Red Meat and Processed Meat Consumption, Plasma Metabolome, and Risk of Ischemic Heart Disease: A Prospective Cohort Study of UK Biobank. *J Am Heart Assoc*. 2023; 12(7).
28. Zhao H, Wang M, Peng X et al. Fish consumption in multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational and clinical studies. *Ann Transl Med*. Feb 15 2023; 11(3):152.
29. Jayedi A, Zargar MS, Shab-Bidar S. Fish consumption and risk of myocardial infarction: a systematic review and dose-response meta-analysis suggests a regional difference. *Nutr Res*. 2019; 62:1-12.
30. Tan K, Huang L, Tan K, et al. Effects of culinary treatments on the lipid nutritional quality of fish and shellfish. *Food Chem X*. 2023; 4(19):100856.
31. Giosuè A, Calabrese I, Lupoli R, et al. Relations between the Consumption of Fatty or Lean Fish and Risk of Cardiovascular Disease and All-Cause Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr*. 2022; 13:1554-1565.
32. Carter S, Connole ES, Hill AM, et al. Eggs and Cardiovascular Disease Risk: An Update of Recent Evidence. *Curr Atheroscler Rep*. 2023 Jul; 25(7):373-380.
33. Giosuè A, Calabrese I, Vitale M, et al. Consumption of Dairy Foods and Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Nutrients*. 2022 Feb 16; 14(4):831.
34. Zhang K, Chen X, Zhang L, Deng Z. Fermented dairy foods intake and risk of cardiovascular diseases: A meta-analysis of cohort studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020; 60(7):1189-1194.
35. Torres-Gonzalez M, Rice Bradley BH. Whole-Milk Dairy Foods: Biological Mechanisms Underlying Beneficial Effects on Risk Markers for Cardiometabolic Health. *Advances in Nutrition*. 2023; 14:1523-1537.
36. Oniszczuk A, Oniszczuk T, Gancarz M, Szymańska J. Role of gut microbiota, probiotics and prebiotics in the cardiovascular diseases. *Molecules*. 2021; 26:1172.
37. Yao Y, Cai X, Fei W, et al. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Immunity, Inflammation and Metabolism. *Crit. Rev. Food Sci Nutr*. 2022; 62:1-12.
38. Rosqvist F, Niinistö S. Fats and oils - a scoping review for Nordic Nutrition Recommendations 2023. *Food Nutr Res*. 2024 Feb 9; 68.
39. Skeaff CM, Miller J. Dietary fat and coronary heart disease: summary of evidence from prospective cohort and randomised controlled trials. *Ann Nutr Metab*. 2009; 55:173-201.
40. Guasch-Ferré M, Liu G, Li Y, et al. Olive oil consumption and cardiovascular risk in U.S. adults. *J Am Coll Cardiol*. 2020; 75:1729-1739.
41. Marklund M, Wu JHY, Imamura F, et al For the Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology. Fatty Acids and Outcomes Research Consortium (FORCE). Biomarkers of dietary omega-6 fatty acids and incident cardiovascular disease and mortality. *Circulation*. 2019; 139:2422-2436.
42. Li J, Guasch-Ferré M, Li Y, Hu FB. Dietary intake and biomarkers of linoleic acid and mortality: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr*. 2020; 112:150-167.
43. Sacks FM, et al Dietary Fats and Cardiovascular Disease: A Presidential Advisory From the American Heart Association. *Circulation*. 2017; 136.
44. Hooper L, Martin N, Jimoh OF, Kirk C, Foster E, Abdelhamid AS. Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020; 8.
45. Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb*. 1992; 12:911-919.
46. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr*. 2004; 23:447-456.
47. Cappuccio FP, Beer M, Strazzullo P, European Salt Action Network. Population dietary salt reduction and the risk of cardiovascular disease. A scientific statement from

- the European Salt Action Network. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2019; 29:107-114.
48. Ma Y, He FJ, Sun Q et al. 24-Hour Urinary Sodium and Potassium Excretion and Cardiovascular Risk - *N Engl J Med.* 2022; 386(3):252-263.
  49. Wang YJ, Yeh TL, Shih MC, Tu YK, Chien KL. Dietary sodium intake and risk of cardiovascular disease: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Nutrients.* 2020; 12:2934.
  50. Cook NR, Cutler JA, Obarzanek E, et al. Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP). *BMJ.* 2007; 334:885-888.
  51. Robinson AT, Edwards DG, Farquhar WB. The influence of dietary salt beyond blood pressure. *Curr Hypertens Rep.* 2019; 21:42.
  52. Sonestedt E, Lukic M. Beverages - a scoping review for Nordic Nutrition Recommendations 2023. *Food Nutr Res.* 2024; 2:68-73.
  53. Taskinen MR, Packard CJ, Borén J. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Nutrients.* 2019; 11:1987.
  54. Green E, Murphy C. Altered processing of sweet taste in the brain of diet soda drinkers. *Physiol Behav.* 2012; 107:560-567.
  55. Costanzo S, Di Castelnuovo A, Donati MB, et al. Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: a meta-analysis. *Eur J Epidemiol.* 2011; 26:833-850.
  56. Krittanawong C, Isath A, Rosenson RS et al. Alcohol Consumption and Cardiovascular Health *Am J Med.* 2022; 135:1213-1230.
  57. Soltani S, Arablou T, Jayedi A, Salehi-Abargouei A. Adherence to the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet in relation to all-cause and cause-specific mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Nutr J.* 2020; 19:37-41.
  58. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, et al. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation.* 1999; 99:779-785.
  59. Giosuè A, Recanati F, Calabrese I. Good for the heart, good for the Earth: proposal of a dietary pattern able to optimize cardiovascular disease prevention and mitigate climate change. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2022; 32(12):2772-2781. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36323607/>.

a cura di Sebastiano Squatrito

## I trigliceridi come fattore di rischio cardiovascolare *Triglycerides and cardiovascular prevention*

Mario Luca Morieri

Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova - UOC Malattie del Metabolismo,  
Università degli Studi di Padova

DOI: <https://doi.org/10.30682//ildia2402c>

### ABSTRACT

*Triglycerides and cardiovascular prevention have become increasingly important, especially in diabetic patients who continue to have a higher cardiovascular risk compared to the general population. Elevated triglycerides, part of the typical “diabetic dyslipidemia”, are often under-recognized but play a crucial role in cardiovascular risk. Treatments focusing on triglycerides as fenofibrate and omega-3 fatty acids, particularly Icosapent Ethyl (IPE), have shown to reduce cardiovascular events in well-selected patients. This review addressed how and why it is important to consider hypertriglyceridemia in cardiovascular prevention among patients with diabetes.*

### KEYWORDS

*Triglycerides, cardiovascular risk, diabetic dyslipidemia, fenofibrate, omega-3 fatty acids, icosapent ethyl.*

### INTRODUZIONE

La prevenzione e il trattamento delle malattie cardiovascolari (CVD) è migliorata progressivamente nelle ultime decadi con una progressiva riduzione dell'incidenza di malattie CVD sia nella popolazione generale che nei pazienti con diabete (1). Tuttavia, il divario tra le due popolazioni non si è ridotto, e in scala relativa i pazienti con diabete mantengono un rischio ugualmente maggiore rispetto a quello osservato ad inizio anni 2000. Infatti i soggetti con diabete mellito di tipo 1 e tipo 2 continuano a presentare un rischio cardiovascolare significativamente aumentato, stimato essere tra due e quattro volte superiore rispetto alla popolazione generale (2-4). Questo aumento del rischio è dovuto a molteplici e ben noti fattori spesso relati tra loro, tra cui l'iperglicemia, l'ipertensione, la resistenza insulinica, l'infiammazione cronica, l'obesità e accumulo di grasso ectopico e anche la dislipidemia. In questo ambito, oltre alla possibile presenza di ipercolesterolemia, nel paziente con diabete è spesso presente la classica “dislipidemia diabetica”, anche detta “dislipidemia aterogena”, caratterizzata tipicamente da elevati livelli di trigliceridi, bassi livelli di colesterolo HDL e incremento delle particelle LDL piccole e dense, particolarmente aterogene (5-6).

La prevenzione cardiovascolare nel paziente diabetico richiede pertanto l'attenzione verso tutti questi fattori di rischio, e l'utilizzo in particolare dei farmaci antidiabetici con comprovata efficacia cardio- (e nefro-) protettiva come gli SGLT2i e i GLP1-RAs. Questa review pone l'attenzione sulla gestione della dislipidemia e in particolare dell'ipertrigliceridemia (HTG). Se da un lato è infatti essenziale porre l'attenzione in primis al controllo e riduzione del colesterolo LDL, dall'altro l'HTG risulta spesso un fattore di rischio sottovalutato e il cui trattamento potrebbe invece giovare, in pazienti ben selezionati, di un trattamento in grado di ridurre il rischio cardiovascolare e di altre complicanze del diabete.

## **PREVALENZA DELL'IPERTRIGLICERIDEMIA NEL PAZIENTE DIABETICO, E I SUOI DETERMINANTI**

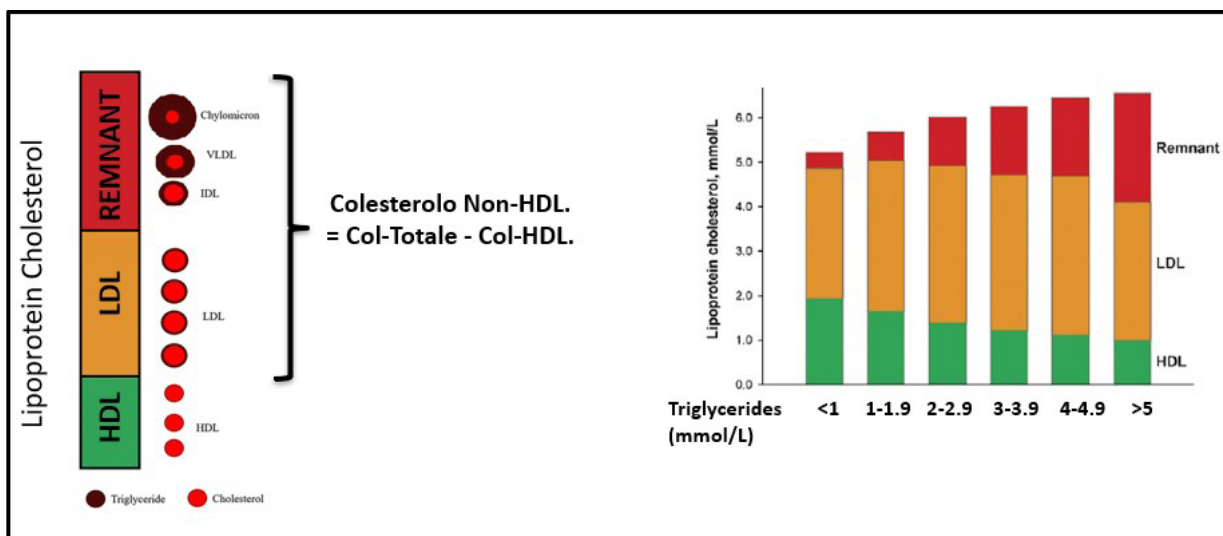
L'ipertrigliceridemia lieve-moderata (definita tipicamente a partire dai 150 mg/dl) è presente in un numero considerevole di pazienti con diabete, con una prevalenza che oscilla tra il 15% e il 40%, in base alle diverse coorti considerate e ai criteri usati per definirla (7-8), con una prevalenza che aumenta considerevolmente nelle condizioni di scompenso o scarso controllo glicemico. Se prendiamo come riferimento la popolazione seguita nello studio DARWIN-T2D, multicentrico italiano in grado di raccogliere informazioni su oltre 280 mila pazienti seguiti in un contesto ambulatoriale specialistico, di cui circa 100 mila con profilo lipidico completo, la prevalenza di ipertrigliceridemia era del 15% o del 32% se consideriamo come cut-off rispettivamente 150 mg/dl o 200 mg/dl, mentre la combinazione di HDL basse e TG alti oscillava tra il 10 e il 17% in base ai diversi cut-off considerati (9). I fattori determinanti di HTG nei pazienti diabetici sono diversi, e tra questi troviamo: le diete ad alto contenuto di carboidrati raffinati e grassi saturi, così come l'eccesso calorico e l'inattività fisica sono ulteriori fattori aggravanti (10); la resistenza insulinica (con ridotta lipolisi regolata dall'insulina nel tessuto adiposo, che porta ad un aumento del rilascio di acidi grassi liberi e successiva aumentata sintesi epatica di VLDL) (11), il deficit insulinico (assoluto o relativo) con conseguente ridotta attività della lipoproteina lipasi (LPL) e ulteriore compromissione del catabolismo dei trigliceridi (12); vi è poi spesso una predisposizione genetica (poligenica), infatti esistono diverse varianti che possono alterare sia il metabolismo lipidico che incrementare il rischio di diabete, come ad esempio mutazioni che possono predisporre a livelli elevati di acidi grassi liberi e peggiorare la secrezione insulinica e aumentare la predisposizione al diabete (13).

## **PERCHÉ IDENTIFICARE L'IPERTRIGLICERIDEMIA PER LA PREVENZIONE CARDIOVASCOLARE?**

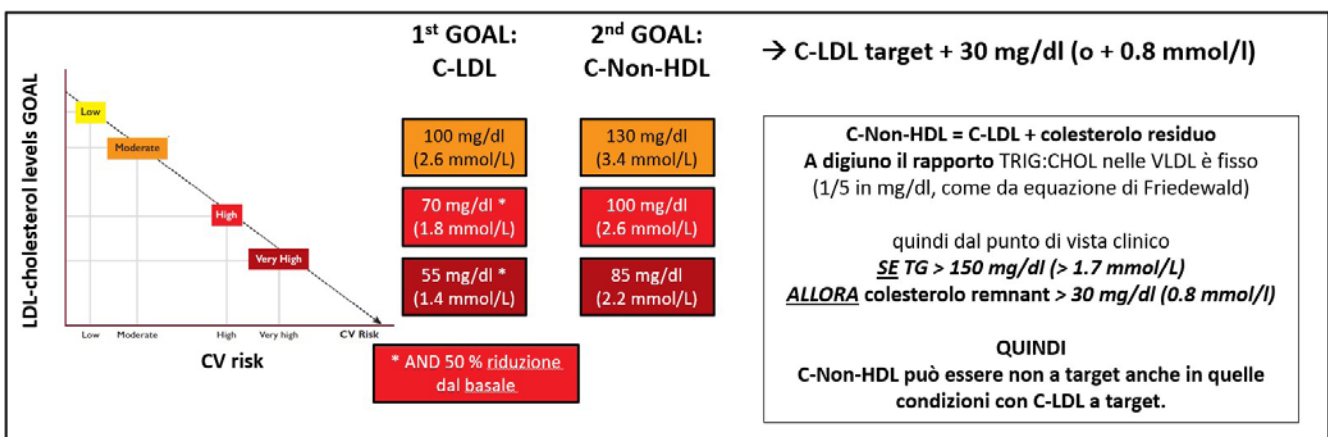
Se da un lato, il ruolo causale del colesterolo LDL sulla malattia cardiovascolare è ormai sempre più consolidato e riconosciuto dai clinici (14), dall'altro il ruolo dei trigliceridi, delle lipoproteine ricche in trigliceridi, e del colesterolo residuo trasportate in queste lipoproteine, richiede un focus specifico (15). Secondo le recenti linee guida della European Atherosclerosis Society (EAS), i trigliceridi non rappresentano infatti un obiettivo terapeutico nella gestione delle dislipidemie, al contrario viene invece indicato tra i target terapeutici il controllo del colesterolo non-HDL (che rappresenta un obiettivo terapeutico secondario dopo il colesterolo LDL) (16). Come riassunto in figura 1, il colesterolo non-HDL comprende il contenuto di colesterolo di tutte le lipoproteine eccetto l'HDL, quindi include sia il colesterolo LDL che il colesterolo residuo (colesterolo remnant), ovvero il colesterolo contenuto nelle lipoproteine ricche di trigliceridi (TGRL). Generalmente, i livelli di colesterolo LDL e colesterolo non-HDL sono altamente correlati, ma come dimostrato nello studio della Copenhagen General Population Study, quando i trigliceridi aumentano, la concentrazione di colesterolo residuo aumenta progressivamente, ma non proporzionalmente al colesterolo LDL (Fig. 1) (17). Pertanto, sebbene i trigliceridi non siano un chiaro obiettivo terapeutico, essi rappresentano un buon indicatore delle concentrazioni di colesterolo residuo e delle lipoproteine ricche di trigliceridi (Fig. 2). Elementi che svolgono un ruolo importante nell'aterogenesi del paziente con e senza diabete. Le lipoproteine circolanti, in particolare le VLDL e le loro particelle residue (remnants), sono i vettori principali dei trigliceridi nel sangue e diverse evidenze scientifiche dimostrano un loro ruolo causale aterogeno (17). Le VLDL contribuiscono infatti alla formazione delle placche aterosclerotiche attraverso meccanismi come l'infiammazione endoteliale e lo stress ossidativo (18), inoltre l'accu-

mulo di particelle residue ricche di colesterolo nel sub-endotelio vascolare risulta essere un fattore chiave nell'iniziazione e progressione dell'aterosclerosi (19). Negli ultimi decenni poi, numerose evidenze genetiche-epidemiologiche hanno supportato la relazione causale tra le lipoproteine ricche di trigliceridi e l'aterogenesi. Studi genetici, inclusi quelli di randomizzazione mendeliana, hanno dimostrato che i portatori di varianti genetiche che aumentano il colesterolo residuo (delle TGRL) sono esposti a un rischio maggiore di CVD nel corso della loro vita rispetto ai non portatori di queste varianti (20). Infine, è importante notare che le lipoproteine ricche di trigliceridi contengono una molecola di apolipoproteina B (apo-B), proprio come le LDL. Diversi studi hanno supportato l'idea che ridurre apo-B fornisce benefici indipendentemente dall'essere derivata da lipoproteine ricche di trigliceridi o da LDL (20-21).

**Figura 1** ♦ Rappresentazione del colesterolo non-HDL e rapporto tra il colesterolo remnant e quello delle LDL all'aumentare dei valori di trigliceridi plasmatici. Mod da (17)



**Figura 2** ♦ Target terapeutici di colesterolo LDL e non-HDL secondo le linee guida internazionali della EAS sulle dislipidemie, e relazione tra ipertrigliceridemia (trigliceridi >150 mg/dl) e probabilità di avere il colesterolo non-HDL non a target





## COME RIDURRE IL RISCHIO CARDIOVASCOLARE NEI PAZIENTI CON IPERTRIGLICERIDEMIA

### Riduzione del colesterolo LDL come approccio principale

Uno degli approcci chiave nella gestione del rischio cardiovascolare è la riduzione del colesterolo LDL, considerato l'obiettivo primario nelle linee guida per il trattamento delle dislipidemie (14, 16). In nessun caso quindi la presenza di ipertrigliceridemia deve togliere l'attenzione dal controllo del colesterolo LDL, anzi al contrario diversi studi suggeriscono come nei pazienti con HTG le statine diventano ulteriormente efficaci. Ad esempio, l'analisi post hoc del TNT ha dimostrato che livelli elevati di lipoproteine ricche di trigliceridi (TRL-C) sono associati a un aumento del rischio cardiovascolare e che la riduzione del colesterolo LDL con statine apporta benefici significativi nei pazienti con malattia coronarica e alti livelli di TRL-C (22). Pertanto, senza dimenticare di considerare trattamenti specifici per l'ipertrigliceridemia, è essenziale focalizzarsi in primis sul controllo del colesterolo LDL.

### Trattamenti specifici per ridurre i trigliceridi

Se da un lato l'approccio per ridurre il colesterolo LDL si può definire come "one size fits all", quello per ridurre i trigliceridi diventa invece un trattamento personalizzato e basato sulla medicina di precisione. In altre parole, le evidenze suggeriscono che la riduzione del colesterolo LDL apporti benefici per la salute cardiovascolare potenzialmente ad ogni paziente trattato (con variabilità nei target da raggiungere) (14, 16), mentre le evidenze sulle terapie con farmaci che riducono i trigliceridi richiedono una attenta selezione per identificare quei soggetti che potrebbero trarre beneficio e minor rischio da queste terapie (15). Tra quelle attualmente a disposizione in pratica clinica troviamo i fibrati, in particolare il fenofibrato e gli acidi grassi polinsaturi omega-3.

