

## Diabete mellito insulino-dipendente: nuove frontiere terapeutiche

Riccardo Calafiore, Giuseppe Basta, Giovanni Luca, Paolo Brunetti

**Riassunto.** L'introduzione delle nuove insuline analogiche ha migliorato il grado di controllo glicemico e quindi ha diminuito il rischio di sviluppare complicanze secondarie in pazienti con diabete mellito di tipo 1. Tuttavia la terapia insulinica non potrebbe mai rappresentare la cura finale della malattia. Questa sarebbe possibile se il tessuto insulare danneggiato fosse sostituito con cellule sane e vitali, costituite dall'intero pancreas o dalle isole di Langerhans isolate e purificate. Purtroppo, la ridotta disponibilità di donatori d'organo umani e l'indispensabile immunosoppressione farmacologica del ricevente hanno fin qui ostacolato l'applicazione di questo approccio. L'immunoprotezione delle isole isolate all'interno di microcapsule generate nel nostro laboratorio, senza immunosoppressione, potrebbe rappresentare la soluzione al problema. Le microcapsule potrebbero inoltre consentire l'impiego di isole non umane per il trapianto dei pazienti diabetici, contrastando la scarsità di donatori umani. Su un nuovo fronte sperimentale, la riattivazione di precursori cellulari in grado di ricostituire, per rigenerazione, le cellule  $\beta$  pancreatiche originali, contestuale all'abbattimento della risposta autoimmunitaria con interventi di ingegneria genetica, sarebbe in grado di fornire la soluzione radicale.

**Parole chiave.** Cellule  $\beta$  pancreatiche, diabete mellito insulino-dipendente, insulina, iperglicemia, rigenerazione cellulare, trapianto di isole di Langerhans, trapianto di pancreas.

**Summary.** *New frontiers for the therapy of insulin-dependent diabetes mellitus.*

Introduction of new analogic insulin molecules has favorably impacted control of hyperglycemia with positive effects on onset and severity of chronic complications of the T1DM. However, insulin therapy does not represent a cure for the disease. On the contrary, cell therapy, by substituting diseased tissue with fresh vital cells, whether be they graft of whole pancreas or isolated islets of Langerhans, might provide for a cure for T1DM. However, the restricted availability of cadaveric human donors, coupled with recipient's pharmacologic immunosuppression, strictly hamper the diffusion of this approach. Protecting the isolated islets within microcapsules developed in our laboratory, with no recipient's immunosuppression, may represent a major problem-solving alley. Microcapsules might also offer the opportunity to provide non human tissue as a resource for donor islets thereby circumventing the restrictions in human islet tissue procurement. On another research front, re-activating progenitor cells that may reconstitute original viable and functional  $\beta$ -cells, within an endocrine pancreas regenerative system, while autoimmunity is being abrogated by engineering the host's immune system, could provide a radical solution to the problem posed by T1DM.

**Key words.** Hyperglycaemia, cell regeneration, graft isolated islet of Langerhans transplantation, pancreas transplantation, therapy of insulin-dependent diabetes mellitus.

### Introduzione

Il diabete mellito di tipo 1 (T1DM) è una malattia autoimmune in cui cloni autoreattivi di linfociti T distruggono in modo mirato e selettivo le cellule  $\beta$  insulino-secernenti delle isole di Langerhans, indovate nel pancreas endocrino. La specificità del processo distruttivo in effetti risparmia sia le altre componenti cellulari endocrine ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,

PP) sia le cellule del sistema duttale-esocrino, queste costituendo, come ben noto, la componente tessutale pancreatica maggiore<sup>1</sup>. La conseguente abrogazione pressoché totale della secrezione insulinica endogena determina l'insorgenza di una grave sindrome iperglicemica che, ove non trattata tempestivamente con terapia insulinica sostitutiva, può comportare conseguenze anche assai gravi per il paziente.