### Fenofibrato

Il fenofibrato è un agonista del recettore attivato dai proliferatori dei perossisomi alfa (PPAR- $\alpha$ ), un fattore di trascrizione che influenza molteplici vie metaboliche. L'attivazione del PPAR- $\alpha$  è nota per ridurre i trigliceridi, aumentare il colesterolo HDL, incrementare le dimensioni delle particelle LDL rendendole meno aterogene e ridurre l'infiammazione (15). Il fenofibrato è stato studiato in numerosi trial clinici, tra cui l'ACCORD Lipid Trial, che ha coinvolto oltre 5000 soggetti con diabete di tipo 2 in trattamento con statine (23). Il trial ha dimostrato una riduzione dei trigliceridi e un aumento del colesterolo HDL, ma non ha raggiunto l'outcome primario di riduzione degli eventi cardiovascolari maggiori (MACE) mostrando solo una tendenza protettiva ma non significativa di riduzione dell'8% dei MACE (23). Le meta-analisi dei trial clinici sull'uso dei fibrati (principalmente fenofibrato e a seguire bezafibrato e gemfibrozil) hanno poi confermato la riduzione significativa del rischio di MACE di circa il 10% (24). Tuttavia tale stima era condotta su popolazioni non adeguatamente selezionate, e al contrario, studi post-hoc di questi trial hanno confermato in maniera coerente che nei pazienti con dislipidemia aterogena (alti trigliceridi e basso colesterolo HDL, tipicamente definiti da TG > 200 mg/dl e HDL < 34 mg/dl), i fibrati hanno mostrato una riduzione significativa del rischio del 35% (25). Questo è stato confermato anche nell'ACCORD, dove il fenofibrato è stato testato in aggiunta alle statine (23, 26). Dati più recenti, con un follow-up esteso fino a 10 anni hanno poi ulteriormente confermato i benefici del fenofibrato nei pazienti con dislipidemia aterogena (26). Un discorso a parte va invece fatto per il pemafibrato, che a dispetto del nome non è un agonista classico del PPAR- $\alpha$  ma piuttosto un modulatore selettivo di PPAR- $\alpha$  con azioni farmacologiche diverse dai classici fibrati che ha dato esiti negativi nel recente studio PROMINENT e che verrà trattato in un paragrafo successivo (27). Il beneficio del fenofibrato è stato recentemente confermato in studi real-world su una coorte coreana di soggetti con sindrome metabolica trattati con statine (28). Gli autori hanno confrontato più di 2000 soggetti trattati con fibrato e statina con quelli trattati solo con statina. I pazienti sono stati abbinati 1 a 5 utilizzando un punteggio di propensione (propensity score matching) che ha permesso di tenere conto di tutti i fattori confondenti misurabili tipicamente presenti negli studi osservazionali. Dopo aver tenuto conto di questi fattori, con un follow-up medio di 29.7 mesi (SD 17.7 mesi), è stato riscontrato che il fenofibrato riduceva il rischio di futuri eventi cardiovascolari maggiori (MACE) con un hazard ratio di 0.74 (I.C. 95% 0.54-0.93).

### **Meccanismi d'azione del fenofibrato e studi di farmacogenetica**

Il meccanismo di protezione cardiovascolare del fenofibrato è in parte correlato alla riduzione dei trigliceridi, come mostrato in una meta-regressione che mostra come la riduzione del rischio cardiovascolare proporzionale osservato nei diversi trial con i fibrati classici si correla alla riduzione dei trigliceridi osservata negli stessi trial (19, 29). Tuttavia, le modifiche del profilo lipidico osservate in questi trial, spiegano solo parzialmente l'efficacia cardiovascolare dei fibrati (29). Probabilmente l'effetto antinfiammatorio del fenofibrato potrebbe contribuire ulteriormente alla sua efficacia cardiovascolare (30). Un ulteriore conferma del meccanismo di azione indipendente dalla risposta ipolipemizzante deriva da studi di farmacogenetica (31). Ad esempio, in una analisi post-hoc dello studio ACCORD, è stata riscontrata la presenza di varianti genetiche comuni localizzate nel locus di PPAR- $\alpha$  che sono in grado di identificare soggetti con diabete di tipo 2 caratterizzati da una marcata riduzione degli eventi cardiovascolari se trattati con fenofibrato (31). In questo studio infatti i portatori del genotipo T/T della variante rs6008845 (ossia circa un terzo della popolazione arruolata nello studio) avevano una riduzione dei MACE del 49% (HR 0.51; 95% CI 0.34-0.72  $p < 0.001$ ), mentre i soggetti portatori degli altri genotipi non avevano un beneficio cardiovascolare. Risultati analoghi sono stati osservati dall'analisi di studi osservazionali in pazienti trattati con fenofibrato e statina in altre coorti, validando pertanto tale risposta farmacogenetica. Un aspetto interessante è che la risposta ipolipemizzante era invariata tra i vari genotipi e la risposta protettiva del fenofibrato nei soggetti T/T si osservava anche in presenza di valori trigliceridi nella norma. A sostenere pertanto la teoria per cui l'effetto protettivo cardiovascolare del fenofibrato vada oltre la semplice riduzione dei trigliceridi. Alcune analisi aggiuntive hanno poi permesso di ipotizzare una possibile diversa risposta antinfiammatoria tra i diversi genotipi, e che potrebbero spiegare questa modulazione genetica (31). Questi dati sono attualmente in fase di nuove analisi sul database ACCORD e su un trial clinico farmacogenetico disegnato ad-hoc e attualmente in corso presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova (NCT0542147) e con studi in vitro in corso presso l'Università di Chieti-Pescara, i cui risultati sono attesi entro il 2025.

Va inoltre sottolineato come la terapia con fenofibrato sia anche in grado di ridurre la progressione della retinopatia diabetica (indicazione per cui il farmaco è attualmente approvato in paesi come l'Australia e la Nuova Zelanda), con un meccanismo anch'esso indipendente dal profilo lipidico di partenza e non solo giustificabile dalle variazioni del profilo lipidico plasmatico (32-34). Questo dato è stato confermato nel recentissimo trial clinico LENS, che ha randomizzato a fenofibrato o placebo pazienti con diabete di tipo 1 o 2 e con iniziale retinopatia diabetica. L'outcome primario era la progressione della retinopatia o maculopatia. Dopo una mediana di 4 anni si è osservata una riduzione significativa degli eventi nel gruppo trattato con fenofibrato (HR 0.73; IC 95% 0.58 to 0.91;  $p = 0.006$ ) con un NNT di 15 (35). Va sottolineato infine come la terapia con fenofibrato ha anche alcuni spiccati effetti a livello renale (23, 36-39). Da un lato l'inizio della terapia si caratterizza da un aumento della creatinina e riduzione dell'eGFR, aspetto che tuttavia tende a regredire con un effetto protettivo sulla riduzione dell'eGFR nel lungo termine (ossia con un deep iniziale, che tuttavia può essere fino al 15%, che viene poi recuperato e completamente reversibile alla sospensione della terapia) (40-41). Lo studio ACCORD ha inoltre documentato una riduzione dell'insorgenza di albuminuria nei pazienti trattati con fenofibrato rispetto a placebo (23), con studi di real-world che confermano il possibile ruolo protettivo a livello renale del fenofibrato (43). Nel complesso quindi gli effetti protettivi del fenofibrato potrebbero andare oltre la semplice riduzione della trigliceridemia e coinvolgere diversi meccanismi di azione non ancora scoperti completamente.

### **Omega-3 e acido eicosapentaenoico (EPA)**

Gli acidi grassi omega-3 sono l'altra classe di farmaci ampiamente utilizzati per il loro effetto ipotrigliceridemizzante. Gli omega-3 sono stati studiati per lungo tempo per i loro potenziali benefici cardiovascolari. Tuttavia, i risultati complessivi riguardanti i benefici cardiovascolari degli omega-3 sono stati generalmente ridotti o nulli, dimostrando una mancanza di beneficio in popolazioni non selezionate e trattate con dosaggi variabili di omega-3 (44). In questo contesto l'icosapent etile è un acido eicosapentaenoico (EPA) che si distingue per aver mostrato netti benefici cardiovascolari significativi in alcuni trial clinici specifici ed in particolare nello studio REDUCE-IT (45).

Il trial REDUCE-IT ha incluso 8179 pazienti trattati con statine che presentavano livelli elevati di trigliceridi ( $\geq 135$  mg/dL e  $< 500$  mg/dL) e che avevano un rischio cardiovascolare aumentato. I partecipanti sono stati randomizzati per ricevere 4 grammi al giorno di icosapent etile (IPE, una forma purificata di EPA) o un placebo. I criteri di inclusione prevedevano anche un livello di colesterolo LDL tra 40 e 100 mg/dL, una storia di aterosclerosi o diabete mellito con almeno un altro fattore di rischio cardiovascolare. Lo studio ha seguito i partecipanti per una mediana di 4.9 anni, con un massimo di 6.2 anni di follow-up (45). L'obiettivo primario era la riduzione degli eventi cardiovascolari maggiori, inclusi morte cardiovascolare, infarto miocardico non fatale, ictus non fatale, rivascolarizzazione coronarica o angina instabile che richiedeva ospedalizzazione. I risultati hanno mostrato una significativa riduzione degli eventi cardiovascolari nel gruppo trattato con icosapent etile (IPE) rispetto al placebo, con una riduzione relativa del rischio del 25% per l'endpoint primario e del 26% per l'endpoint secondario chiave (45). Un altro studio significativo è il JELIS, che ha dimostrato i benefici dell'EPA nella riduzione degli eventi cardiovascolari (46). Questo studio open-label ha coinvolto oltre 18.000 pazienti e ha mostrato una riduzione significativa del rischio cardiovascolare nei pazienti trattati con EPA in aggiunta alla terapia standard con statine. Tuttavia, il limite principale dello studio JELIS è rappresentato dal suo disegno open-label.

### **Meccanismi di azione omega-3 e EPA**

Gli omega-3 esercitano benefici cardiovascolari attraverso molteplici meccanismi ancora non del tutto compresi. Un importante meccanismo d'azione degli omega-3 è mediato dal recettore attivato dai proliferatori perossisomiali di tipo alfa (PPAR- $\alpha$ ) e in parte anche di tipo gamma (PPAR-g). Gli omega-3, come EPA e DHA, attivano PPAR- $\alpha$ , e questa attivazione porta alla riduzione dell'infiammazione e al miglioramento del profilo lipidico (47). Studi in vitro e su modelli animali hanno infatti dimostrato che l'EPA ossidato, inibisce significativamente l'adesione dei neutrofili e dei monociti alle cellule endoteliali attraverso l'attivazione di PPAR- $\alpha$ , riducendo così il processo infiammatorio cronico a livello (48). Il meccanismo e i possibili mediatori alla base dell'azione cardiovascolare dell'EPA e in particolare dell'IPE sono stati indagati nel trial REDUCE-IT. Come previsto, è stata osservata una riduzione dei trigliceridi e del colesterolo non-HDL, oltre a una riduzione del colesterolo LDL, sebbene questa fosse principalmente dovuta a un aumento maggiore nel gruppo placebo, dove il colesterolo LDL è aumentato dell'11%. È importante notare che l'efficacia dell'EPA non era correlata ai livelli di trigliceridi al basale o ai livelli di trigliceridi raggiunti durante il trial. Tuttavia, i benefici erano più pronunciati tra coloro con dislipidemia aterogena, sebbene non interamente spiegabili solo dai cambiamenti lipidici. Altri possibili benefici potrebbero derivare dall'azione antinfiammatoria, come dimostrato dalla riduzione della proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP), e dall'azione antitrombotica, evidenziata dalla tendenza verso un lieve aumento degli eventi emorragici nel braccio trattato con EPA (44). In sintesi, l'EPA riduce il rischio cardiovascolare nella prevenzione secondaria o nei pazienti diabetici con ipertrigliceridemia attraverso diversi meccanismi di azione e i benefici osservati nel trial REDUCE-IT, rispetto ai precedenti studi sugli acidi grassi omega-3, potrebbero essere dovuti 1. certamente ad una accurata selezione dei pazienti, 2. all'uso specifico di IPE, con rapporti preliminari (presentati a convegni internazionali ma non ancora pubblicati), che suggeriscono una relazione tra i livelli di IPE durante il trattamento e la riduzione del rischio cardiovascolare, probabilmente attraverso la stabilizzazione delle placche, 3. alle dosi elevate utilizzate (2 compresse da 1000 mg per due volte al giorno), 4. alcuni dubbi riguardano l'uso di olio minerale come placebo, che ha un effetto non neutro sul profilo CV, aumentando i livelli di colesterolo LDL, e in parte questo potrebbe aver favorito i migliori risultati del gruppo trattato con IPE. È tuttavia molto improbabile che questo spieghi tutti i benefici osservati e al massimo potrebbe aver solo di poco migliorato la stima del beneficio complessivo, che è bene ricordare fosse non solo sul versante cardiovascolare ma anche sulla mortalità.

### **Pemafibrato e studio Prominent**

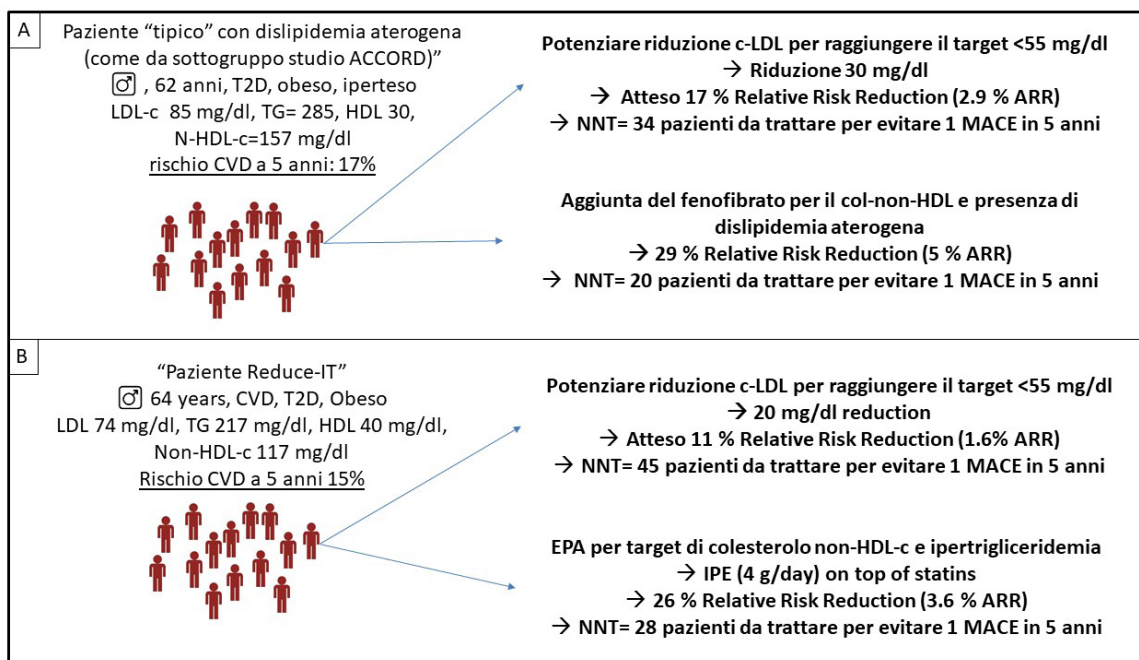
Nel considerare l'utilizzo delle terapie per ridurre i trigliceridi è essenziale fare riferimento ai recenti dati negativi dello studio di outcome cardiovascolare PROMINENT, che ha valutato l'azione del pemafibrato (27). Il pemafibrato è un farmaco di nuova generazione, che a differenza dei fibrati "classici" non è un classico agonista di PPAR- $\alpha$  ma piuttosto un Modulatore Selettivo di PPAR-alpha - SPPARMs (49). Inizialmente sviluppato e testato in studi di fase II e III per la

sua efficacia sul profilo lipidico con riduzione TG e incremento HDL, simili o superiori al fenofibrato, era caratterizzato da minor effetti avversi epatici (minor rialzo delle transaminasi) e minor effetti renali (assenza del deep iniziale della VFG osservata invece con il fenofibrato) (49). Nonostante queste premesse lo studio PROMINENT che ne ha indagato gli effetti cardiovascolari ha mostrato dati neutri sul profilo cardiovascolare. Lo studio PROMINENT (Pema-fibrate to Reduce Cardiovascular Outcomes by Reducing Triglycerides in Patients with Diabetes) è stato uno studio clinico di fase 3 progettato per valutare l'efficacia di pema-fibrato nella riduzione degli eventi cardiovascolari nei pazienti con diabete di tipo 2 e dislipidemia. Lo studio ha arruolato circa 10.000 partecipanti con livelli di trigliceridi moderatamente elevati (200-499 mg/dL) e bassi livelli di colesterolo HDL ( $\leq 40$  mg/dL) che stavano già ricevendo terapia con statine a intensità moderata o elevata. I partecipanti sono stati randomizzati per ricevere pema-fibrato (0.2 mg due volte al giorno) o placebo, con un periodo di follow-up medio previsto di 3,75 anni. L'obiettivo primario era un endpoint composito che includeva infarto miocardico non fatale, ictus ischemico non fatale, ospedalizzazione per angina instabile con necessità di rivascolarizzazione coronarica urgente e morte cardiovascolare. I risultati dello studio hanno mostrato che, sebbene pema-fibrato abbia ridotto i livelli di trigliceridi, incrementato HDLc e ridotto APO-C3, non ha portato a una riduzione degli eventi cardiovascolari rispetto al placebo (HR 1.03, IC 95% 0.91-1.15) (27). Tuttavia lo studio ha osservato che non vi era riduzione dei valori circolanti di apo-B che anzi aumentavano significativamente con il pema-fibrato, pertanto la ricerca ha nuovamente suggerito che la riduzione dei trigliceridi per sé non ha un impatto significativo sull'incidenza di eventi cardiovascolari se ottenuto con farmaci che peggiorano i valori di ApoB. Le differenze tra il pema-fibrato e il fenofibrato sono anche a livello molecolare con una selettività del pema-fibrato per PPAR-alpha circa 2500 volte maggiore rispetto al fenofibrato (49), con meccanismi di eliminazione diversi e appunto con diversi effetti renali (potenzialmente protettivi del fenofibrato, al netto dell'incremento iniziale della creatinina, e neutri del pema-fibrato). Pertanto, come per altre classi di farmaci (ad esempio i glitazoni, con le differenze tra pioglitazone vs rosiglitazone), bisogna porre molta attenzione prima di utilizzare i dati del Prominent per sminuire i dati precedenti del fenofibrato. Il fenofibrato appare ben diverso farmacologicamente e anche nei risultati dei trial clinici, dal pema-fibrato e potrebbe ancora svolgere un ruolo importante nei pazienti diabetici con ipertrigliceridemia.

#### **L'effetto sui MACE dei EPA e fenofibrato è clinicamente rilevante?**

Fermo restando i dati e limiti sopra elencati, attualmente le linee guida EAS 2019 (le ultime disponibili per le dislipidemie), ESC 2021 (per la prevenzione cardiovascolare) e anche le americane come 2022 AACE/ACE Endocrine Practice, suggeriscono l'utilizzo degli acidi grassi polinsaturi omega-3 (e in particolare l'IPE) o fenofibrato per ridurre i trigliceridi una volta che si è controllato il colesterolo LDL (16, 50-51). Le evidenze nelle varie linee guida sono considerate di classe II, e di tipo "A" per l'IPE (trial clinico mirato e con raggiungimento degli obiettivi primari) e "B" (risultati confermati in diversi studi post-hoc di trial clinici, ma senza un RCTs mirato e disegnato ad-hoc). Detto ciò, un aspetto rilevante è cercare di capire quello che potrebbe essere l'impatto clinico dell'aggiunta di queste terapie nel trattamento di un paziente con diabete di tipo 2 e ad elevato rischio cardiovascolare. Impatto clinico che si può misurare, tra le diverse scale, con il numero di pazienti che devono essere trattati per ridurre un evento cardiovascolare (NNT, che più basso è meglio è). Per fare queste stime per il fenofibrato e l'IPE, si possono prendere quindi a riferimento, rispettivamente i pazienti con dislipidemia aterogena (HDL < 34 mg/dl e TG > 204 mg/dl) dello studio ACCORD e i pazienti inclusi nello studio REDUCE-IT. Come riassunto in figura 3, pannello A, si può stimare che nella popolazione presa in esame, con un rischio CV a 5 anni del 17%, l'aggiunta della terapia con fenofibrato porterebbe ad una riduzione del rischio assoluto del 5% con un NNT a 5 anni pari a 20. Per confronto la stessa popolazione (che partiva da cLDL 85 mg/dl) l'ottimizzazione del colesterolo LDL (che deve restare l'obiettivo primario) produrrebbe un NNT pari a 34. Nella figura 3 pannello B sono rappresentate le stime per l'IPE con un NNT pari a 28, rispetto ad esempio ad un NNT di 45 dell'intensificazione del colesterolo LDL. Nel totale quindi, fermo restando la priorità del raggiungere i target di cLDL che sono supportati dalle massime evidenze, l'utilizzo di fenofibrato o IPE (quando sarà disponibile in Italia) rappresentano un armamentario di cui non dimenticarsi per ottimizzare la terapia di prevenzione cardiovascolare.