Tuttavia, se la terapia insulinica attuale si può avvalere dell'impiego di nuove molecole, dotate di flessibile farmacocinetica (tabella 1) ed in grado di migliorare significativamente il grado di controllo glicemico come lo stesso stile di vita dei pazienti con T1DM, essa non è risolutiva ai fini della completa prevenzione delle complicanze legate alla malattia<sup>2,3</sup>. Di conseguenza il T1DM resta la causa principale di morbilità e mortalità per disordini cardiovascolari, neurologici, retinici e renali manifestati dalla popolazione generale<sup>4</sup>. In particolare, pur grazie ai recenti progressi conseguiti dalla formulazione delle nuove insuline esogene alcune delle quali potenzialmente somministrabili per via non iniettiva, i pazienti con T1DM non possono comunque esimersi dall'ingrato compito di automonitorare i propri valori glicemici per poter calibrare i singoli dosaggi del farmaco nell'arco della giornata. Nel più classico schema di terapia insulinica intensiva, il paziente esegue almeno quattro somministrazioni quotidiane di insulina di diversa formulazione. I sacrifici personali che la gestione della malattia comporta non possono che riverberarsi ancora più negativamente sullo stile di vita soprattutto dei segmenti più giovanili della popolazione diabetica. Ma in generale, l'insieme delle variabili che regolano il controllo glicemico individuale, in regime di terapia insulinica intensiva – incluse modificazioni ormonali, dietetiche e lo stress psichico – rendono piuttosto elusivo il raggiungimento di un obiettivo terapeutico ottimizzato, nell'ottica di poter attenuare, senza mai tuttavia azzerare, i rischi di sviluppare le complicanze secondarie della malattia. Poiché la terapia insulinica, pur con i sostanziali progressi accumulati, da sola non può proteggere i pazienti con T1DM da conseguenze morbose anche gravi, **è più che legittimo dover pensare a trattamenti alternativi che siano in grado di costituire una cura radicale** e non soltanto fornire un controllo comunque parziale della malattia.

Considerate le basi etiopatogenetiche del T1DM, un potenziale approccio potrebbe consistere nella sostituzione del tessuto  $\beta$ -cellulare distrutto con cellule fresche e vitali in grado di ripristinare la competenza funzionale del pancreas endocrino, e con essa ristabilire la omeostasi glicemica.

Tabella 1. - Nuove molecole insuliniche analogiche.

Azione rapida	Azione ritardata	Azione intermedia
Lispro Aspart Glulisina	Glargine Levemir	NPH + lispro

Questo filone di pensiero si è sviluppato negli ultimi anni creando un vero e proprio autonomo sistema di ricerca incentrato nella cosiddetta **“terapia cellulare”** che, sempre più addentrandosi nella biologia e nella genetica molecolare, ha portato di recente a far emergere un nuovo e promettente campo di studio inteso come “terapia molecolare e rigenerativa del pancreas endocrino”.



**Per il trattamento del diabete mellito di tipo 1, tanto il filone più tradizionale ed ormai applicato da anni (pur se ancora sperimentale): quello della terapia cellulare, rappresentata dal trapianto di pancreas intero o di insule di Langerhans isolate, quanto le frontiere avanzate della terapia molecolare, genica e rigenerativa hanno recentemente compiuto progressi rilevanti, meritevoli di opportuna segnalazione.**

## Terapia cellulare

TRAPIANTO  
DI PANCREAS INTERO

Il trapianto di pancreas intero (TPI) è un procedimento ormai ben consolidato nella pratica chirurgica, eseguito – allo stato – in 20.000 pazienti<sup>5</sup> con T1DM, in associazione o meno ad un trapianto di rene. Il TPI prevede

comunque un intervento chirurgico maggiore, gravato da un certo grado di morbilità perioperatoria a causa di complicanze vascolari o legato allo smaltimento enterico, vescicale o vascolare delle secrezioni esocrine del nuovo pancreas, posizionato in sede eterotopica.



**Pur con discreti vantaggi metabolici per i pazienti trapiantati, che acquisiscono rapidamente uno stato normoglicemico, i rischi chirurgici, associati a quelli che derivano dai pesanti regimi di immunosoppressione farmacologica<sup>6</sup>, peraltro indispensabili alla sopravvivenza del trapianto, debbono essere tenuti in debito conto.**