**Figura 3** ♦ **Stima dell’impatto clinico potenziale nel trattamento con fenofibrato o Icosapent Etile nei pazienti adeguatamente selezionati e sulla base dei risultati dello studio ACCORD e REDUCE-IT**



## CONCLUSIONI

Una strategia di prevenzione cardiovascolare comprensiva deve includere anche la valutazione dell’ipertrigliceridemia. In attesa dei farmaci in via di sviluppo (su nuovi target molecolari ad esempio APO-C3, ANGPTL-3 e ANGPTL4), i trattamenti con Icosapent Etile (IPE) e fenofibrato hanno dimostrato di ridurre significativamente gli eventi cardiovascolari nei pazienti con livelli elevati di trigliceridi, se indirizzati su pazienti ben selezionati. I meccanismi d’azione di questi trattamenti vanno oltre la semplice riduzione dei trigliceridi, includendo effetti antinfiammatori e altri effetti ancora non completamente conosciuti. Grazie ai dati dello studio REDUCE-IT, l’IPE ha una classe di evidenza migliore rispetto al fenofibrato, ma non è ancora disponibile ad oggi in regime di rimborsabilità in Italia. Nel frattempo nelle popolazioni ben selezionate (ipertrigliceridemia e con HDL basse) è bene considerare l’utilizzo del fenofibrato per ridurre il rischio cardiovascolare (e forse di progressione del danno micro-vascolare, retinopatia in primis). Tutto ciò senza dimenticare di ottimizzare la terapia diabetologica (con farmaci cardio-nefroprotettivi) e la concomitante terapia, farmacologica e non, per il controllo degli alti fattori di rischio cardiovascolari.

## BIBLIOGRAFIA

1. Rawshani A, Rawshani A, Franzen S, Sattar N, Eliasson B, Svensson AM, Zethelius B, Miftaraj M, McGuire DK, Rosengren A, Gudbjornsdottir S. Risk Factors, Mortality, and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2018; 379:633-644.
2. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1998; 339:229-234.
3. Juutilainen A, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Type 2 diabetes as a “coronary heart disease equivalent”: an 18-year prospective population-based study in Finnish subjects. *Diabetes Care.* 2005; 28:2901-2907.
4. Rawshani A, Rawshani A, Gudbjornsdottir S. Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2017; 377:300-301.

5. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2000; 106:453-458.
6. Vekic J, Stromsnes K, Mazzalai S, Zeljkovic A, Rizzo M, Gambini J. Oxidative Stress, Atherogenic Dyslipidemia, and Cardiovascular Risk. *Biomedicines*. 2023; 11.
7. Shahwan MJ, Jairoun AA, Farajallah A, Shanabli S. Prevalence of dyslipidemia and factors affecting lipid profile in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr*. 2019; 13:2387-2392.
8. Kosiborod M, Gomes MB, Nicolucci A, Pocock S, Rathmann W, Shestakova MV, Watada H, Shimomura I, Chen H, Cid-Ruzafa J, Fenici P, Hammar N, Surmont F, Tang F, Khunti K, investigators D. Vascular complications in patients with type 2 diabetes: prevalence and associated factors in 38 countries (the DISCOVER study program). *Cardiovasc Diabetol*. 2018; 17:150.
9. Morieri ML, Avogaro A, Fadini GP, the D-TDNotIDS. Cholesterol lowering therapies and achievement of targets for primary and secondary cardiovascular prevention in type 2 diabetes: unmet needs in a large population of outpatients at specialist clinics. *Cardiovasc Diabetol*. 2020; 19:190.
10. Parks EJ, Hellerstein MK. Carbohydrate-induced hypertriglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71:412-433.
11. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 2003; 46:733-749.
12. Nikkila EA, Huttunen JK, Ehnholm C. Postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase in diabetes mellitus. Relationship to plasma triglyceride metabolism. *Diabetes* .1977; 26:11-21.
13. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Bajaj M, Mandarino L, DeFronzo R, Cusi K. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52:2461-2474.
14. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Boren J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ, Catapano AL. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017; 38:2459-2472
15. Laufs U, Parhofer KG, Ginsberg HN, Hegele RA. Clinical review on triglycerides. *Eur Heart J* 2020; 41:99-109c.
16. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Wiklund O, Group ESCSD. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020; 41:111-188.
17. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant Cholesterol as a Causal Risk Factor for Ischemic Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013; 61:427-436.
18. Chen CH, Lu J, Chen SH, Huang RY, Yilmaz HR, Dong J, Elayda MA, Dixon RA, Yang CY. Effects of electronegative VLDL on endothelium damage in metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2012; 35:648-653.
19. Nordestgaard BG, Varbo A. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet*. 2014; 384:626-635.
20. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Elevated remnant cholesterol causes both low-grade inflammation and ischemic heart disease, whereas elevated low-density lipoprotein cholesterol causes ischemic heart disease without inflammation. *Circulation*. 2013; 128:1298-1309.
21. Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, Ginsberg HN, Chapman MJ, Packard CJ, Laufs U, Oliver-Williams C, Wood AM, Butterworth AS, Di Angelantonio E, Danesh J, Nicholls SJ, Bhatt DL, Sabatine MS, Catapano AL. Association of Triglyceride-Lowering LPL Variants and LDL-C-Lowering LDLR Variants With Risk of Coronary Heart Disease. *JAMA*. 2019; 321:364-373.
22. Vallejo-Vaz AJ, Fayyad R, Boehholdt SM, Hovingh GK, Kastelein JJ, Melamed S, Barter P, Waters DD, Ray KK. Triglyceride-Rich Lipoprotein Cholesterol and Risk of Cardiovascular Events Among Patients Receiving Statin Therapy in the TNT Trial. *Circulation*. 2018; 138:770-781.

23. Group AS, Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, Crouse JR, 3rd, Leiter LA, Linz P, Friedewald WT, Buse JB, Gerstein HC, Probstfield J, Grimm RH, Ismail-Beigi F, Bigger JT, Goff DC, Jr., Cushman WC, Simons-Morton DG, Byington RP. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2010; 362:1563-1574.
24. Jun M, Foote C, Lv J, Neal B, Patel A, Nicholls SJ, Grobbee DE, Cass A, Chalmers J, Perkovic V. Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2010; 375:1875-1884.
25. Sacks FM, Carey VJ, Fruchart JC. Combination lipid therapy in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2010; 363:692-694; author reply 694-695.
26. Elam MB, Ginsberg HN, Lovato LC, Corson M, Largay J, Leiter LA, Lopez C, O'Connor PJ, Sweeney ME, Weiss D, Friedewald WT, Buse JB, Gerstein HC, Probstfield J, Grimm R, Ismail-Beigi F, Goff DC, Jr., Fleg JL, Rosenberg Y, Byington RP. Association of Fenofibrate Therapy With Long-term Cardiovascular Risk in Statin-Treated Patients With Type 2 Diabetes. *JAMA cardiology.* 2017; 2:370-380.
27. Das Pradhan A, Glynn RJ, Fruchart JC, MacFadyen JG, Zaharris ES, Everett BM, Campbell SE, Oshima R, Amarenco P, Blom DJ, Brinton EA, Eckel RH, Elam MB, Felicio JS, Ginsberg HN, Goudev A, Ishibashi S, Joseph J, Kodama T, Koenig W, Leiter LA, Lorenzatti AJ, Mankovsky B, Marx N, Nordestgaard BG, Páll D, Ray KK, Santos RD, Soran H, Susekov A, Tendera M, Yokote K, Paynter NP, Buring JE, Libby P, Ridker PM. Triglyceride Lowering with Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Risk. *N Engl J Med.* 2022; 387:1923-1934.
28. Kim NH, Han KH, Choi J, Lee J, Kim SG. Use of fenofibrate on cardiovascular outcomes in statin users with metabolic syndrome: propensity matched cohort study. *BMJ (Clinical research ed).* 2019; 366:l5125.
29. Asztalos BF, Collins D, Horvath KV, Bloomfield HE, Robins SJ, Schaefer EJ. Relation of gemfibrozil treatment and high-density lipoprotein subpopulation profile with cardiovascular events in the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Metabolism.* 2008; 57:77-83.
30. Belfort R, Berria R, Cornell J, Cusi K. Fenofibrate reduces systemic inflammation markers independent of its effects on lipid and glucose metabolism in patients with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95:829-836.
31. Morieri ML, Shah HS, Sjaarda J, Lenzini PA, Campbell H, Motsinger-Reif AA, Gao H, Lovato L, Prudente S, Pandolfi A, Pezzolesi MG, Sigal RJ, Pare G, Marcovina SM, Rotroff DM, Paterno E, Mercuri L, Trischitta V, Chew EY, Kraft P, Buse JB, Wagner MJ, Cresci S, Gerstein HC, Ginsberg HN, Mychaleckyj JC, Doria A. PPARA Polymorphism Influences the Cardiovascular Benefit of Fenofibrate in Type 2 Diabetes: Findings From ACCORD-Lipid. *Diabetes.* 2020; 69:771-783.
32. Chew EY, Davis MD, Danis RP, Lovato JF, Perdue LH, Greven C, Genuth S, Goff DC, Leiter LA, Ismail-Beigi F, Ambrosius WT. The effects of medical management on the progression of diabetic retinopathy in persons with type 2 diabetes: the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) Eye Study. *Ophthalmology.* 2014; 121:2443-2451.
33. Keech AC, Mitchell P, Summanen PA, O'Day J, Davis TM, Moffitt MS, Taskinen MR, Simes RJ, Tse D, Williamson E, Merrifield A, Laatikainen LT, d'Emden MC, Crimet DC, O'Connell RL, Colman PG, investigators Fs. Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007; 370:1687-1697.
34. Group AS, Group AES, Chew EY, Ambrosius WT, Davis MD, Danis RP, Gangaputra S, Greven CM, Hubbard L, Esser BA, Lovato JF, Perdue LH, Goff DC, Jr., Cushman WC, Ginsberg HN, Elam MB, Genuth S, Gerstein HC, Schubart U, Fine LJ. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2010; 363:233-244
35. Preiss D, Logue J, Sammons E, Zayed M, Emberson J, Wade R, Wallendszus K, Stevens W, Cretney R, Harding S, Leese G, Currie G, Armitage J. Effect of Fenofibrate on Progression of Diabetic Retinopathy. *NEJM Evid.* 2024; Jun 21:EVIDo2400179.
36. Jun M, Zhu B, Tonelli M, Jardine MJ, Patel A, Neal B, Liyanage T, Keech A, Cass A, Perkovic V. Effects of fibrates in kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 60:2061-2071.
37. Ferreira JP, Vasques-Nóvoa F, Ferrão D, Saraiva F, Falcão-Pires I, Neves JS, Sharma A, Rossignol P, Zannad F, Leite-Moreira A. Fenofibrate and Heart Failure Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes: Analysis From ACCORD. *Diabetes Care.* 2022; 45:1584-1591.

38. Yaribeygi H, Mohammadi MT, Rezaee R, Sahebkar A. Fenofibrate improves renal function by amelioration of NOX-4, IL-18, and p53 expression in an experimental model of diabetic nephropathy. *Journal of cellular biochemistry*. 2018; 119:7458-7469.
39. Jenkins AJ, O'Connell RL, Januszewski AS, Webster AC, T MED, Jardine MJ, Scott RS, Taskinen MR, Keech AC, Group FTS. Not enough known about fenofibrate's kidney effects in people with Type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2024; 210:111612.
40. Bonds DE, Craven TE, Buse J, Crouse JR, Cuddihy R, Elam M, Ginsberg HN, Kirchner K, Marcovina S, Mychaleckyj JC, O'Connor PJ, Sperl-Hillen JA. Fenofibrate-associated changes in renal function and relationship to clinical outcomes among individuals with type 2 diabetes: the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) experience. *Diabetologia*. 2012; 55:1641-1650.
41. Chauhan K, Nadkarni GN, Debnath N, Chan L, Saha A, Garg AX, Parikh CR, Coca SG. The Association of Fenofibrate with Kidney Tubular Injury in a Subgroup of Participants in the ACCORD Trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019; 14:1521-1523.
42. Frazier R, Mehta R, Cai X, Lee J, Napoli S, Craven T, Tuazon J, Safdi A, Scialla J, Susztak K, Isakova T. Associations of Fenofibrate Therapy With Incidence and Progression of CKD in Patients With Type 2 Diabetes. *Kidney international reports*. 2019; 4:94-102.
43. Yen CL, Fan PC, Lin MS, Lee CC, Tu KH, Chen CY, Hsiao CC, Hsu HH, Tian YC, Chang CH. Fenofibrate Delays the Need for Dialysis and Reduces Cardiovascular Risk Among Patients With Advanced CKD. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021; 106:1594-1605.
44. Aung T, Halsey J, Kromhout D, Gerstein HC, Marchioli R, Tavazzi L, Geleijnse JM, Rauch B, Ness A, Galan P, Chew EY, Bosch J, Collins R, Lewington S, Armitage J, Clarke R. Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77 917 Individuals. *JAMA cardiology*. 2018; 3:225-234.
45. Bhatt DL, Steg PG, Miller M, Brinton EA, Jacobson TA, Ketchum SB, Doyle RT, Jr., Juliano RA, Jiao L, Granowitz C, Tardif JC, Ballantyne CM, Investigators R-I. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med*. 2019; 380:11-22.
46. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet*. 2007; 369:1090-1098.
47. Francis GA, Annicotte JS, Auwerx J. PPAR-alpha effects on the heart and other vascular tissues. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003; 285:H1-9.
48. Sethi S, Ziouzenkova O, Ni H, Wagner DD, Plutzky J, Mayadas TN. Oxidized omega-3 fatty acids in fish oil inhibit leukocyte-endothelial interactions through activation of PPAR alpha. *Blood*. 2002; 100:1340-1346.
49. Yamashita S, Masuda D, Matsuzawa Y. Pemaifibrate, a New Selective PPAR $\alpha$  Modulator: Drug Concept and Its Clinical Applications for Dyslipidemia and Metabolic Diseases. *Current atherosclerosis reports*. 2020; 22:5.
50. Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, Carballo D, Koskinas KC, Bäck M, Benetos A, Biffi A, Boavida JM, Capodanno D, Cosyns B, Crawford C, Davos CH, Desormais I, Di Angelantonio E, Franco OH, Halvorsen S, Hobbs FDR, Hollander M, Jankowska EA, Michal M, Sacco S, Sattar N, Tokgozoglu L, Tonstad S, Tsioufis KP, van Dis I, van Gelder IC, Wanner C, Williams B. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*. 2021; 42:3227-3337.
51. Handelsman Y, Jellinger PS, Guerin CK, Bloomgarden ZT, Brinton EA, Budoff MJ, Davidson MH, Einhorn D, Fazio S, Fonseca VA, Garber AJ, Grunberger G, Krauss RM, Mechanick JI, Rosenblit PD, Smith DA, Wyne KL. Consensus Statement by the American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology on the Management of Dyslipidemia and Prevention of Cardiovascular Disease Algorithm - 2020 Executive Summary. *Endocrine practice: official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2020; 26:1196-1224.



a cura di Lucia Frittitta

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Catania

## Lipodistrofie: quando magro non è sinonimo di metabolicamente sano

### *Lipodystrophies: when thin is not synonymous of being metabolically healthy*

Lavinia Palladino<sup>1</sup>, Giovanni Ceccarini<sup>1</sup>, Donatella Gilio<sup>1</sup>, Silvia Magno<sup>1</sup>, Caterina Pelosini<sup>2</sup>, Melania Paoli<sup>2</sup>, Maria Rita Sessa<sup>2</sup>, Ferruccio Santini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Obesità e Lipodistrofie - UO Endocrinologia 1, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa;

<sup>2</sup>Laboratorio Chimica e Endocrinologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa

DOI: <https://doi.org/10.30682//ildia2402d>

#### ABSTRACT

*Lipodystrophy syndromes are rare, heterogeneous disorders with significant health impacts, compromising quality of life. Characterized by complete or partial adipose tissue deficiency, either congenital or acquired, they are often associated with low serum leptin levels and severe metabolic abnormalities like diabetes mellitus and dyslipidemia. Diagnosis is challenging due to phenotypic variability and low prevalence. Management requires a multidisciplinary approach, including lifestyle changes and may necessitate leptin replacement therapy.*

#### KEYWORDS

*Lipodystrophy, diabetes, dyslipidemia, leptin, adipose tissue.*

Le sindromi lipodistrofiche rappresentano un gruppo eterogeneo di malattie rare e complesse, caratterizzate dalla carenza di tessuto adiposo sottocutaneo, in assenza di uno stato di deprivazione nutrizionale o aumentato catabolismo. A partire dal diciannovesimo secolo hanno suscitato l'interesse dei clinici a causa della gravità e delle complicanze metaboliche ad esse associate (1-2).

In base all'entità della perdita del tessuto adiposo, riconosciamo forme generalizzate, quando sono interessati tutti i distretti corporei, e forme parziali, quando tale perdita è limitata ad alcune aree del corpo. In base all'eziologia vengono distinte forme congenite e forme acquisite (3). Le forme congenite possono essere trasmesse sia con modalità autosomica recessiva che dominante; le forme acquisite possono riconoscere una causa autoimmune, infiammatoria o iatrogena (4). Le quattro forme principali di lipodistrofia sono: la Lipodistrofia Generalizzata Congenita (LGC), la Lipodistrofia Parziale Familiare (LPF), la Lipodistrofia Generalizzata Acquisita (LGA) e la Lipodistrofia Parziale Acqui-

sita (LPA). Nel corso degli anni, la classificazione delle sindromi lipodistrofiche è diventata più ampia e complessa dal momento che nuovi sottotipi di malattia sono stati identificati (Tab. 1).

**Tabella 1** ♦ **Descrizione delle principali forme di lipodistrofia**

PATOLOGIA	SEGNI E SINTOMI	GENE COINVOLTO	TRASMISSIONE
<b>Lipodistrofia Generalizzata Congenita (LGC) o Sindrome di Berardinelli-Seip</b>	Assenza generalizzata di tessuto adiposo dalla nascita. Pseudoipertrofia muscolare. Ernia ombelicale. Acanthosis nigricans. PCOS, infertilità.	LGC1: <i>AGPAT2</i>	Autosomica recessiva
		LGC2: <i>BSCL2</i>	
		LGC3: <i>CAV1</i>	
		LGC4: <i>PTRF</i>	
		Altri sottotipi: <i>LMNA</i> , <i>PPARG</i> e <i>PCYT1A</i>	
<b>Lipodistrofia Generalizzata Acquisita (LGA) o Sindrome di Lawrence</b>	Perdita generalizzata di tessuto adiposo rapida o graduale che si verifica spesso nell'infanzia. Può associarsi a malattie autoimmuni e in 1/3 dei casi può essere preceduta da panniculite.		
<b>Lipodistrofia Parziale Familiare (LPF)</b>	Perdita del tessuto adiposo nelle parti inferiori del corpo (arti e tronco). Accumulo di tessuto a livello del volto e del collo. Acanthosis nigricans PCOS, alterazione del ciclo mestruale.	LPF1- Sindrome di Köbberling: poligenica	
		LPF2 - Sindrome di Dunnigan: <i>LMNA</i>	Autosomica dominante
		LPF3: <i>PPARG</i>	Autosomica dominante
		LPF4: <i>PLIN1</i>	Autosomica dominante
		LPF5: <i>CIDEA</i>	Autosomica recessiva
		LPF6: <i>LIPE</i>	Autosomica recessiva
<b>Lipodistrofia Parziale Acquisita (LPA) o Sindrome di Barraquer-Simons</b>	Perdita del tessuto adiposo nella parte superiore del corpo (viso e collo, parte superiore del tronco). Il tessuto adiposo è preservato a livello dei fianchi e delle estremità inferiori. Può essere associata a malattie autoimmuni, ridotti livelli della frazione C3 del complemento. Possibile danno renale (glomerulonefrite membranoso-proliferativa)		
<b>Sindromi progeroidi</b>	Invecchiamento precoce. Bassa statura. Sclerodermatosi. Alopecia, capelli canuti. Affollamento dentale. Massa muscolare ridotta. Altre malformazioni.	<i>LMNA</i> , <i>POLD1</i> , <i>WRN</i> , <i>PIK3R</i>	Autosomica dominante

Un'altra caratteristica delle lipodistrofie è la riduzione dei livelli circolanti di leptina, un ormone prodotto principalmente dal tessuto adiposo bianco, la cui concentrazione sierica è direttamente proporzionale alla quantità di grasso sottocutaneo. La leptina svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi energetica e la sua carenza è associata alla comparsa di iperfagia e al conseguente aumento dell'introito calorico.

Dal punto di vista patogenetico, la lipodistrofia condivide con l'obesità l'incapacità di accogliere riserve energetiche in eccesso da parte dei depositi adiposi. Nello specifico, nei soggetti lipodistrofici viene a mancare la capacità del tessuto adiposo di accumulare un surplus energetico anche a fronte di apporti calorici minimi (5). In entrambi i casi la conseguenza è un accumulo di lipidi in sedi ectopiche quali fegato, muscolo, rene, pancreas, con insorgenza di complicanze metaboliche quali resistenza insulinica e diabete mellito, steatosi epatica, dislipidemia (in modo particolare ipertrigliceridemia grave), ipertensione arteriosa e sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) (2).

In assenza di un adeguato trattamento, queste alterazioni metaboliche possono progredire verso comorbidità più gravi come la pancreatite acuta ricorrente, la cirrosi epatica, l'insufficienza renale e le malattie cardiovascolari.

I soggetti lipodistrofici, inoltre, presentano un'aumentata prevalenza di disturbi dell'umore, d'ansia e della condotta alimentare (6). La prevalenza mondiale delle forme generalizzate di lipodistrofia è pari a 3 casi per milione di abitanti mentre nelle forme parziali risulta essere maggiore (2-7).

## LIPODISTROFIE SU BASE GENETICA

Grazie ai recenti progressi nella comprensione dei sottotipi di lipodistrofia e nell'individuazione di nuovi geni responsabili di malattia, queste sindromi vengono oggi riconosciute e diagnosticate più frequentemente (8).

Le lipodistrofie su base genetica comprendono la Lipodistrofia Generalizzata Congenita (LGC) o Sindrome di Berardinelli-Seip, le Lipodistrofie Parziali Familiari (LPF) e le Sindromi Progeroidi.

### Lipodistrofia Generalizzata Congenita (LGC)

La LGC è caratterizzata dalla presenza di anomalie fenotipiche dalla nascita o dall'età infantile e dalla precoce insorgenza di complicanze metaboliche gravi.

Si tratta di una malattia a trasmissione autosomica recessiva che coinvolge principalmente quattro geni distinti, identificando così diversi sottotipi di malattia con caratteristiche cliniche peculiari.

I sottotipi di LGC più frequenti sono il tipo 1 e il tipo 2 (2).

La LGC di tipo 1 è causata da mutazioni nel gene *AGPAT2*, principalmente espresso nel tessuto adiposo, che codifica per un enzima coinvolto nella biosintesi dei trigliceridi. La LGC di tipo 2 è causata da mutazioni nel gene *BSCL2* che codifica per la seipina, una proteina coinvolta nella formazione delle gocce lipidiche e nel processo di differenziamento adipocitario. *BSCL2* è espresso principalmente nel tessuto adiposo e nel sistema nervoso centrale. La LGC tipo 2 presenta solitamente complicanze metaboliche più gravi rispetto agli altri sottotipi di malattia, livelli di leptina più bassi, un'insorgenza precoce del diabete con ritardo mentale e deficit neurologico (9); in particolare, alcune varianti possono essere associate ad encefalopatia a decorso letale nella prima infanzia (10).

Le LGC di tipo 3 e di tipo 4 sono sottotipi di malattia meno frequenti e sono rispettivamente causati da mutazioni a carico dei geni *CAV1* e *PTRF*, che codificano per proteine coinvolte nella formazione delle caveole, strutture importanti per il trasferimento di lipidi all'interno del vacuolo adipocitario. La LGC3 è una forma molto rara e si associa a bassa statura. La LGC4 è associata a miopia congenita e manifestazioni metaboliche più lievi.

Sebbene ogni sottotipo presenti caratteristiche peculiari, tutte le forme di LGC sono accomunate dalla precocità della perdita del tessuto adiposo, che di solito si manifesta alla nascita o durante il primo anno di vita e da livelli sierici di leptina e adiponectina tipicamente molto bassi, spesso indosabili (11-12). Caratteristiche comuni a tutti i sottotipi di malattia sono la pseudoipertrofia muscolare, l'apparente flebomegalia, l'acanthosis nigricans e l'epatomegalia. Una fame costante è inoltre frequente fin dalla prima infanzia (13-14).

### Lipodistrofia Parziale Familiare (LPF)

Le lipodistrofie parziali familiari (LPF) si presentano con modalità di trasmissione autosomica dominante e sono dovute a mutazioni a carico di numerosi geni, molti dei quali coinvolti nei processi di adipogenesi e lipogenesi. Durante l'infanzia gli individui affetti presentano una distribuzione del grasso corporeo apparentemente normale e può risultare difficile identificarli. È in seguito alla pubertà che sviluppano una progressiva perdita del tessuto adiposo sottocutaneo a partire dalle estremità, con una riduzione variabile a livello del torace e dell'addome. Molti pazienti, soprattutto di genere femminile, presentano un incremento di tessuto adiposo a livello del volto, del collo ed in sede intraddominale; in particolare, l'accumulo adiposo in sede dorsocervicale, sopraclavicolare e sottomentoniera conferisce a questi pazienti un aspetto cushingoide, tanto da rendere necessaria la diagnosi differenziale (15-16).

Rispetto ad altre forme di lipodistrofia, i pazienti con LPF hanno livelli di leptina e di adiponectina parzialmente ridotti, dato che la perdita di tessuto adiposo è limitata ad alcuni distretti corporei.

In età adulta compaiono solitamente le complicanze metaboliche come diabete insulino-resistente, steatosi epatica, ipertrigliceridemia, bassi livelli di HDL ed aumentato rischio cardiovascolare (3).

Nel sesso maschile la diagnosi è sottostimata dal momento che la struttura fisica degli uomini rende meno evidente il fenotipo di malattia. I disturbi metabolici sono meno frequenti rispetto al genere femminile e viene meno il campanello di allarme per generare il sospetto diagnostico.

Le principali forme di LPF sono rappresentate dalla sindrome di Köbberling (LPF1), dalla sindrome di Dunnigan (LPF2) e dalla LPF3.

La sindrome di Köbberling, o LPF di tipo 1, si presenta con perdita di tessuto adiposo a livello dei glutei e degli arti inferiori che si manifesta già durante l'infanzia e la pubertà. Nelle donne diventa più evidente nel periodo post-menopausale. La riduzione di tessuto adiposo nei distretti corporei inferiori è associata ad un accumulo di massa grassa di entità variabile a livello del tronco e occasionalmente a livello del volto e del collo. Un altro elemento suggestivo può essere la presenza di una scanalatura al confine tra tronco e regione glutea e sotto il deltoide/tricipite, espressione di una brusca transizione tra un'area dove il tessuto adiposo è normalmente rappresentato ed una in cui è assente. Le complicanze metaboliche si presentano nella prima età adulta e includono insulino-resistenza, ipertrigliceridemia anche di grave entità, malattia coronarica e pancreatite acuta. Porre diagnosi di LPF di tipo 1 è difficile perché nelle donne può essere confusa con l'obesità centrale associata alla sindrome metabolica. Dal punto di vista eziologico, sebbene inizialmente fosse considerata una forma dominante, non sono mai stati identificati specifici geni coinvolti ed oggi è ipotizzata una patogenesi poligenica (2).

Il fenotipo classico della LPF di tipo 2 o sindrome di Dunnigan è dovuto a mutazioni a carico dell'esone 8 del gene *LMNA*. La perdita di tessuto adiposo si verifica a livello degli arti, del tronco, dei fianchi e dei glutei e si manifesta intorno alla pubertà nelle donne, mentre spesso passa inosservata negli uomini. Questa forma si caratterizza per l'accumulo di grasso nel viso, nel collo, nella regione interscapolare, nell'area viscerale addominale e nel pube. La muscolatura è ben definita con pseudoipertrofia muscolare dei polpacci e apparente flebomegalia. Le complicanze comprendono insulino-resistenza precoce, spesso associata a marcata acanthosis nigricans, che può portare allo sviluppo di diabete mellito, ipertrigliceridemia grave, basso colesterolo HDL, steatosi epatica e un aumentato rischio di malattie cardiovascolari, cardiomiopatie e/o disturbi del sistema di conduzione cardiaca; non di rado le pazienti presentano un quadro di PCOS. Mutazioni in esoni diversi dall'esone 8 possono portare a forme atipiche di LPF di tipo 2, in cui la lipodistrofia talvolta è meno evidente (17-19).

Le mutazioni a carico del gene *LMNA* possono portare allo sviluppo di un ampio spettro di disturbi tessuto-specifici, collettivamente chiamati laminopatie che includono, oltre al sottotipo 2 delle LPF, alcune sindromi progeroidi ed alcune forme di distrofia muscolare, cardiomiopatia e neuropatia.

La LPF di tipo 3 è causata da mutazioni autosomiche dominanti nel gene *PPARG*.

La lipodistrofia compare in età adulta, in associazione a complicanze cardio-metaboliche generalmente gravi. Fenotipicamente questi pazienti presentano forme al confine tra la LPF1 e la LPF2 (20). Oltre alle forme elencate, ne esistono

di più rare come la LPF4 di cui sono responsabili mutazioni del gene *PLIN1*, la LPF5 causata da mutazioni del gene *CIDEA* e le forme 6 e 7 imputabili rispettivamente a mutazioni nei geni *LIPE* e *CAV1* (3).

### Sindromi progeroidi

Le lipodistrofie associate all'invecchiamento precoce sono estremamente variegata sia dal punto di vista clinico che genetico. Sebbene ogni tipo di sindrome abbia caratteristiche cliniche uniche, la maggior parte presenta manifestazioni comuni quali bassa statura, alopecia, ingrigimento precoce dei capelli, atrofia cutanea, sclerodermia, osteoporosi, acro-osteolisi, contratture articolari o rigidità articolare, ipoplasia mandibolare, affollamento dentale, riduzione della massa muscolare e pigmentazione irregolare della pelle (21-22).

Le sindromi progeroidi più rappresentate sono causate da mutazioni a carico di geni che codificano per proteine coinvolte nella riparazione del DNA o per la lamina nucleare.

Le progerie associate a mutazioni del gene *LMNA* comprendono la sindrome progeroide di Hutchinson-Gilford, la displasia mandibolo-acrale di tipo A e la sindrome progeroide atipica, che include la sindrome di Werner atipica (23-24). Tra i geni coinvolti nelle sindromi progeroidi troviamo inoltre il gene *POLD1*, responsabile della forma associata a ipoplasia mandibolare e sordità (25).

### LIPODISTROFIA ACQUISITA

I meccanismi patogenetici responsabili delle forme acquisite di lipodistrofia sono ancora oggi sconosciuti. Tuttavia, l'ipotesi più accreditata è che alla base del processo di perdita del tessuto adiposo ci sia un meccanismo autoimmune dal momento che la maggior parte dei pazienti affetti da LGA e LPA presentano un background clinico e/o biochimico riconducibile ad un quadro di autoimmunità. Tali forme si distinguono da quelle congenite perché alla nascita gli individui affetti presentano una normale distribuzione del grasso corporeo e non esiste una familiarità. In base all'entità della perdita di tessuto adiposo sottocutaneo possiamo distinguere forme di lipodistrofia generalizzata acquisita (LGA) e forme di lipodistrofia parziale acquisita (LPA).

La lipodistrofia generalizzata acquisita, conosciuta come Sindrome di Lawrence, ha un esordio più tardivo rispetto alla LGC (infanzia o adolescenza) ed è più comune nelle donne che negli uomini (rapporto 3:1). Spesso la perdita di tessuto adiposo può essere preceduta o seguita da manifestazioni autoimmuni come la dermatomiosite giovanile, la sindrome di Sjögren, l'epatite autoimmune, la tiroidite di Hashimoto, l'artrite reumatoide giovanile e il diabete mellito di tipo 1. Inizialmente la perdita di tessuto adiposo può interessare aree circoscritte e successivamente generalizzarsi nel corso di settimane, mesi o anni (26).

Le comorbidità più frequenti sono diabete insulino-resistente, ipertrigliceridemia grave e steatosi epatica. Questi individui non hanno storia familiare di lipodistrofia, mentre la familiarità per malattie autoimmuni può orientare nella diagnosi.

La lipodistrofia parziale acquisita comprende la sindrome di Barraquer-Simons e alcune forme su base iatrogena. La sindrome di Barraquer-Simons è una malattia molto rara caratterizzata da una graduale perdita simmetrica e bilaterale di tessuto adiposo sottocutaneo, che avviene in direzione cranio-caudale risparmiando la parte bassa dell'addome, i fianchi e gli arti inferiori (tanto è vero che si identifica anche come lipodistrofia cefalo-toracica). La LPA presenta una prevalenza maggiore nel sesso femminile (F:M=4:1) (27).

Benché una chiara patogenesi della LPA non sia ancora stata definita, è verosimile che alla base vi sia un meccanismo autoimmune dal momento che queste forme risultano frequentemente associate ad altre patologie autoimmuni; in alcuni casi la lipodistrofia si sviluppa a seguito di processi infettivi. È frequente il riscontro di bassi livelli del fattore del complemento C3 e la positività degli anticorpi antinucleo (ANA), anti-DNA e del fattore nefritico C3 (28).

Una buona percentuale di pazienti con LPA sviluppa glomerulonefrite membranosa-proliferativa (GNMP) che può condurre, in alcuni casi, all'insufficienza renale terminale con necessità di trapianto renale (29-30).

Una variante particolare di lipodistrofia è quella che si sviluppa in seguito al trattamento con radioterapia total-body e trapianto di cellule staminali ematopietiche. In questi pazienti la perdita di tessuto adiposo interessa gli arti e i glutei con preservazione del volto, del collo e dell'addome e tendenza all'accumulo di grasso a livello viscerale; inoltre è di frequente riscontro lo sviluppo di complicanze metaboliche quali insulino-resistenza fino al diabete mellito franco, ipertrigliceridemia ed epatosteatosi (31).

## DIAGNOSI

La presenza di lipodistrofia può essere sospettata in soggetti con assenza parziale o generalizzata di tessuto adiposo osservata all'esame obiettivo e validata mediante misure antropometriche come la plicometria e/o esami strumentali, tra cui l'assorbimetria a raggi X a doppia energia (DEXA) e la risonanza magnetica total-body. Sebbene non esistano criteri diagnostici stringenti basati su misurazioni delle pliche cutanee o su procedure di imaging, queste valutazioni possono essere utili ai fini della diagnosi. Il sospetto di lipodistrofia può essere avvalorato dalla presenza di specifiche caratteristiche fisiche ed anamnestiche e di particolari comorbidità quali ritardo della crescita, muscoli e vene prominenti, acanthosis nigricans grave, xantomi eruttivi, aspetto cushingoide o acromegaloide. Si può porre il sospetto anche in pazienti con diabete mellito di tipo 2 di difficile controllo, grave ipertrigliceridemia, epatomegalia steatosica o sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) (Tab. 2) in presenza di un'alterata distribuzione del tessuto adiposo.

I livelli circolanti di leptina, dosati in laboratori specializzati, possono avvalorare la diagnosi e/o indirizzare la scelta terapeutica. Analogamente alla leptina, i livelli circolanti di adiponectina sono ridotti sia nel modello animale che nei pazienti con lipodistrofia generalizzata o progeria e possono anch'essi orientare nella diagnosi (32).

Quando si ha un sospetto clinico ben definito, ci si può avvalere di specifici test genetici: la genotipizzazione può prevedere un sequenziamento limitato al gene candidato, laddove il fenotipo del paziente risulti chiaro, o ad un gruppo di geni mediante sequenziamento di nuova generazione laddove il fenotipo risulti sfumato o l'analisi del singolo gene presumibilmente candidato abbia dato un esito negativo. Può inoltre essere utile effettuare lo screening genetico dei membri della famiglia per identificare tutti i portatori e gli individui con possibili fenotipi attenuati.

**Tabella 2** ♦ **Caratteristiche di sospetto nel riconoscimento della lipodistrofia. Mod da (4)**

### **Caratteristica principale**

Assenza generalizzata o parziale di grasso corporeo

### **Caratteristiche fisiche**

Alterazione della crescita (neonati e bambini)

Pseudoipertrofia muscolare

Apparente flebomegalia

Xantomi eruttivi

Acanthosis nigricans

Aspetto cushingoide

Aspetto acromegaloide

Aspetto progeroide

### **Comorbidità**

Diabete mellito con elevato fabbisogno insulinico

Grave ipertrigliceridemia

Epatomegalia steatosica in un individuo non obeso

Cardiomiopatia ad esordio precoce

PCOS

Pancreatiti ricorrenti

### **Altro**

Iperfagia

Familiarità per una simile conformazione corporea

La diagnosi differenziale include diverse condizioni che si presentano con grave calo ponderale (malnutrizione, anoressia nervosa, diabete mellito non controllato, tireotossicosi, insufficienza corticosurrenalica, cachessia, infezioni croniche). A differenza dell'anoressia nervosa e delle altre forme di dimagrimento da deprivazione alimentare in cui l'adiponectina presenta livelli sierici paragonabili a quelli dei soggetti normopeso, nelle lipodistrofie generalizzate l'ormone è generalmente molto basso (12). La sindrome di Berardinelli-Seip nella prima infanzia può essere confusa con la sindrome di Rabson-Mendenhall e talvolta con la sindrome di Donohue (leprecaunismo). Tuttavia, le caratteristiche facciali presenti negli individui affetti dalla sindrome di Rabson-Mendenhall sono peculiari e la perdita di grasso, se presente, è meno evidente. Durante l'adolescenza o l'età adulta, alcuni pazienti con sindrome di Berardinelli-Seip possono presentare caratteristiche acromegaloidi; tuttavia, l'assenza di gigantismo, l'assenza generalizzata di grasso sottocutaneo, l'apparente ipertrofia muscolare e la grave insulino-resistenza ne consentono la diagnosi differenziale con l'acromegalia. Le lipodistrofie parziali possono invece essere confuse con forme di obesità centrale e/o la sindrome di Cushing in cui l'ipercortisolismo cronico provoca una analoga distribuzione del grasso, in modo particolare con iperaccumulo a livello cervicale e addominale (2).

## TERAPIA

Le sindromi lipodistrofiche, se non riconosciute e non curate, causano un incremento del tasso di mortalità principalmente dovuto alle complicanze metaboliche e cardiovascolari. Un corretto inquadramento diagnostico è fondamentale per intervenire tempestivamente e garantire al paziente l'accesso alle terapie più adeguate.

La terapia è basata sulla prevenzione delle complicanze, che si attua in prima istanza attraverso la dieta e l'esercizio fisico, laddove questo non sia controindicato da condizioni mediche concomitanti. È importante seguire una dieta equilibrata, che includa una percentuale adeguata di carboidrati, grassi e proteine. Le linee guida raccomandano un'assunzione di carboidrati tra il 50 e il 60%, grassi tra il 20 e il 30% e proteine intorno al 20%. La restrizione calorica favorisce la riduzione dell'accumulo ectopico di grasso con conseguente miglioramento del profilo metabolico; tuttavia, bisogna sempre tener presente che è di difficile applicazione, soprattutto nei bambini e negli adolescenti, dal momento che l'ipoleptinemia è causa di iperfagia e promuove quindi l'eccessivo introito di calorie (4).

In aggiunta al cambiamento dello stile di vita, i pazienti affetti da lipodistrofia dovrebbero ricevere un trattamento medico finalizzato al miglioramento delle comorbidità. La metformina è il farmaco di prima scelta nel trattamento del diabete e dell'insulino-resistenza. I tiazolidinedioni, PPAR $\gamma$  agonisti, promuovono la differenziazione adipocitaria e migliorano l'utilizzazione periferica del glucosio; pertanto, nei pazienti affetti da lipodistrofia parziale, si sono dimostrati efficaci nel migliorare il controllo glicemico, la dislipidemia, il quadro epatico e l'iperandrogenismo (33-34). Tuttavia, la presenza di una cardiomiopatia sottostante preclude un uso prolungato di tali farmaci ed inoltre, dal momento che aumentano il contenuto di trigliceridi negli adipociti residui, un loro impiego può peggiorare l'iperaccumulo di grasso nel collo e nel volto, causando un inestetismo (35-36).