Ad esempio, esiste ampio consenso sul fatto che se il paziente con T1DM è anche portatore di una grave nefropatia (comune complicanza del diabete di lungo corso) trattabile con trapianto di rene, questo può essere vantaggiosamente eseguito in simultanea a quello di pancreas<sup>7,8</sup>. Anzi, è proprio questa l'indicazione principale al trapianto di pancreas intero prevista da un “position statement” ufficiale dell’American Diabetes Association (vedi *infra*). Sempre più frequentemente<sup>9,10</sup> viene comunque proposto il trapianto di pancreas isolato, in pazienti con diabete particolarmente instabile che non rispondono alla terapia insulinica intensiva, soprattutto in presenza di gravi complicanze metaboliche (chetoacidosi o ipoglicemia grave ricorrente) complicanze che possono costituire un pericolo alla sopravvivenza del paziente. Tuttavia, in questo caso si deve assolutamente procedere ad un’attenta selezione dei candidati all’intervento, stante la rilevanza degli effetti collaterali legati sia al procedimento chirurgico che all’immunosoppressione farmacologica dei riceventi.

## TRAPIANTO DI INSULE DI LANGERHANS

Poiché il paziente con T1DM necessita soltanto della componente endocrina ed in particolare  $\beta$ -cellulare, distrutta dal processo autoimmune alla base della malattia, è ovvio che a partire dagli studi pionieristici di Lacy<sup>11</sup> si sia tentato attivamente di trapiantare le insule isolate e purificate da pancreas di donatori. Al di là della giustificazione razionale, è importante rilevare che i trapianti di insule si eseguono, a differenza di quelli di pancreas intero, in anestesia locale, nell'ambito di un procedimento di radiologia interventistica. Dopo aver incannulato la vena porta sotto guida radiologica, si fa defluire per gravità la sospensione insulare purificata che va ad embolizzare le triadi portalì, nell'arco di pochi minuti. In caso di attecchimento, nel corso di poche ore, anche se in modo meno conclamato rispetto al trapianto di pancreas intero, le insule iniziano a rilasciare C-peptide, consentendo al paziente di ridurre gradualmente la sua usuale posologia insulinica fino a sospenderla, in caso di pieno successo, in condizioni di euglicemia.

Approssimativamente, sono stati finora eseguiti oltre 450 trapianti di insule umane negli ultimi 4 anni (rispetto ai 3.500 trapianti di pancreas intero)<sup>12</sup>, soprattutto a seguito dei risultati eclatanti del **protocollo di Edmonton**, comunicati nello scorso 2000<sup>13</sup>. In effetti, prima del 2000, la percentuale dei pazienti che, dopo trapianto intraepatico di insule (associato o meno ad un contemporaneo trapianto di rene), sotto immunosoppressione farmacologica totale restava in condizioni euglicemiche in assenza di terapia con insulina esogena, ad un anno dall'intervento non superava l'8%<sup>14</sup>. Il protocollo di Edmonton, introducendo alcune variabili importanti, come l'impiego di una massa insulare adeguata (in genere ottenuta da 2-3 pancreas di donatori), un nuovo regime immunosoppressivo senza corticosteroidi e a basso dosaggio di inibitori delle calcineurine (tabella 2), in pazienti con T1DM e ricorrenti quanto gravi episodi ipoglicemici, quantificati in base ad un sistema di "hypoglycemic score", ma in assenza di insufficienza renale, ha consentito di raggiungere un traguardo prima di allora impensabile: l'80% dei pazienti trapiantati aveva potuto sospendere l'insulina esogena, in completa euglicemia, ad un anno dall'intervento.

Una serie di problemi, alcuni di impatto meramente pratico, altri di natura più sofisticata, ha impedito a tutt'oggi l'applicazione su larga scala dei trapianti di pancreas intero o di insule isolate alla terapia radicale del T1DM.

Tabella 2. - Immunosoppressione farmacologica per il trapianto di insule (protocollo di Edmonton).

- Anticorpi monoclonali (MoAb) anti-recettore IL-2
- FK 506 a basso dosaggio
- Rapamicina
- Infliximab (MoAb anti TNF-alfa)
- CAMPATH

Per tale motivo è stata costituita una rete internazionale di Centri (ITN) europei e nordamericani con l'intento di riprodurre i dati di Edmonton, trapiantando 4 pazienti per Centro.



Mentre i risultati di questa ricerca sono tuttora in corso di scrutinio, stanno emergendo i limiti del protocollo di Edmonton, poiché a 5 anni dal trapianto soltanto il 20% dei pazienti era in grado di mantenere condizioni euglicemiche in assenza di insulina esogena<sup>15</sup>.