I tiazolidinedioni dovrebbero essere impiegati con cautela nei pazienti con forme generalizzate dal momento che l'efficacia e la sicurezza in questa popolazione non è stata ancora studiata in maniera adeguata ed è sconsigliata dalle linee guida internazionali sulla malattia (4).

Negli ultimi anni sono entrati a far parte delle opzioni terapeutiche per il diabete mellito di tipo 2 nei pazienti lipodistrofici gli agonisti del recettore del GLP-1 (GLP-1 RA). Gli studi controllati riguardo al loro impiego sono ancora scarsi, ma i primi dati sembrerebbero mostrare una certa efficacia nel controllo del profilo glicemico, soprattutto nelle forme di LPF (37-38).

Un'ulteriore classe di farmaci antidiabetici da poter impiegare nelle lipodistrofie è rappresentata dagli inibitori del trasportatore sodio-glucosio tipo 2 (SGLT2); in particolare, tali farmaci si sono rivelati efficaci nel migliorare l'insulino-resistenza e l'epatosteatosi in diversi pazienti affetti da Lipodistrofia Parziale (39-41). Nei casi in cui non si raggiunga un adeguato controllo glicemico, è indicato passare alla terapia insulinica.

Per l'ipertrigliceridemia è necessario aumentare l'apporto di acidi grassi polinsaturi (omega 3) da associare eventualmente a fibrati. L'impiego di statine dovrebbe essere considerato con cautela nei pazienti con miopatia o distrofia muscolare (tipiche di alcune forme di LPF) (4).

In tutti i casi in cui le terapie non riescano a garantire un sufficiente controllo dei parametri metabolici, può essere valutata l'opportunità di ricorrere alla terapia con la leptina umana ricombinante (Metreleptina), la cui prescrivibilità dipende dalla forma di lipodistrofia e dal grado di compromissione metabolica.

L'ipoleptinemia svolge un ruolo cruciale nello sviluppo del quadro clinico dei pazienti lipodistrofici, in particolare quelli con lipodistrofia generalizzata (LG), nei quali è stato dimostrato come la Metreleptina migliori nettamente le alterazioni metaboliche: riduce l'iperfagia con conseguente calo ponderale, riduce la glicemia a digiuno e determina una riduzione dei livelli di emoglobina glicata (HbA1c) mediamente del 2% dopo un anno di trattamento. Nei pazienti affetti da LG in terapia si è inoltre osservata una diminuzione dei livelli di trigliceridi fino al 60% e un miglioramento della steatosi epatica con un'attenuazione dello stato infiammatorio. La Metreleptina favorisce la regolarizzazione del ciclo mestruale e la riduzione della proteinuria agendo sull'iperfiltrazione glomerulare tipica di alcune forme (4). La Metreleptina si è dimostrata efficace anche nel trattamento delle lipodistrofie parziali, seppur in maniera inferiore rispetto a quelle generalizzate.

Oltre ai parametri metabolici, il trattamento con Metreleptina comporta un miglioramento della qualità della vita, in termini ad esempio di attività lavorativa e scolastica, più evidente nei casi di lipodistrofia generalizzata (42).

La terapia con leptina umana ricombinante è generalmente ben tollerata. I più importanti effetti collaterali riportati sono l'ipoglicemia (solo nei pazienti che ricevono un trattamento insulinico concomitante non adeguatamente titolato) e raramente le reazioni nel sito di iniezione (eritema, orticaria). La comparsa di anticorpi anti-metreleptina interessa all'incirca il 90% dei pazienti trattati con tale farmaco e, in alcuni rarissimi casi, questi anticorpi possono ridurne o annullarne l'efficacia terapeutica (anticorpi neutralizzanti) (43).

In casi selezionati la chirurgia plastica (ad esempio interventi di protesi mammarie, filler dermici, lipectomia o liposuzione) può essere considerata per migliorare l'aspetto fisico e il benessere psicologico dei pazienti.

Il supporto psicologico rappresenta un altro prezioso strumento terapeutico per affrontare le sfide emotive associate alla lipodistrofia. La consulenza può aiutare i pazienti a gestire lo stress, l'ansia associata all'aspetto dimorfico, migliorando così il loro benessere complessivo (2).

## BIBLIOGRAFIA

1. Lim K, Haider A, Adams C, Sleigh A, Savage DB. Lipodystrophy: a paradigm for understanding the consequences of "overloading" adipose tissue. *Physiol Rev.* 2021; 101(3):907-993.
2. Araújo-Vilar D, Santini F. Diagnosis and treatment of lipodystrophy: a step-by-step approach. *J Endocrinol Invest.* 2019; 42(1):61-73. Doi: 10.1007/s40618-018-0887-z.
3. Pelosini C, Paoli M, Santini F, Sessa MR. Le lipodistrofie: tra clinica e laboratorio; *Ligandassay.* 2022; 27(1).
4. Brown RJ, Araújo-Vilar D, Cheung PT, Dunger D, Garg A, Jack M, Mungai L, Oral EA, Patni N, Rother KI, von Schnurbein J, Sorkina E, Stanley T, Vigouroux C, Wabitsch M, Williams R, Yorifuji T. The Diagnosis and Management of Lipodystrophy Syndromes: A Multi-Society Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Dec; 101(12):4500-4511. Doi: 10.1210/jc.2016-2466.
5. Tandon, P, Wafer R, & Minchin J. Adipose morphology and metabolic disease. *The Journal of experimental biology.* 2018; 221(Pt Suppl 1), jeb164970. Doi: 10.1242/jeb.164970.
6. Calabrò PF, Ceccarini G, Calderone A, et al. Psychopathological and psychiatric evaluation of patients affected by lipodystrophy. *Eat Weight Disord.* 2020; 25(4):991-998. Doi: 10.1007/s40519-019-00716-6.
7. Gonzaga-Jauregui C, Ge W, Staples J, et al. Clinical and molecular prevalence of lipodystrophy in an unascertained large clinical care cohort. *Geisinger-Regeneron Discov EHR collaboration Diabetes.* 2020; 69(2):249-258.
8. Garg A. Clinical review#: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Nov; 96(11):3313-3325. Doi: 10.1210/jc.2011-1159.



9. Agarwal AK, Simha V, Oral EA, Moran SA, Gorden P, O’Rahilly S, Zaidi Z, Gurakan F, Arslanian SA, Klar A, Ricker A, White NH, Bindl L, Herbst K, Kennel K, Patel SB, Al-Gazali L, Garg A. Phenotypic and genetic heterogeneity in congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:4840-4847. Doi: 10.1210/jc.2003-030855.
10. Guillen-Navarro E, Sanchez-Iglesias S, Domingo-Jimenez R, et al. A new seipin-associated neurodegenerative syndrome. *J Med Genet.* 2013; 50:401-409.
11. Patni N, & Garg A. Congenital generalized lipodystrophies--new insights into metabolic dysfunction. *Nature reviews. Endocrinology.* 2015; 11(9):522-534. Doi: 10.1038/nrendo.2015.123.
12. Ceccarini G, Pelosini C, Paoli M, Tyutyusheva N, Magno S, Gilio D, Palladino L, Sessa MR, Bertelloni S, Santini F. Serum levels of adiponectin differentiate generalized lipodystrophies from anorexia nervosa. *J Endocrinol Invest.* 2024 Feb 15. Doi: 10.1007/s40618-024-02308-3.
13. Garg A. Acquired and inherited lipodystrophies. *N Engl J Med.* 2004; 350:1220-1234. Doi: 10.1056/NEJMra025261.
14. Ceccarini G, Magno S, Pelosini C, Ferrari F, Sessa MR, Scabia G, Maffei M, Jéru I, Lascols O, Vigouroux C, Santini F. Congenital Generalized Lipodystrophy (Berardinelli-Seip Syndrome) Type 1: Description of Novel AGPAT2 Homozygous Variants Showing the Highly Heterogeneous Presentation of the Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Feb 14; 11:39. Doi: 10.3389/fendo.2020.00039.
15. Garg A, Peshock RM, & Fleckenstein JL. Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1999; 84(1): 170-174. Doi: 10.1210/jcem.84.1.5383.
16. Garg A. Gender differences in the prevalence of metabolic complications in familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2000; 85(5):1776-1782. Doi: 10.1210/jcem.85.5.6605.
17. Garg A, Vinaitheerthan M, Weatherall PT, & Bowcock AM. Phenotypic heterogeneity in patients with familial partial lipodystrophy (dunnigan variety) related to the site of missense mutations in lamin a/c gene. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2001; 86(1):59-65. Doi: 10.1210/jcem.86.1.7121.
18. Bagias C, Xiarchou A, Bargiota A, Tigas S. Familial Partial Lipodystrophy (FPLD): Recent Insights. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020 May 6; 13:1531-1544. Doi: 10.2147/DMSO.S206053.
19. Magno S, Ceccarini G, Barison A, Fabiani I, Giacomina A, Gilio D, Pelosini C, Rubegni A, Emdin M, Gatti GL, Santorelli FM, Sessa MR, Santini F. Partial Lipodystrophy and LMNA p.R545H Variant. *J Clin Med.* 2021 Mar 9; 10(5):1142. Doi: 10.3390/jcm10051142.
20. Semple RK, Chatterjee VK, O’Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest.* 2006; 116:581-589. Doi: 10.1172/JCI28003.
21. Navarro CL, Cau P, Lévy N. Molecular bases of progeroid syndromes. *Human Molecular Genetics.* 2006 Oct 15; 15 Spec No 2:R151-161. Review.
22. Oshima J, Martin GM, Hisama FM, et al. Werner syndrome. In: *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022.
23. Wood RD, Mitchell M, Lindahl T. Human DNA repair genes, 2005. *Mutat. Res.* 2005 Sept 4; 577(1-2):275-283.
24. Magno S, Ceccarini G, Pelosini C, Ferrari F, Prodam F, Gilio D, Maffei M, Sessa MR, Barison A, Ciccarone A, Emdin M, Aimaretti G, Santini F. Atypical Progeroid Syndrome and Partial Lipodystrophy Due to LMNA Gene p.R349W Mutation. *J Endocr Soc.* 2020 Aug 1; 4(10):bvaa108. Doi: 10.1210/jendso/bvaa108.
25. Pelosini C, Martinelli S, Ceccarini G, Magno S, Barone I, Basolo A, Fierabracci P, Vitti P, Maffei M, Santini F. Identification of a novel mutation in the polymerase delta 1 (POLD1) gene in a lipodystrophic patient affected by mandibular hypoplasia, deafness, progeroid features (MDPL) syndrome. *Metabolism.* 2014 Nov; 63(11):1385-1389. Doi: 10.1016/j.metabol.2014.07.010.
26. Ceccarini G, Magno S, Gilio D, Pelosini C, Santini F. Autoimmunity in lipodystrophy syndromes. *Presse Med.* 2021 Nov; 50(3):104073. Doi: 10.1016/j.lpm.2021.104073.
27. Corvillo F, Ceccarini G, Nozal P, Magno S, Pelosini C, Garrido S, López-Lera A, Moraru M, Vilches C, Fornaciari S, Gabbriellini S, Santini F, Araújo-Vilar D, López-Trascasa M. Immunological features of patients affected by Barraquer-Simons

- syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2020 Jan 10; 15(1):9. Doi: 10.1186/s13023-019-1292-1. Erratum in: *Orphanet J Rare Dis.* 2020 Mar 30; 15(1):79. PMID: 31924231; PMCID: PMC6954565.
28. Misra A, Peethambaram A, & Garg A. Clinical features and metabolic and autoimmune derangements in acquired partial lipodystrophy: report of 35 cases and review of the literature. *Medicine.* 2004; 83(1):18-34. Doi: 10.1097/01.md.0000111061.69212.59.
  29. Levy Y, George J, Yona E, & Shoenfeld Y. Partial lipodystrophy, mesangiocapillary glomerulonephritis, and complement dysregulation. An autoimmune phenomenon. *Immunologic research.* 1998; 18(1):55-60. Doi: 10.1007/BF02786513.
  30. Magno S, Ceccarini G, Corvillo F, Pelosini C, Gilio D, Paoli M, Fornaciari S, Pandolfo G, Sanchez-Iglesias S, Nozal P, Curcio M, Sessa MR, López-Trascasa M, Araújo-Vilar D, Santini F. Clinical Characteristics of Patients With Acquired Partial Lipodystrophy: A Multicenter Retrospective Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2024 Feb 20; 109(3):e932-e944. Doi: 10.1210/clinem/dgad700. PMID: 38061004.
  31. Ceccarini G, Ferrari F, & Santini F. Acquired partial lipodystrophy after bone marrow transplant during childhood: a novel syndrome to be added to the disease classification list. *Journal of endocrinological investigation.* 2017; 40(11):1273-1274. Doi: 10.1007/s40618-017-0731-x.
  32. Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y, Garg A. Serum Adiponectin and Leptin Levels in Patients with Lipodystrophies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2002; 87(5):2395-2398. Doi: 10.1210/jcem.87.5.8624.
  33. Luedtke A, Boschmann M, Colpe C, Engeli S, Adams F, Birkenfeld AL, Haufe S, Rahn G, Luft FC, Schmidt HH, & Jordan J. Thiazolidinedione response in familial lipodystrophy patients with LMNA mutations: a case series. *Hormone and metabolic research.* 2012; 44(4):306-311. Doi: 10.1055/s-0031-1301284.
  34. Arioglu E, Duncan-Morin J, Sebring N, Rother KI, Gottlieb N, Lieberman J, Herion D, Kleiner DE, Reynolds J, Premkumar A, Sumner AE, Hoofnagle J, Reitman ML, & Taylor SI. Efficacy and safety of troglitazone in the treatment of lipodystrophy syndromes. *Annals of internal medicine.* 2000; 133(4):263-274. Doi: 10.7326/0003-4819-133-4-200008150-00009.
  35. Corredera C, Iglesias M, Hernández-Martín A, Colmenero I, Dilme E, & Torrelo A. Annular lipoatrophic panniculitis of the ankles. *Pediatric dermatology.* 2011; 28(2):146-148. Doi: 10.1111/j.1525-1470.2010.01208.x.
  36. Agostini M, Schoenmakers E, Beig J, Fairall L, Szatmari I, Rajanayagam O, Muskett FW, Adams C, Marais AD, O'Rahilly S, Semple RK, Nagy L, Majithia AR, Schwabe J, Blom DJ, Murphy R, Chatterjee K, & Savage DB. A Pharmacogenetic Approach to the Treatment of Patients With PPAR $\gamma$  Mutations. *Diabetes.* 2018; 67(6):1086-1092. Doi: 10.2337/db17-1236.
  37. Banning F, Rottenkolber M, Freiboth I, Seissler J, & Lechner A. Insulin secretory defect in familial partial lipodystrophy Type 2 and successful long-term treatment with a glucagon-like peptide 1 receptor agonist. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association.* 2017; 34(12):1792-1794. Doi: 10.1111/dme.13527.
  38. Foss-Freitas MC, Imam S, Neidert A, Gomes AD, Broome DT, & Oral EA. Efficacy and Safety of Glucagon-Like Peptide 1 Agonists in a Retrospective Study of Patients With Familial Partial Lipodystrophy. *Diabetes Care.* 2024; 47(4):653.
  39. Kawana Y, Imai J, Sawada S, Yamada T, Katagiri H. Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Improves Complications of Lipodystrophy: A Case Report. *Annals of internal medicine.* 2017; 166(6):450-451. Doi: 10.7326/L16-0372.
  40. Hamaguchi T, Hirota Y, Takeuchi T, Nakagawa Y, Matsuoka A, Matsumoto M, Awano H, Iijima K, Cha PC, Satake W, Toda T, & Ogawa W. Treatment of a case of severe insulin resistance as a result of a PIK3R1 mutation with a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor. *Journal of diabetes investigation.* 2018; 9(5):1224-1227. Doi: 10.1111/jdi.12825.
  41. Biancalana E, Ceccarini G, Magno S, Ortenzi V, Giannese D, Santini F, Solini A. Canagliflozin on top of dual renin-angiotensin system blockade in a woman with partial acquired lipodystrophy, type 2 diabetes and severely proteinuric chronic kidney disease: a case report. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 May 19; 14:1172468. Doi: 10.3389/fendo.2023.1172468.
  42. Cook K, Adamski K, Gomes A, Tuttle E, Kalden H, Cochran E, Brown RJ. Effects of Metreleptin on Patient Outcomes and Quality of Life in Generalized and Partial Lipodystrophy. *J Endocr Soc.* 2021 Feb 16; 5(4):bvab019. Doi: 10.1210/jendso/bvab019.
  43. Chan JL, Koda J, Heilig JS, Cochran EK, Gorden P, Oral EA, Brown RJ. Immunogenicity associated with metreleptin treatment in patients with obesity or lipodystrophy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016 Jul; 85(1):137-49. Doi: 10.1111/cen.12980.

a cura di Marta Letizia Hribal

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

ARTICOLI SELEZIONATI E COMMENTATI

## Il Diabete n. 2/2024

DOI: <https://doi.org/10.30682//ildia2402e>

### Effetti benefici di un nuovo composto omega-3 ♦ *Pleiotropic beneficial cardiometabolic actions of a high-purity eicosapentaenoic acid product in high cardiovascular risk individuals*

Laikos CI et al. *Lipids*. 2024; 59:67-74.

Come ben evidenziato nell'editoriale di questo numero, a firma del dottor Morieri, il controllo dell'ipertrigliceridemia, rappresenta un fattore chiave nella riduzione del rischio cardiovascolare. A tal fine possono essere utilizzati diversi composti della famiglia degli omega-3, che presentano caratteristiche abbastanza varie, in termini di composizione ed efficacia.

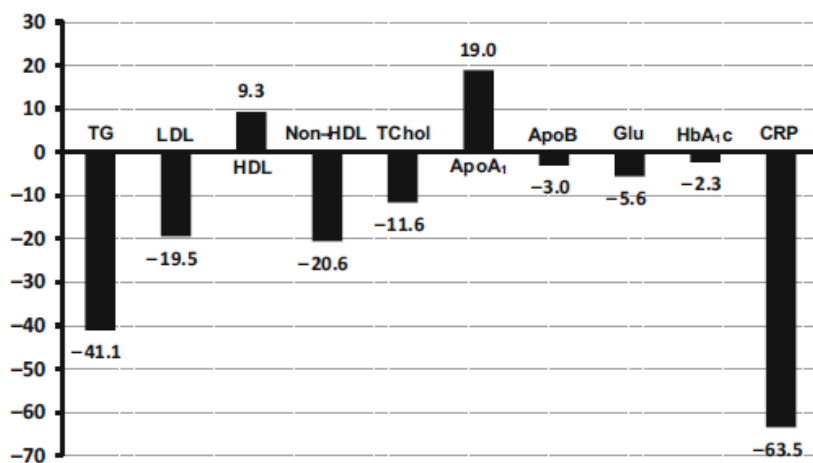
Nello studio qui riassunto, Laikos e colleghi hanno valutato l'effetto di una formulazione altamente purificata di acido eicosapentaenoico (EPA), reclutando una popolazione composta da 226 pazienti (141 M/85F) con elevati livelli di trigliceridi (1.53-5.65 mmol/L-livello medio  $2.97 \pm 0.15$  mmol/L) e più di 1 dei seguenti fattori di rischio CV: ipertensione arteriosa, diabete mellito, arteriopatia periferica, ateromatosi con diagnosi ecografica, anamnesi positiva per infarto del miocardio o ictus. La composizione del preparato utilizzato è riassunta in Tabella 1; esso è stato assunto dai partecipanti 2 volte al giorno per 3 mesi. In aggiunta al preparato i partecipanti allo studio hanno ricevuto indicazioni sullo stile di vita ed hanno continuato ad assumere eventuali altre terapie ipolipidizzanti. Tutti i parametri valutati risultavano migliorati a 3 mesi, con l'eccezione dei livelli di Apolipoproteina A e tale miglioramento era indipendente da età e sesso, con l'eccezione della variazione dei livelli di Apolipoproteina B, per i quali la riduzione era significativa solamente nel sesso maschile (Fig. 1). Gli effetti del composto sembrano quindi essere pleiotropici, oltre che rapidi; è inoltre da sottolineare l'elevato grado di aderenza alla terapia riscontrato dagli autori dello studio.

La decisione di commentare questo studio, dal disegno semplice, condotto su una popolazione non ampia, nasce dal desiderio di incoraggiare l'approfondimento dell'importanza della composizione dei vari preparati di omega-3, disponibili in commercio, che possono rappresentare validi alleati nel trattamento dell'ipertrigliceridemia; purché siano adeguatamente testati e la loro assunzione sia effettuata sotto controllo medico ed integrata con la terapia farmacologica. Come evidenziato nell'Editoriale è infatti fondamentale che una strategia di prevenzione cardiovascolare comprensiva includa anche la valutazione ed il trattamento dell'ipertrigliceridemia.