## PROBLEMATICHE EMERGENTI DEI TRAPIANTI DI PANCREAS INTERO ED INSULE DI LANGERHANS

Innanzitutto, vi è una forte discrepanza tra il numero di organi disponibili per l'uno o l'altro procedimento e quello dei pazienti con T1DM che potrebbero beneficiare di tali interventi. Basti pensare che negli USA, a fronte della disponibilità di 6.000 pancreas di donatori disponibili ogni anno, vi sono, nello stesso periodo, 30.000 nuovi casi di T1DM<sup>16</sup>. A parte la prassi, esistente presso alcune Istituzioni, di assegnare il primo pancreas disponibile al trapianto dell'organo intero piuttosto che alla preparazione ed al successivo trapianto delle insule isolate, anche in virtù del summenzionato "position statement" dell'American Diabetes Association<sup>17</sup> ove il trapianto di insule è, di fatto, considerato un procedimento ancora sperimentale, restano altri importanti rilievi da fare.

Si è già accennato al fatto che la corretta applicazione del protocollo di Edmonton richiede l'impiego di almeno 2-3 organi per raggiungere la massa critica di 11.000 insule equivalenti (IEQ)/kg di peso corporeo del ricevente. Senza contare, inoltre, che i procedimenti di separazione e purificazione delle insule da pancreas interi sono soggetti a grande variabilità di resa, legata a diverse condizioni operative. Ciò non fa che esacerbare ulteriormente il divario esistente tra organi attualmente disponibili e quelli necessari per fare dei trapianti insulari, ove mai pienamente funzionanti, un procedimento terapeutico di routine. Inoltre, ad onta dei rilevanti progressi della farmacoterapia immunosoppressiva con l'avvento di agenti molto più mirati e selettivi e contestualmente meno tossici di quelli usati in passato, resta comunque il problema che l'immunosoppressione generalizzata si associa a numerosi effetti collaterali (tabella 3 a pagina seguente) alcuni dei quali potenzialmente molto seri e rischiosi. Senza contare che i regimi immunosoppressivi devono essere proseguiti per tutta la vita per garantire la funzione del trapianto.



Tabella 3. - Effetti collaterali principali dell'immunosoppressione farmacologica per i trapianti di insule.

- Dislipidemie (50%)
- Ulcere buccali (46%)
- Alterazioni renali (7%)
- Sconosciuti

Inoltre, la sopravvivenza limitata nel tempo dei trapianti di insule fa ritenere che non tutti i problemi di gestione immunitaria del trapianto, con riferimento sia alla risposta immunitaria dell'ospite che alla ricorrenza autoimmunitaria della malattia diabetica sul tessuto innestato, siano risolti. Infine, è possibile che nella loro sede epatica di impianto, necessariamente eterotopica, deconnesse dalla matrice extracellulare originale, le insule non possano beneficiare né di quel lento ma fondamentale processo di ricambio dei vecchi elementi cellulari endocrini con tessuto nuovo e vitale, né di un giusto equilibrio tra eventi cellulari apoptotici *versus* eventi rigenerativi che normalmente garantiscono la longevità funzionale del pancreas endocrino per tutta la durata della vita.



#### PROSPETTIVE

Le possibili vie di uscita all'impasse clinico attuale dei trapianti di pancreas ed insule nella terapia di fondo del T1DM debbono necessariamente prevedere: (I) eliminazione dei regimi di immunosoppressione farmacologica generalizzata quale misura anti-rigetto dei trapianti; (II) validazione di sorgenti tessutali insulinosecendenti diverse da quella umana, con particolare riferimento al suino, che, notoriamente, produce una molecola insulinica assai prossima a quella umana, differenziandosene per un solo aminoacido. Sarebbe così colmata la cronica indisponibilità di tessuto umano, visto che il tessuto pancreatico suino sarebbe disponibile in quantità virtualmente illimitate.



■ **Per quanto riguarda (I)**, sarebbe teoricamente possibile seguire la via della immunomodulazione, con l'impiego di trapianti combinati di midollo osseo e insule dello stesso donatore, stabilendo una condizione di microchimerismo<sup>18</sup> o ricorrendo a ingegneria sofisticate del sistema immunitario ospite, con la finalità di stabilire uno stato di tolleranza acquisita dell'ospite al trapianto, senza dover ricorrere all'immunosoppressione generalizzata.