**Tabella 1** ♦ **Composizione dei "sacchetti" di preparato distribuiti ai pazienti**

NUTRIENTE	QUANTITÀ	% DOSE GIORNALIERA RACCOMANDATA
EPA	1875 mg	
DHA	125 mg	
Vitamina D <sub>3</sub>	3.75 mg (150 IU)	75
Vitamina E	12 mg	150

**Figura 1** ♦ **Variazioni medie a 3 mesi dei principali biomarcatori analizzati**

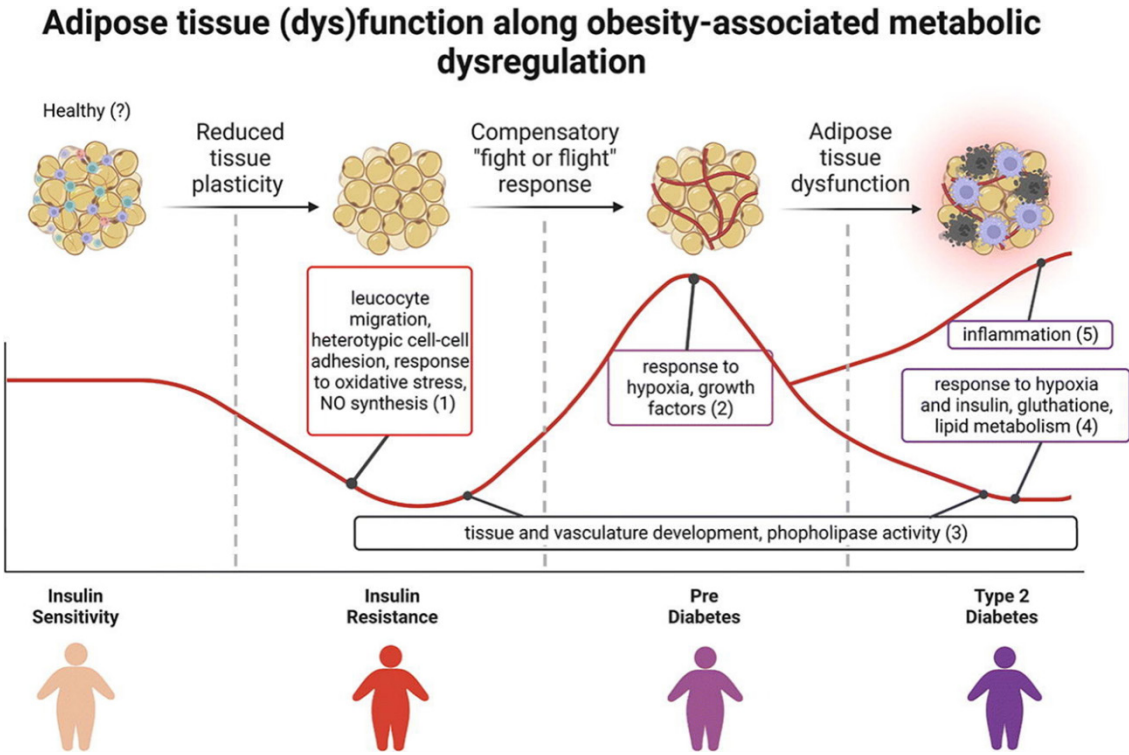


Ricordiamo ai Lettori che possono trovare i commenti della rubrica Journal Club sui canali social della SID: Facebook ([www.facebook.com/SocietaItalianadiDiabetologia](http://www.facebook.com/SocietaItalianadiDiabetologia)), Twitter (SID Italia (@Sid\_Italia) / Twitter) e LinkedIn ((25) SID - Società Italiana di Diabetologia: Panoramica | LinkedIn), oltre che sul sito della società; li invitiamo a condividerli con i loro followers ed amici.  
 Quella che segue è una selezione dei commenti pubblicati nel secondo trimestre del 2024, accompagnati dai graphical abstracts più interessanti e accattivanti.

**Aspetti molecolari nella patogenesi del diabete di tipo 2**

**La disfunzione del tessuto adiposo viscerale: un continuum dall'obesità metabolicamente sana al diabete - A cura di Chiara Maria Assunta Cefalo**

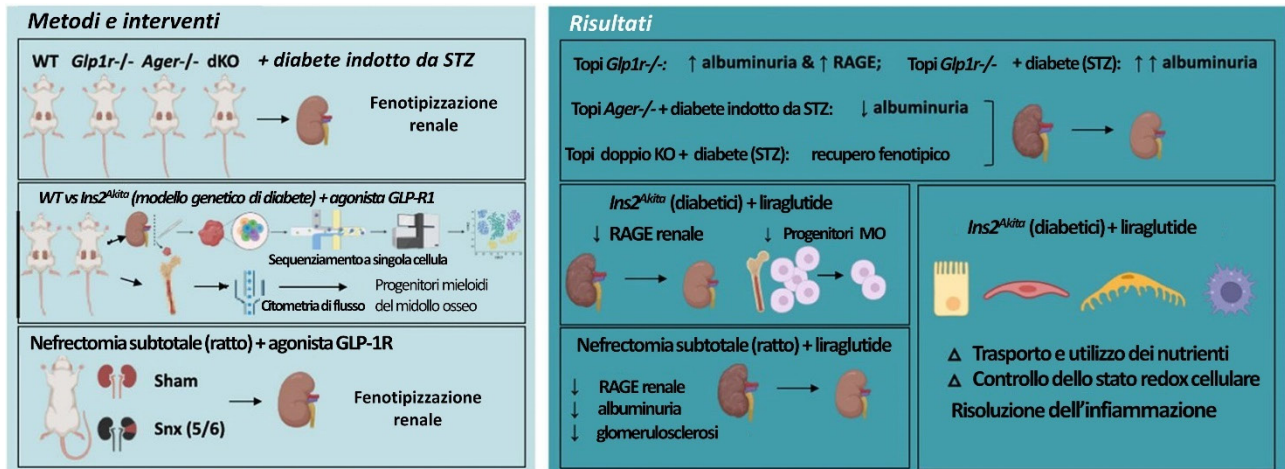
**Link al commento:** Clinical and molecular profiling of human visceral adipose tissue reveals impairment of vascular architecture and remodeling as an early hallmark of dysfunction ([siditalia.it](http://siditalia.it))



**Nefropatia**

**Puntando i riflettori sui benefici renali degli agonisti del GLP1R, emerge l'ombra del RAGE - A cura di Stefano Menini**

**Link al commento:** Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modifies the extent of diabetic kidney disease through dampening the receptor for advanced glycation end products-induced inflammation (siditalia.it)

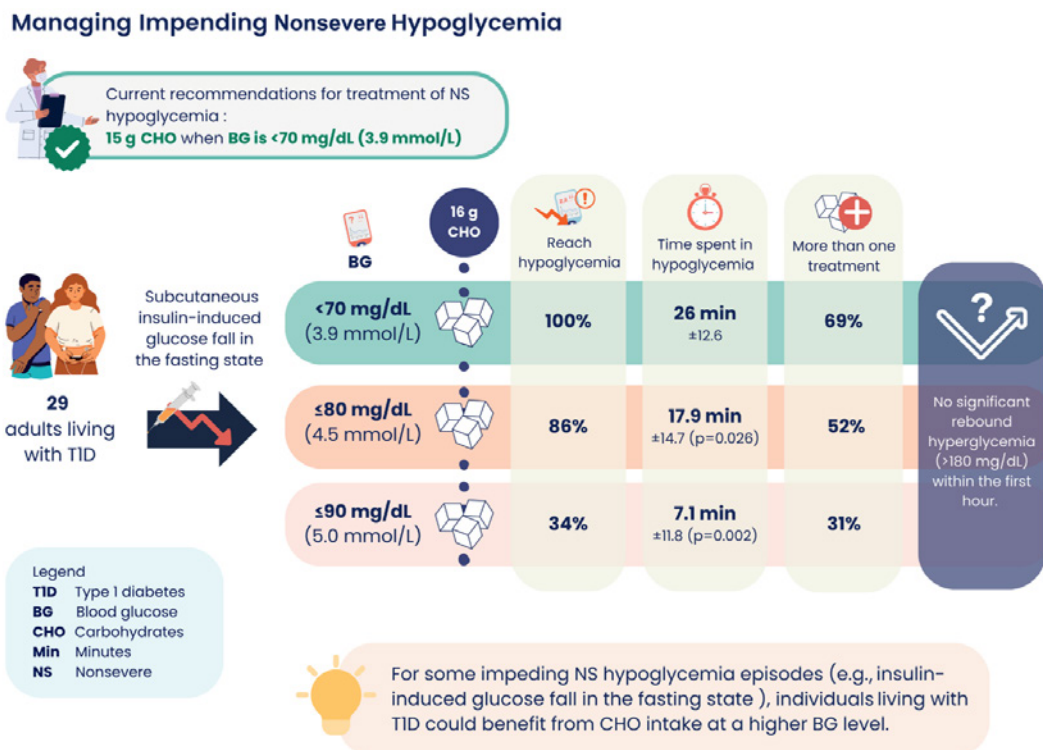


*Ager*<sup>-/-</sup> = gene RAGE; STZ = streptozotocina; GLP-1R = recettore del GLP-1; Snx ((5/6) = nefrectomia subtotale 5/6; MO = midollo osseo

**Complicanze acute e ipoglicemia**

**L'ipoglicemia è... REVERSIB(I)LE!! - A cura di Ludovico Di Gioia, Mauro Rigato, Antonio Rossi**

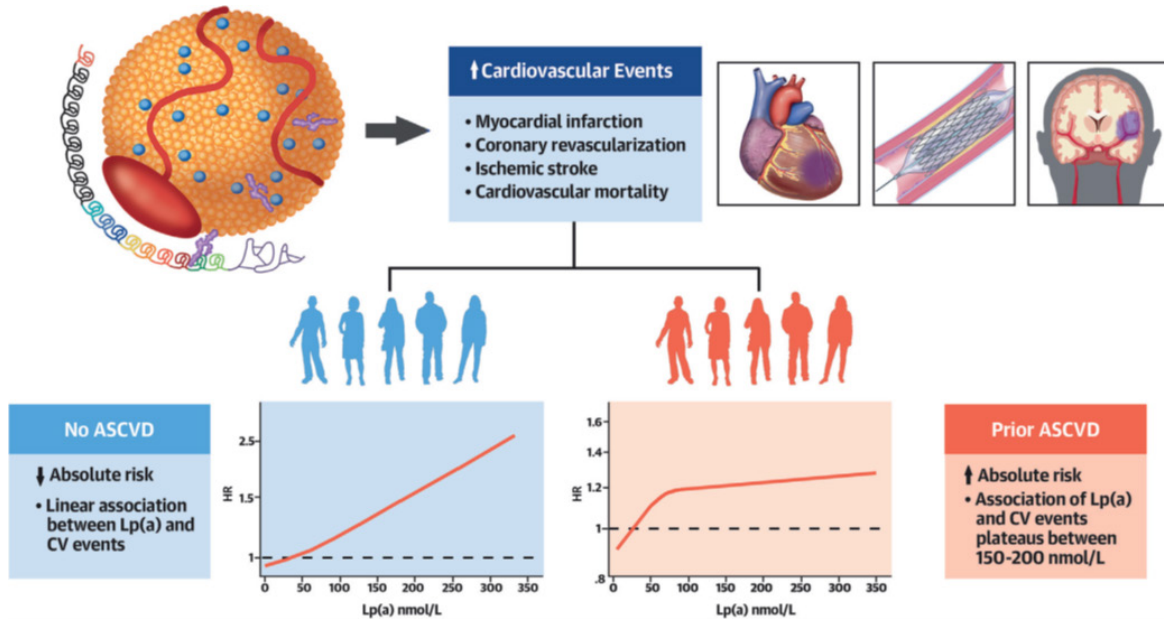
**Link al commento:** Managing Impending Nonsevere Hypoglycemia With Oral Carbohydrates in Type 1 Diabetes: The REVERSIBLE Trial (siditalia.it)



**Coagulazione, infiammazione e CVD**

**Lp(a): fattore di rischio indipendente per ASCVD - A cura di Ilaria Cipolloni, Mariella Baldassarre, Gloria Formoso**

**Link al commento:** Lipoprotein(A) And Major Adverse Cardiovascular Events In Patients With Or Without Baseline Atherosclerotic Cardiovascular Disease (siditalia.it)

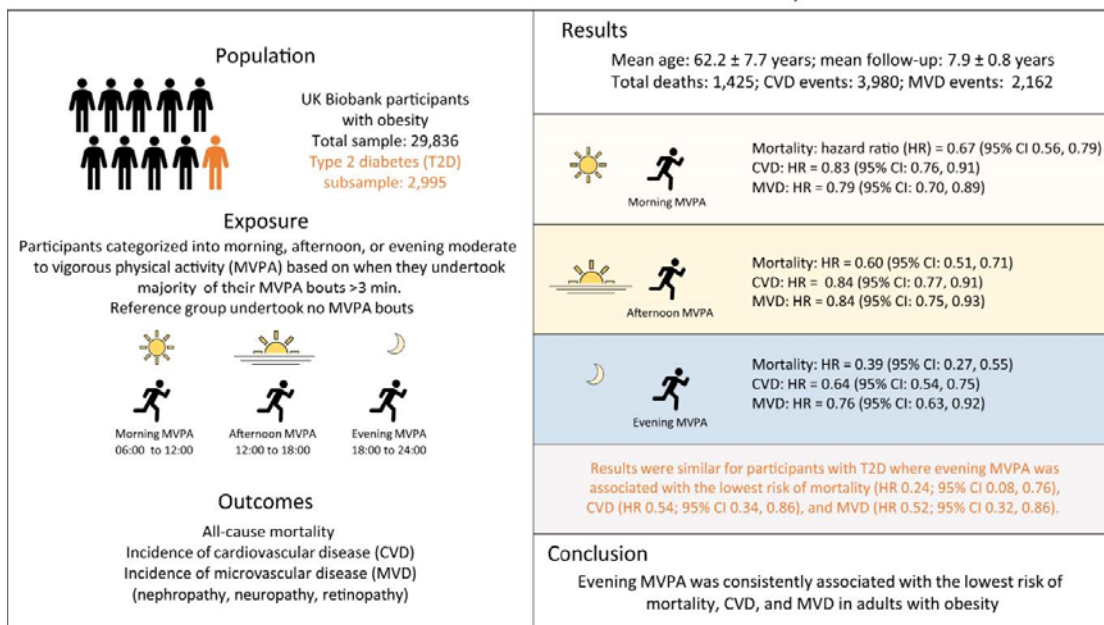


**Attività fisica**

**C'è un tempo per tutto, anche per l'attività fisica - A cura di Jonida Haxhi**

**Link al commento:** Timing of Moderate to Vigorous Physical Activity, Mortality, Cardiovascular Disease, and Microvascular Disease in Adults With Obesity (siditalia.it)

**Timing of moderate to vigorous physical activity, mortality, cardiovascular disease, and microvascular disease in adults with obesity**

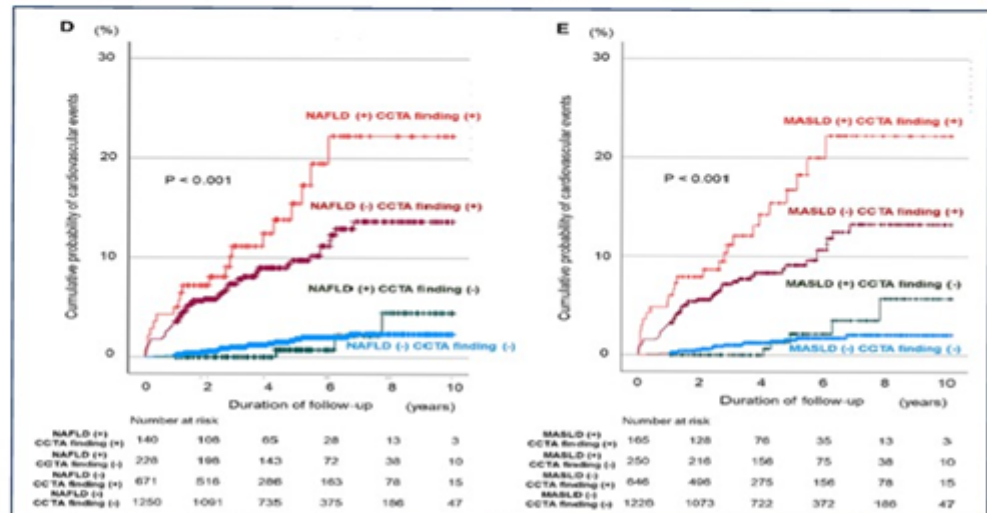
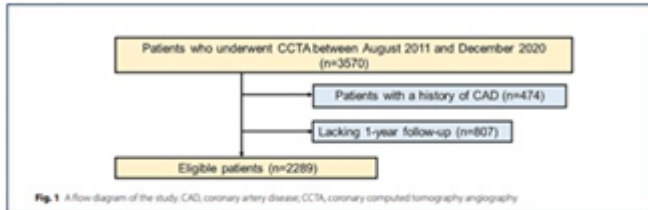


CVD nel diabete

MASLD o NAFLD? Questo è il dilemma - A cura di Raffaele Galiero

**Link al commento:** Prognostic value of metabolic dysfunction associated steatotic liver disease over coronary computed tomography angiography findings: comparison with no-alcoholic fatty liver disease (siditalia.it)

**Prognostic value of metabolic dysfunction associated steatotic liver disease over coronary computed tomography angiography findings: comparison with no-alcoholic fatty liver disease**



Nishihara T, Miyoshi T, Nakashima M, Miki T, Toda H, Yoshida M, Ichikawa K, Osawa K and Yuasa S. Prognostic value of metabolic dysfunction associated steatotic liver disease over coronary computed tomography angiography findings: comparison with no-alcoholic fatty liver disease. *Cardiovascular Diabetology*. <https://doi.org/10.1186/s12933-024-02268-1>



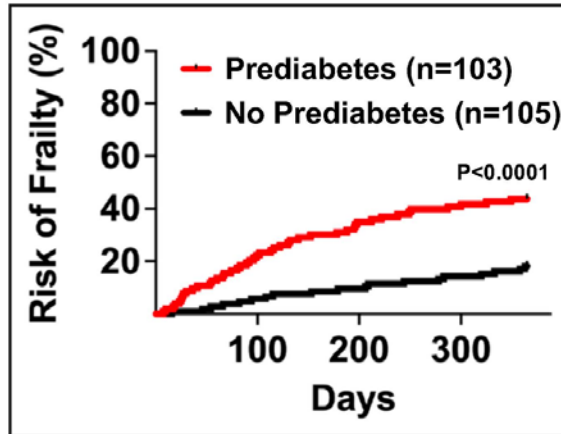
Ipertensione e diabete

**Il prediabete aumenta il rischio di fragilità negli anziani ipertesi con pre-fragilità: effetti benefici della metformina - A cura di Raffaele Napoli**

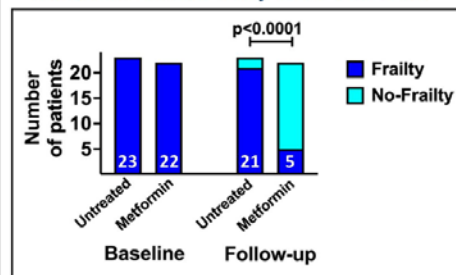
**Link al commento:** Prediabetes Increases the Risk of Frailty in Older Adults With Prefrail Hypertension: Beneficial Effects of Metformin (siditalia.it)

**Prediabetes Increases the Risk of Frailty in Older Adults with Prefrail Hypertension: Beneficial Effects of Metformin**

Prediabetes increases the risk of frailty at 1-year follow-up



Metformin reduces frailty levels after 6 mo



Santulli G et al., *Hypertension*. 2024;81:00-00. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.124.23087

Mortalità, tumori e altri tipi di danno d'organo

**Basta un po' di SGLT2-i nei pazienti con diabete e cancro e il cuore ringrazia! - A cura di Maurizio Di Marco**

**Link al commento:** Cardiovascular outcomes associated with SGLT2 inhibitor therapy in patients with type 2 diabetes mellitus and cancer: a systematic review and meta-analysis (siditalia.it)

**Metanalisi**

- Pz con **cancro e diabete**
- **Trattamento con o senza SGLT2-i**
- **Outcome:** 1) Mortalità per tutte le cause  
2) Ospedalizzazione per scompenso, eventi avversi

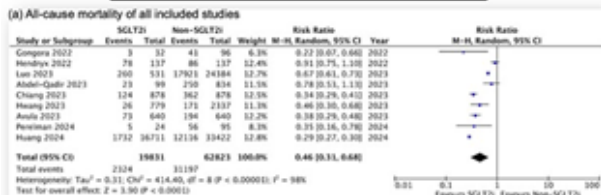


= 9 articoli

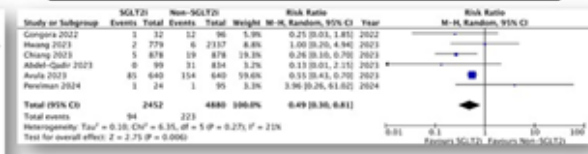


= 82.654 pz

**Mortalità per tutte le cause**



**Ospedalizzazione per scompenso cardiaco**



- **↓ Mortalità per tutte le cause nei pz trattati con SGLT2-i (anche in chi è trattato con antracicline)**
- **↓ Ospedalizzazione per scompenso**

**Limiti:** - eterogeneità degli studi  
- studi osservazionali

Kuo et al. *Diabetology & Metabolic Syndrome* (2024) 16:108

Gravidanza

Vedo e prevedo... le metriche del CGM predicono il GDM! - A cura di Cristina Bianchi

Link al commento: Continuous Glucose Monitoring Profiles in Pregnancies With and Without Gestational Diabetes Mellitus (sidalta.it)

Can continuous glucose monitoring (CGM) identify specific glycemic patterns early in pregnancy that are associated with a diagnosis of gestational diabetes (GDM) by oral glucose tolerance test (OGTT) at 24-34 weeks' gestation?

Methods

- Observational, nonintervention study in expectant mothers without diabetes enrolled prior to 17 weeks.
- 768 participants were included in the analysis, of which 58 had GDM
- Wore blinded Dexcom G6 CGM throughout gestation
- Main outcome was diagnosis of GDM by OGTT and comparison of participants with GDM vs. without GDM at 24-34 weeks' gestation

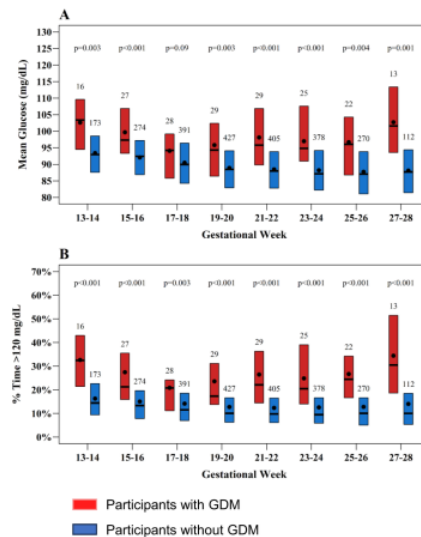


Glucose Levels Across Maternity (CLAM) Study

Results

- Participants with GDM had higher mean glucose, more time >120 mg/dL, more time >140 mg/dL, and less time 63-140 mg/dL when compared to participants without GDM.
- Higher glycemic levels in participants with GDM were observed as early as gestational weeks 13-14 (Figure 1).
- CGM derived patterns in early pregnancy can identify individuals with GDM and may provide an opportunity for earlier intervention to mitigate risk

Figure 1 (Right). Boxplots of A) mean glucose and B) % time >120 mg/dL by GDM status and gestational week. Numbers above boxes represent number of participants. Dots in the middle of boxes represent means, lines in the middle of boxes represent medians. Top and bottom of boxes represent the 75th and 25th percentiles, respectively. P-values above each pair of boxes are testing the glycemic difference between participants with GDM vs. without GDM in each 2-week period.

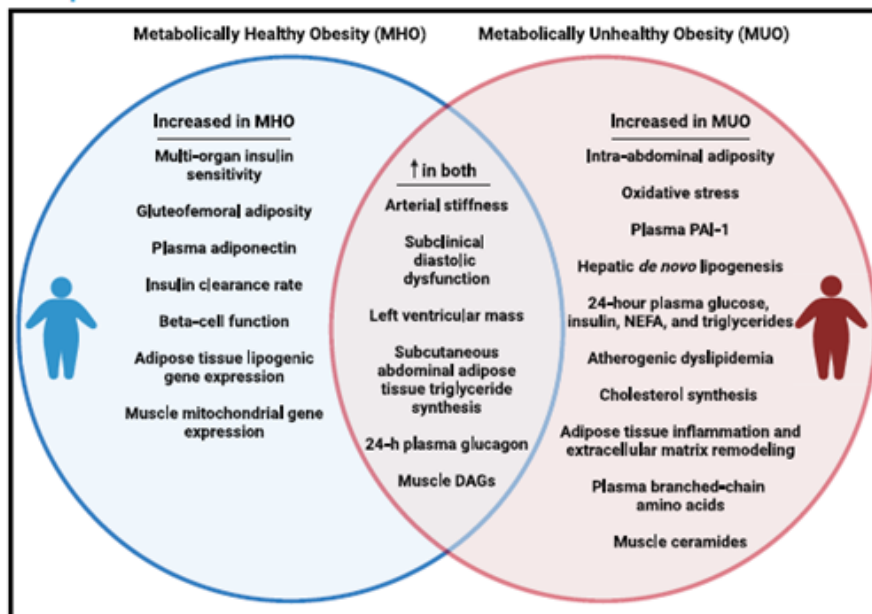


Obesità

Obesità “metabolicamente sana”... che poi tanto sana non è! - A cura di Danila Capoccia

Link al commento: Cardiometabolic characteristics of people with metabolically healthy and unhealthy obesity (sidalta.it)

Graphical abstract



a cura di Carla Greco<sup>1</sup>, Luca D'Onofrio<sup>2</sup> per il gruppo YoSID

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

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

Cataldo Pignatelli<sup>1</sup>, Alessia Neroni<sup>1,2</sup>,  
Francesco Campo<sup>1,2</sup>, Matteo Monieri<sup>1</sup>,  
Francesca Servidio<sup>1</sup>, Alessia Nolli<sup>1,3</sup>,  
Camilla Teruzzi<sup>2</sup>, Sofia Cochi<sup>1</sup>, Antonio Citro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ospedale San Raffaele, Diabetes Research Institute,  
IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano;

<sup>2</sup>Università Vita-Salute San Raffaele, Milano;

<sup>3</sup>Università degli Studi di Milano-Bicocca,  
Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Milano

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

**ABSTRACT**

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

**KEYWORDS**

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

**INTRODUZIONE**

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

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

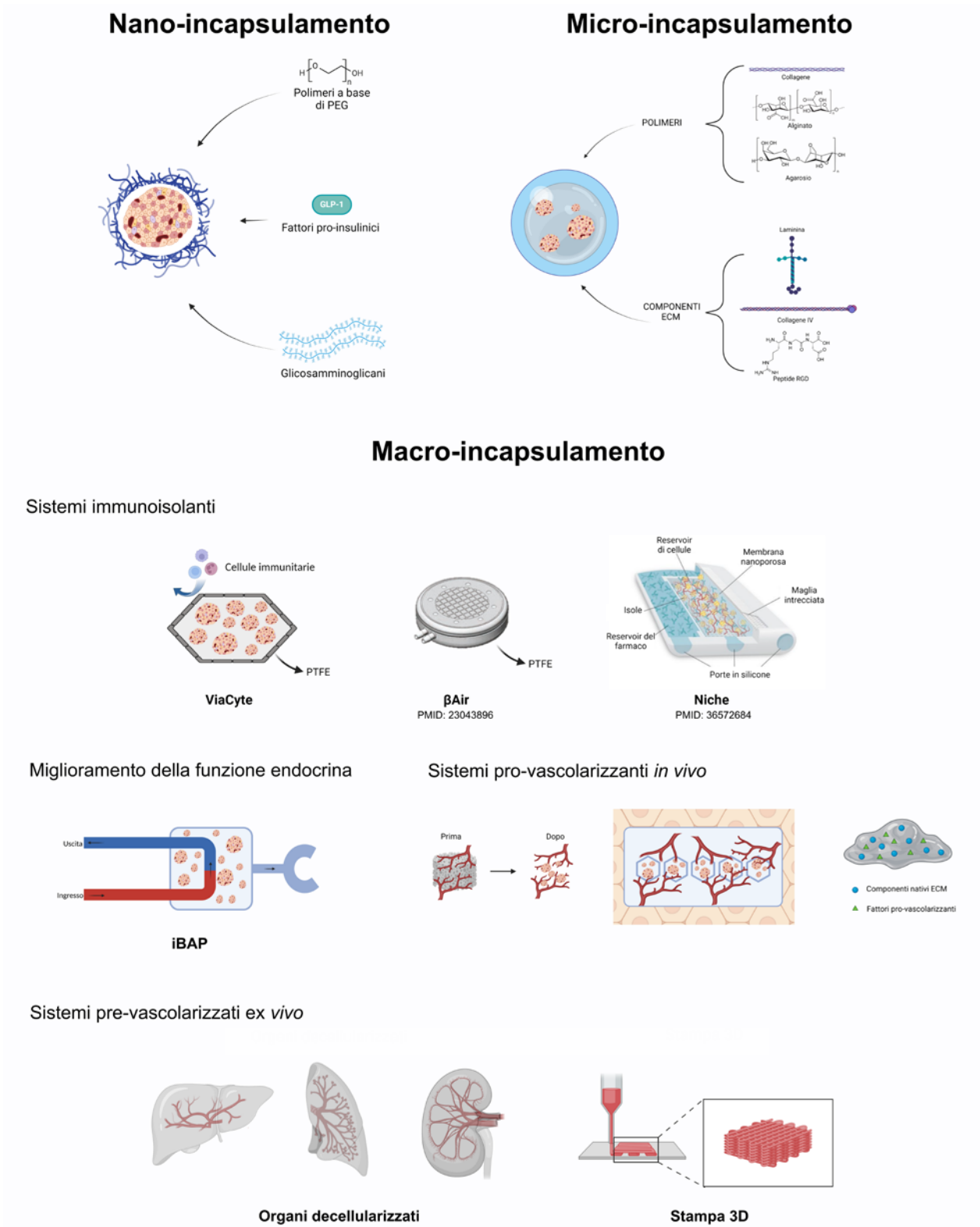
to endocrino pancreatico (3). Questa perdita graduale è dovuta a diversi eventi che avvengono sia durante le prime ore post trapianto che in una fase tardiva a causa di meccanismi immunologici. Infatti, nelle prime ore dopo il trapianto, le isole subiscono una serie di insulti infiammatori, tra cui la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

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

## STRATEGIE DI NANO-INCAPSULAMENTO

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

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



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

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

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

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

**Tabella 1** ♦ Vantaggi e svantaggi dei sistemi di incapsulamento

Strategia di incapsulamento	Vantaggi	Svantaggi
<b>Nano-incapsulamento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Volume da trapiantare ridotto</li> <li>- Adatto a diversi siti di impianto</li> <li>- Ridotta distanza per diffusione</li> <li>- Possibilità di introdurre componenti nativi per migliorare la vitalità e funzione endocrina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stabilità dei materiali a lungo termine</li> <li>- Rischio di coating incompleto</li> <li>- Difficoltà del recupero degli impianti</li> <li>- Vitalità dipendente dalla diffusione di ossigeno</li> </ul>
<b>Micro-incapsulamento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Migliore diffusione rispetto ai sistemi macro-incapsulanti</li> <li>- Possibilità di introdurre componenti nativi per migliorare la vitalità e funzione endocrina</li> <li>- Possibilità di permettere il rilascio di immunosoppressivi dalla capsula</li> <li>- Una microcapsula danneggiata non compromette l'intero trapianto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stabilità dei materiali a lungo termine</li> <li>- Tecniche di produzione non ancora standardizzate</li> <li>- Aggregazione delle microcapsule</li> <li>- Difficoltà del recupero degli impianti</li> <li>- Vitalità dipendente dalla diffusione di ossigeno</li> <li>- Fibrosi</li> </ul>
<i>Immuno-protettivi</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protezione fisica della componente endocrina</li> <li>- Buona stabilità dei materiali</li> <li>- No immunosoppressione</li> <li>- Facilmente recuperabile</li> <li>- Integrabile con sistemi di rilascio topico di immunosoppressivi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Minima massa trapiantabile</li> <li>- Alto rischio di ipossia</li> <li>- Ostacola la formazione di vasi sanguigni e permettere l'attecchimento</li> <li>- Fibrosi</li> <li>- Il danneggiamento della macrocapsula compromette l'intero impianto</li> </ul>
<i>Aumento funzione cellule <math>\beta</math></i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anastomosi con sistema vascolare</li> <li>- Buona stabilità dei materiali</li> <li>- No immunosoppressione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Necessità di intervento di anastomosi per l'impianto</li> <li>- Formazione di trombi e coagula</li> <li>- Sistemi di filtrazione del sangue rallenta il <i>sensing</i> del glucosio</li> </ul>
<b>Macro-incapsulamento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Buona stabilità dei materiali</li> <li>- Facilmente recuperabile</li> <li>- Possibilità di rivascularizzare l'impianto endocrino (7-14 giorni)</li> <li>- Possibilità di introdurre componenti native o cellule proangiogeniche per migliorare la rivascularizzazione, la vitalità e la funzione endocrina</li> <li>- Assenza di fibrosi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Minima massa trapiantabile</li> <li>- Necessità di immunosoppressione sistemica o locale</li> <li>- Fase avascolare ancora presente</li> </ul>
<i>Pre-vascolarizzati ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Materiali nativi</li> <li>- Ricrea ex vivo la rivascularizzazione</li> <li>- Fase avascolare ridotta o quasi assente</li> <li>- Ricrea l'architettura nativa</li> <li>- Attecchimento ex vivo</li> <li>- Assenza di fibrosi</li> <li>- Possibilità di introdurre componenti native o cellule proangiogeniche per migliorare la rivascularizzazione, la vitalità e la funzione endocrina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Necessità di immunosoppressione sistemica o locale</li> <li>- Standardizzazione dei processi di produzione e su larga scala</li> </ul>

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

## STRATEGIE DI MICRO-INCAPSULAMENTO

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

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

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

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

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

## STRATEGIE DI MACRO-INCAPSULAMENTO

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

### Sistemi macro-incapsulanti immuno-protettivi

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

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



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

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

Per aggirare il problema della carenza di ossigeno all'interno dei dispositivi macro-incapsulanti, l'azienda O2 aveva sviluppato il dispositivo  $\beta$ Air, in grado di fornire ossigeno molecolare alle isole incapsulate (72-73) (Fig. 1). Questo è costituito da tre componenti principali: uno strato di un idrogel di alginato contenente isole, una camera per rilasciare l'ossigeno, con portelli di ingresso e uscita, e una membrana di PTFE spessa 25  $\mu\text{m}$  che separa lo strato di alginato dal tessuto ospite (73) (Fig. 1). Il dispositivo, impiantato nel sottocute di un paziente affetto da DMT1, è stato testato in uno studio clinico (NCT02064309), dimostrando che il sistema è in grado di sostenere la vitalità e la funzione delle isole per 10 mesi, con una modesta riduzione dell'apporto di insulina esogena. Tuttavia, lo scambio di nutrienti o ormoni avveniva sempre per fenomeni diffusivi, non garantendo una risposta immediata da parte delle isole incapsulate (74-75).

Le recenti strategie di macro-incapsulamento, come il dispositivo TRAFFIC (76) (Thread-Reinforced Alginate Fiber For Islets enCapsulation) e la sua più recente evoluzione NICE (77) (Nanofiber-Integrated Cell Encapsulation), hanno dimostrato promettenti risultati nell'ambito del trapianto di isole pancreatiche per il trattamento del diabete. Utilizzando idrogeli rinforzati con fibre sintetiche, questi dispositivi offrono una maggiore stabilità meccanica, che è cruciale soprattutto durante il processo di impianto e recupero. Il dispositivo NICE, in particolare, è composto all'interno da un idrogel di alginato contenente le cellule endocrine e presenta un rivestimento esterno poroso composto da nanofibre. Il sistema ha dimostrato una notevole efficacia nel ripristinare la normoglicemia fino a 200 giorni in modelli preclinici diabetici immuno-competenti (77). Tuttavia, ci sono alcune sfide da affrontare. Ad esempio, la densità di cellule endocrine che possono essere inserite nel dispositivo è relativamente bassa, il che significa che per ottenere un numero sufficiente di aggregati di cellule staminali, il dispositivo deve essere estremamente lungo. Nel caso di 300.000 aggregati di cellule staminali, il dispositivo NICE potrebbe superare i 20 metri di lunghezza, rendendolo clinicamente impegnativo da impiantare e potenzialmente suscettibile a complicazioni come aderenze diffuse o restrizioni degli organi. Gli studi futuri, soprattutto su animali diabetici di grandi dimensioni, saranno cruciali per valutare l'idoneità clinica di questi dispositivi e comprendere meglio le sfide pratiche associate al loro utilizzo su larga scala (16).

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

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

### **Sistemi macro-incapsulanti per migliorare la funzionalità endocrina**

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

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

### **Sistemi macro-incapsulanti pro-vascolarizzanti in vivo**

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

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

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

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

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

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

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

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

### **Sistemi macro-incapsulanti pre-vascolarizzati ex-vivo**

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

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

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

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

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

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

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

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

#### LA COMPONENTE PANCREATICA ENDOCRINA: FONTI ALTERNATIVE ALLE ISOLE PANCREATICHE UMANE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## INGEGNERIZZARE LE CELLULE BETA COME SOLUZIONE AL PROBLEMA IMMUNOLOGICO

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

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

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



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

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

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

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

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

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

## CONCLUSIONI

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

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

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

## BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

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



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

174. Rosengard AM, et al. Tissue expression of human complement inhibitor, decay-accelerating factor, in transgenic pigs. A potential approach for preventing xenograft rejection. *Transplantation*. 1995; 59:1325-1333.
175. Chen Y, et al. Xenoantibody response to porcine islet cell transplantation using GTKO, CD55, CD59, and fucosyltransferase multiple transgenic donors. *Xenotransplantation*. 2014; 21:244-253.
176. Miwa Y, et al. Potential value of human thrombomodulin and DAF expression for coagulation control in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2010; 17:26-37.
177. Petersen B, et al. Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C. *Xenotransplantation*. 2009; 16:486-495.
178. Lee KFE, et al. Recombinant pig TFPI efficiently regulates human tissue factor pathways. *Xenotransplantation*. 2008; 15:191-197.
179. Paris LL, et al. Reduced human platelet uptake by pig livers deficient in the asialoglycoprotein receptor 1 protein. *Xenotransplantation*. 2015; 22:203-210.
180. Le Bas-Bernardet S, et al. Xenotransplantation of galactosyl-transferase knockout, CD55, CD59, CD39, and fucosyl-transferase transgenic pig kidneys into baboons. *Transplant Proc*. 2011; 43:3426-3430.
181. Kaniewska E, et al. Immunohistochemical and functional analysis of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) and ecto-5'-nucleotidase (CD73) in pig aortic valves. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2014; 33:305-312.
182. Klymiuk N, et al. Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice. *Diabetes*. 2012; 61:1527-1532.
183. Hara H, et al. Human dominant-negative class II transactivator transgenic pigs - effect on the human anti-pig T-cell immune response and immune status. *Immunology*. 2013; 140:39-46.
184. Reyes LM, et al. Creating class I MHC-null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease. *J Immunol*. 2014; 193:5751-5757.
185. Forte P, Baumann BC, Weiss EH & Seebach JD. HLA-E expression on porcine cells: protection from human NK cytotoxicity depends on peptide loading. *Am J Transplant*. 2005; 5:2085-2093.
186. Esquivel EL, et al. Suppression of human macrophage-mediated cytotoxicity by transgenic swine endothelial cell expression of HLA-G. *Transpl Immunol*. 2015; 32:109-115.
187. Tena A, et al. Transgenic expression of human CD47 markedly increases engraftment in a murine model of pig-to-human hematopoietic cell transplantation. *Am J Transplant*. 2014; 14:2713-2722.
188. Zhou X, et al. [Generation of genetic modified pigs devoid of GGTA1 and expressing the human leukocyte antigen-G5]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2022; 38:1096-1111.
189. Hawthorne WJ, et al. Xenotransplantation of Genetically Modified Neonatal Pig Islets Cures Diabetes in Baboons. *Front Immunol*. 2022; 13:898948.
190. Bottino R, et al. Pig-to-Monkey Islet Xenotransplantation Using Multi-Transgenic Pigs. *American Journal of Transplantation*. 2014; 14:2275-2287.
191. Bluestone JA & Tang Q. Solving the Puzzle of Immune Tolerance for  $\beta$ -Cell Replacement Therapy for Type 1 Diabetes. *Cell Stem Cell*. 2020; 27:505-507.

a cura di Gloria Formoso

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

## Smartwatch, activity tracker e salute nella persona con diabete ♦ *Smartwatch, activity tracker and health in people with diabetes*

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

Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università degli Studi "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara, Chieti

DOI: <https://doi.org/10.30682//ildia2402g>

### ABSTRACT

*For people with diabetes, technological development represents an important opportunity to optimize therapeutic outcomes through an approach aimed at improving the quality of physical activity, exercise, and sleep, while combating sedentary behavior. However, this approach requires adequate training of members of the health care team and includes, in addition to knowledge of the dimensions of the aforementioned behavioral variables, an understanding of the dynamics of change associated with them. It is also crucial not to overlook the importance of active patient participation and the selection of appropriate tools and equipment.*

### KEYWORDS

*Smartwatch, activity tracker, diabetes, sleep quality.*

L'attività fisica regolare e l'esercizio fisico sono elementi cardine nella prevenzione del diabete mellito e delle sue numerose complicanze (1). Nonostante le solide evidenze scientifiche a supporto dei benefici legati ad uno stile di vita attivo, la promozione di comportamenti salutari in questo ambito si scontra spesso con notevoli difficoltà legate alla necessità di un cambiamento comportamentale duraturo e consolidato da parte del paziente. Adottare e mantenere uno stile di vita fisicamente attivo richiede infatti un impegno costante e una motivazione profonda, poiché implica la modifica di abitudini radicate e la

gestione di ostacoli quotidiani. Questo cambiamento comportamentale rappresenta una sfida significativa, in quanto implica l'adozione di un nuovo modo di vivere e di relazionarsi con la propria salute, superando le barriere psicologiche, sociali e ambientali che possono ostacolarne l'attuazione (2-3). Nel caso specifico del diabete, il processo di modifica delle abitudini risulta particolarmente impegnativo e complesso, poiché prevede un intervento simultaneo e sinergico su più fattori interdipendenti e strettamente connessi tra loro, quali l'alimentazione, i livelli di sedentarietà, la pratica di attività fisica e le abitudini legate al sonno (4). Inoltre, è importante ricordare che la persona con diabete assume cronicamente una terapia farmacologica, non esente da problemi di aderenza.

Un approccio di questo tipo necessita inevitabilmente di una strategia multidisciplinare e multidimensionale, volta a creare e consolidare nel tempo nuovi comportamenti salutari attraverso stimoli coerenti, convergenti e costanti, provenienti da diverse direzioni (5-6). La teoria *24-hours activity cycle* ci ricorda che le nostre giornate sono composte da 24 ore divisibili nel tempo che trascorriamo dormendo, svolgendo attività sedentarie o attività fisiche di intensità leggera, moderata, vigorosa e molto vigorosa (7). Secondo tale teoria, partendo da presupposto che le 24 ore giornaliere non possono essere modificate nella loro durata, all'incrementare del tem-

po di una o più variabili corrisponde il ridursi delle altre. Purtroppo, è stato dimostrato che, soprattutto nelle fasi iniziali del processo di cambiamento, nelle persone affette da obesità ed insulino resistenza, l'introduzione di sessioni di esercizio fisico può essere inconsapevolmente compensata da un aumento del tempo trascorso in condizioni di sedentarietà o con la riduzione di altre attività fisiche di intensità leggera o moderata, in un tentativo inconscio di mantenere lo *steady state* precedente (8-9). Questo fenomeno di compensazione negativa può rallentare o addirittura compromettere il raggiungimento degli auspicati miglioramenti dei parametri metabolici, influenzati in modo significativo anche dal grado di frammentazione dei periodi di sedentarietà (10-12).

L'obiettivo finale dell'intervento terapeutico diventa quindi quello di ottimizzare la distribuzione dell'attività fisica durante le 24 ore, considerando con attenzione parametri quali frequenza, intensità, tipologia, durata, volume, progressione e contesto in cui l'attività viene svolta (4). Nella società contemporanea, caratterizzata da ritmi frenetici, innumerevoli opportunità di sedentarietà e continui fattori di stress, un approccio olistico volto a ripristinare l'equilibrio biologico risulta di fondamentale importanza. Le esigenze imposte dai moderni stili di vita tendono a sovvertire l'omeostasi fisiologica, compromettendo il benessere psico-fisico dell'individuo. In tale contesto, l'ottimizzazione degli interventi finalizzati al ripristino dell'equilibrio omeostatico diviene una priorità imprescindibile.

È lecito domandarsi: perché questa premessa in un articolo incentrato sull'uso di smartwatch, tracker di attività e sulla salute della persona con diabete? La personalizzazione dell'intervento motorio richiede un'oggettivazione dei fattori sopra descritti al fine di consentire un'accurata identificazione delle problematiche, una programmazione iniziale mirata e un monitoraggio sistematico a breve, medio e lungo termine. Ciò permette di modulare l'intervento durante la sua attuazione e favorire la consapevolezza del paziente, indirizzando la sua attenzione verso gli elementi salienti e le caratteristiche contestuali sopra descritte.

In questo scenario, lo sviluppo tecnologico che ha portato alla realizzazione di smartwatch e activity tracker rappresenta un'opportunità unica, potenzialmente rivoluzionaria, per oggettivare e monitorare in modo accurato

e continuativo tutti questi aspetti, facilitando e supportando il processo di cambiamento comportamentale della persona con diabete.

Gli smartwatch e gli activity tracker sono dispositivi indossabili, basati su accelerometri e sensori di varia natura (come giroscopi, sensori ottici, sensori da contatto e sensori per la luce), in grado di tracciare con precisione l'attività fisica giornaliera, quantificandone i livelli di intensità, il tempo totale di sedentarietà e di sonno. Al contempo questi strumenti forniscono informazioni dettagliate su una serie di parametri fisiologici quali la frequenza cardiaca, la variabilità della frequenza cardiaca, la conduttanza cutanea, la termoregolazione e la postura assunta dal corpo (13). La combinazione di sviluppo tecnologico e ricerca scientifica ha consentito la realizzazione di device scientificamente validati, ad un prezzo contenuto, e disponibili nel comune mercato dell'elettronica. Numerose revisioni sistematiche della letteratura scientifica hanno ampiamente dimostrato l'efficacia di interventi comportamentali basati sull'utilizzo di questi dispositivi nel promuovere un significativo incremento dei livelli di attività fisica in pazienti affetti da patologie croniche non trasmissibili, tra cui il diabete mellito, con interventi della durata compresa tra le 12 e le 52 settimane (13-16).

In particolare, l'associazione sinergica tra l'uso di activity tracker o smartwatch e il counseling motivazionale e di supporto fornito dai professionisti sanitari appartenenti alla *health alliance* (medici, trainer specializzati, fisioterapisti, dietisti, psicologi, ecc.) ha determinato, negli studi analizzati, un aumento significativo dell'attività fisica praticata e un conseguente miglioramento di una serie di parametri metabolici come i livelli di glicemia, emoglobina glicata, trigliceridi, colesterolo LDL, circonferenza vita, composizione corporea e pressione arteriosa, oltre ad un miglioramento del livello generale di fitness cardiovascolare, rispetto ai gruppi di controllo non sottoposti all'intervento (13-19). Fattori come il sesso maschile del paziente e l'intensità del counseling fornito dai professionisti sanitari sono stati inoltre identificati come fattori in grado di influenzare positivamente i risultati metabolici raggiunti (19-20).

Queste solide evidenze scientifiche sottolineano l'importanza cruciale di un adeguato percorso di educazione terapeutica del paziente, volto a fornire al paziente stesso gli strumenti necessari per interpretare correttamente

i dati forniti dalla tecnologia indossabile per adottare un approccio attivo e consapevole nel processo di cambiamento comportamentale. Il monitoraggio remoto dei dati raccolti dai dispositivi da parte dei professionisti sanitari consente inoltre di verificare in tempo reale l'efficacia dell'intervento terapeutico in corso e di apportare tempestivamente eventuali correttivi o modifiche alla strategia di trattamento (13).

Uno degli aspetti più significativi dell'utilizzo di smartwatch e activity tracker è inoltre rappresentato dalla possibilità di valutare e monitorare in modo oggettivo e continuativo anche la qualità e la quantità del sonno notturno. Il sonno rappresenta infatti un'altra variabile fondamentale da considerare attentamente nella gestione della persona con diabete, in quanto esso influenza e viene a sua volta influenzato dal profilo glicemico in un rapporto di stretta interdipendenza bidirezionale (21-22). È infatti stato osservato come un sonno qualitativamente e quantitativamente insufficiente stimoli il senso della fame e l'assunzione di cibi ad alto indice glicemico e ad alto contenuto di grassi saturi (21). La capacità di questi dispositivi di fornire dati dettagliati sulla qualità e la durata del sonno notturno rappresenta quindi un'informazione preziosa per strutturare interventi mirati al miglioramento dell'igiene del sonno, con potenziali riverberi positivi non solo sulla glicemia, ma anche sul microbiota intestinale, sui livelli di infiammazione sistemica, sull'attività fisica spontanea giornaliera e sull'aderenza ai consigli nutrizionali forniti (21-22). Un recente studio di Inaishi e collaboratori ha indagato le associazioni tra variabilità glicemica, qualità del sonno e passi giornalieri, in soggetti senza diabete, tramite l'utilizzo di dispositivi indossabili (23). I risultati hanno evidenziato una correlazione positiva tra la variabilità glicemica giornaliera e il tempo di latenza del sonno, suggerendo che una maggiore variabilità glicemica durante la giornata possa essere legata a un maggiore ritardo nell'addormentamento. L'utilizzo di activity tracker e smartwatch ha permesso agli autori di quantificare in modo oggettivo i parametri di interesse, superando le limitazioni dei metodi di rilevazione tradizionali. La possibilità di monitorare costantemente i livelli di glucosio interstiziale, la qualità del sonno attraverso algoritmi di rilevazione del movimento e l'attività fisica quotidiana, mediante il conteggio dei passi, ha consentito di ottenere una visione d'insieme

delle interazioni tra queste variabili in condizioni di vita reale (23). Alcune evidenze sono disponibili anche nelle persone con diabete. Uno studio cross-sectional ha esplorato l'associazione tra la variabilità del sonno ed il time in range in persone con diabete di tipo 1. Lo studio ha coinvolto 45 persone con diabete di tipo 1 che hanno indossato un dispositivo di monitoraggio continuo del glucosio ed un activity tracker per rilevare i pattern di sonno. I risultati hanno evidenziato una correlazione significativa tra una maggiore variabilità del sonno e una riduzione del time in range della glicemia, suggerendo che l'irregolarità nei pattern di sonno possa compromettere il controllo glicemico nelle persone con diabete di tipo 1 (24).

Sebbene attualmente il grado di correlazione tra i dati forniti da smartwatch o activity tracker e quelli ottenuti mediante la polisonnografia (considerata il gold standard per la valutazione oggettiva del sonno) risulti essere basso o al massimo intermedio, numerosi studi hanno comunque dimostrato l'efficacia di programmi strutturati di miglioramento dell'igiene del sonno basati proprio sull'utilizzo di questi dispositivi indossabili (25-29). È importante sottolineare inoltre che la ricerca scientifica in questo ambito è costantemente in evoluzione, portando ad un continuo perfezionamento degli algoritmi di rilevazione e stima del sonno implementati nei dispositivi consumer, con prospettive future di accuratezza sempre maggiore.

Un ulteriore vantaggio potenzialmente rivoluzionario legato all'utilizzo di smartwatch e activity tracker è rappresentato dalla possibilità di integrare in modo pressoché immediato e automatico i dati da essi raccolti all'interno di piattaforme digitali di telemedicina, intelligenza artificiale e machine learning appositamente sviluppate. Questo consentirebbe un monitoraggio ancora più approfondito ed accurato e una personalizzazione degli interventi terapeutici in base alle caratteristiche e alle necessità specifiche di ogni paziente.

## CONCLUSIONI

Gli smartwatch e gli activity tracker rappresentano una importante opportunità per ottimizzare la gestione della persona con diabete, consentendo di oggettivare e monitorare con precisione attività fisica, sedentarietà e sonno (Fig. 1). L'implementazione dell'approccio tec-

**Figura 1** ♦ I tracker indossabili consentono di integrare informazioni cruciali sulla sedentarietà, l'attività fisica, la qualità del sonno e la salute generale. La raccolta e l'analisi di questi dati offrono la possibilità di dare consapevolezza, aiutando le persone a comprendere meglio il loro stile di vita e apportare cambiamenti al fine di migliorare la propria salute (immagine realizzata con BioRender.com)



nologico nella pratica clinica richiede inizialmente un investimento di tempo e risorse. È fondamentale che i membri della *health alliance* ed i pazienti dimostrino una predisposizione all'adozione di tali strumenti. È necessario individuare i dispositivi che presentano la maggiore correlazione con la polisonnografia; grazie alla evoluzione tecnologica ed al progresso della ricerca, questi dispositivi diventeranno sempre più accurati e integrati negli interventi terapeutici. Infine, è essenziale che i pazienti siano disposti ad acquistare la strumentazione personale e che i professionisti sanitari possiedano una conoscenza multidimensionale degli argomenti inerenti all'attività motoria e ai suoi molteplici aspetti. Solo soddisfacendo questi requisiti sarà possibile integrare efficacemente la tecnologia nel processo di cura della persona con diabete, massimizzandone i benefici potenziali. Le premesse ci sono ed i tempi sono maturi, muoviamoci!

#### BIBLIOGRAFIA

1. Kanaley JA, Colberg SR, Corcoran MH, Malin SK, Rodriguez NR, Crespo CJ, et al. Exercise/Physical Activ-

ity in Individuals with Type 2 Diabetes: A Consensus Statement from the American College of Sports Medicine. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2022 Feb; 54(2):353-368.

2. Ritchie ND, Carroll JK, Holtrop JS, Havranek EP. Effects of physical activity goal attainment on engagement and outcomes in the National Diabetes Prevention Program. *Translational Behavioral Medicine (Internet)*. 2018 Apr 12 (cited 2024 May 5). Available from: <https://academic.oup.com/tbm/advance-article/doi/10.1093/tbm/ibx021/4969714>.
3. Rowland TW. *Biologic regulation of physical activity*. Champaign, IL: Human Kinetics. 2017, p. 211.
4. Blundell JE, King NA. Physical activity and regulation of food intake: current evidence: *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 1999 Nov; 31(Suppl 1):S573.
5. Hagger MS, Chatzisarantis NLD. An Integrated Behavior Change Model for Physical Activity. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 2014 Apr; 42(2):62-69.
6. Hagger MS, Moyers S, McAnally K, McKinley LE. Known knowns and known unknowns on behavior change in-

- terventions and mechanisms of action. *Health Psychology Review*. 2020 Jan 2; 14(1):199-212.
7. Rosenberger ME, Fulton JE, Buman MP, Troiano RP, Grandner MA, Buchner DM, et al. The 24-Hour Activity Cycle: A New Paradigm for Physical Activity. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2019 Mar; 51(3):454-464.
  8. Di Blasio A, Ripari P, Bucci I, Di Donato F, Izzicupo P, D'Angelo E, et al. Walking training in postmenopause: effects on both spontaneous physical activity and training-induced body adaptations. *Menopause*. 2012 Jan; 19(1):23-32.
  9. Di Blasio A, Di Donato F, Di Santo S, Bucci I, Izzicupo P, Di Baldassarre A, et al. Aerobic physical exercise and negative compensation of non-exercise physical activity in post-menopause: a pilot study. *J Sports Med Phys Fitness (Internet)*. 2018 Oct (cited 2023 Aug 7); 58(10). Available from: <https://www.minervamedica.it/index2.php?show=R4oY2o18N1oA1497>.
  10. Wu J, Fu Y, Chen D, Zhang H, Xue E, Shao J, et al. Sedentary behavior patterns and the risk of non-communicable diseases and all-cause mortality: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Nursing Studies*. 2023 Oct; 146:104563.
  11. Pinto AJ, Bergouignan A, Dempsey PC, Roschel H, Owen N, Gualano B, et al. Physiology of sedentary behavior. *Physiological Reviews*. 2023 Oct 1; 103(4):2561-2622.
  12. Quan M, Xun P, Wu H, Wang J, Cheng W, Cao M, et al. Effects of interrupting prolonged sitting on postprandial glycemia and insulin responses: A network meta-analysis. *Journal of Sport and Health Science*. 2021 Jul; 10(4):419-429.
  13. Hodkinson A, Kontopantelis E, Adeniji C, Van Marwijk H, McMillian B, Bower P, et al. Interventions Using Wearable Physical Activity Trackers Among Adults With Cardiometabolic Conditions: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2021 Jul 20; 4(7):e2116382.
  14. Kirk MA, Amiri M, Pirbaglou M, Ritvo P. Wearable Technology and Physical Activity Behavior Change in Adults With Chronic Cardiometabolic Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Health Promot*. 2019 Jun; 33(5):778-791.
  15. Qiu S, Cai X, Chen X, Yang B, Sun Z. Step counter use in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Med*. 2014 Dec; 12(1):36.
  16. Bravata DM, Smith-Spangler C, Sundaram V, Gienger AL, Lin N, Lewis R, et al. Using Pedometers to Increase Physical Activity and Improve Health: A Systematic Review. *JAMA*. 2007 Nov 21; 298(19):2296.
  17. De Oliveira VLP, De Paula TP, Viana LV. Pedometer- and accelerometer- based physical activity interventions in Type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2024 Mar; 34(3):548-558.
  18. Franssen WMA, Franssen GHLM, Spaas J, Solmi F, Eijnde BO. Can consumer wearable activity tracker-based interventions improve physical activity and cardiometabolic health in patients with chronic diseases? A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 2020 Dec; 17(1):57.
  19. Hodkinson A, Kontopantelis E, Adeniji C, Van Marwijk H, McMillian B, Bower P, et al. Interventions Using Wearable Physical Activity Trackers Among Adults With Cardiometabolic Conditions: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2021 Jul 20; 4(7):e2116382.
  20. Ferguson T, Olds T, Curtis R, Blake H, Crozier AJ, Dankiw K, et al. Effectiveness of wearable activity trackers to increase physical activity and improve health: a systematic review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet Digital Health*. 2022 Aug; 4(8):e615-626.
  21. Kryger MH, Roth T, Dement WC, editors. *Principles and practice of sleep medicine*. Sixth edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2017, p.1730.
  22. Henson J, Covenant A, Hall AP, Herring L, Rowlands AV, Yates T, et al. Waking Up to the Importance of Sleep in Type 2 Diabetes Management: A Narrative Review. *Diabetes Care*. 2024 Mar 1; 47(3):331-343.
  23. Inaishi J, Kashiwagi K, Kinoshita S, Wada Y, Hanashiro S, Shiga K, et al. Associations between glycemic variability, sleep quality, and daily steps in subjects without diabetes using wearable devices. *Metabolism Open*. 2023 Dec; 20:100263.
  24. Sirimon Reutrakul, Ghada Abu Irsheed, Minsun Park et al. Association between sleep variability and time in range of glucose levels in patients with type 1 diabetes: Cross-sectional study. *Sleep Health*. 2023; 9(6):968-976.
  25. Kim K, Park DY, Song YJ, Han S, Kim HJ. Consumer-grade sleep trackers are still not up to par compared to polysomnography. *Sleep Breath*. 2022 Dec; 26(4):1573-1582.
  26. Di Blasio A, Morano T, Lancia F, Viscioni G, Di Iorio A, Grossi S, et al. Effects of activity tracker-based counsel-

- ling and live-web exercise on breast cancer survivors' sleep and waking time during Italy's COVID-19 lockdown. *Home Health Care Services Quarterly*. 2022 Jan 2; 41(1):1-19.
27. Nguyen NH, Vallance JK, Buman MP, Moore MM, Reeves MM, Rosenberg DE, et al. Effects of a wearable technology-based physical activity intervention on sleep quality in breast cancer survivors: the ACTIVATE Trial. *J Cancer Surviv*. 2021 Apr; 15(2):273-280.
28. Browne JD, Boland DM, Baum JT, Ikemiya K, Harris Q, Phillips M, et al. Lifestyle Modification Using a Wearable Biometric Ring and Guided Feedback Improve Sleep and Exercise Behaviors: A 12-Month Randomized, Placebo-Controlled Study. *Front Physiol*. 2021 Nov 25; 12:777874.
29. Murawski B, Plotnikoff RC, Rayward AT, Oldmeadow C, Vandelanotte C, Brown WJ, et al. Efficacy of an m-Health Physical Activity and Sleep Health Intervention for Adults: A Randomized Waitlist-Controlled Trial. *American Journal of Preventive Medicine*. 2019 Oct; 57(4):503-514.