Fermo restando che tali strategie sono al momento in fase assai preliminare di studio, esiste un'altra possibilità perseguita dal nostro laboratorio negli ultimi 20 anni di lavoro. Si tratta di tecnologie di immunoisolamento dei trapianti insulari all'interno di micromembrane semipermeabili e biocompatibili che impediscono il contatto fisico tra ospite

e tessuto trapiantato, prevenendone in tal modo il rigetto immunitario. In particolare, il microincapsulamento delle insule si avvale dell'impiego di un polimero saccaridico, l'alginato di sodio (NAG), originariamente estratto da alghe marine. Tale materiale, appositamente purificato con tecniche messe a punto nel nostro laboratorio, che consentono l'eliminazione di endotossine e proteine, reagisce con poliacetati aminoacidici, ed in particolare, nel nostro caso, con la poliornitina (PLO) tramite legame covalente. **Il metodo di microincapsulamento** sviluppato dal nostro laboratorio<sup>19</sup> consente la fabbricazione di microsferule assai regolari in forma e dimensioni, contenenti 1-2 insule al loro interno, dotate di capacità di filtrazione, permeabilità e porosità selettive. Tali proprietà consentono alle microcapsule di ospitare insule che possono ricevere l'apporto di sostanze nutritive, indispensabili alla loro sopravvivenza, senza tuttavia consentire l'accesso ad anticorpi o cellule immunitarie, comprese sostanze a basso peso molecolare grazie alla selettività di membrana. Altrettanto importante è la facilità di impianto delle microcapsule che dipende direttamente dal volume finale e quindi dal diametro di ciascuna sferula. Le dimensioni capsulari medie individuali di 400 $\mu$  (figura 1), in effetti, ben si adattano a tale sede di impianto peritoneale, mentre prototipi capsulari di dimensioni minime (200 $\mu$ ) da noi prodotti potrebbero consentire in futuro l'impiego di siti di impianto alternativi. Tutto ciò ci ha permesso di raccogliere un'ampia casistica, dopo aver eseguito nell'arco dell'ultimo ventennio centinaia di allo- e xenotrapianti di insule incapsulate in roditori di vari ceppi e cani con diabete spontaneo o artificialmente indotto con streptozotocina o pancreatectomia totale. In questi modelli sperimentali animali di diabete, ed in particolare nel topo NOD che sviluppa una malattia diabetica autoimmune del tutto simile a quella umana, il trapianto delle nostre insule di ratto (xenotrapianto non discordante) o di suino o umane (xenotrapianti discordanti) ha indotto lunghi periodi di remissione della sindrome iperglicemica nei riceventi.

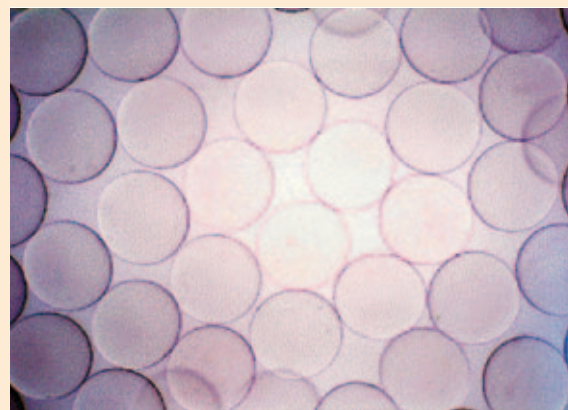


Figura 1. Microcapsule vuote di AG/PLO (Università di Perugia, Laboratorio Trapianti Insule).

Del pari, cani con diabete spontaneo insulino-dipendente trapiantati con insule canine o suine microincapsulate hanno mostrato ottime risposte metaboliche che in alcuni casi hanno consentito la sospensione della terapia insulinica per lunghi periodi di tempo<sup>20</sup>.

Proprio i solidi dati sperimentali pre-clinici accumulati dal nostro laboratorio ci hanno garantito il permesso ufficiale, da parte dell'Istituto Superiore di Sanità, di iniziare uno studio clinico pilota in fase 1 di allotrapianto di insule umane microincapsulate in pazienti con T1DM in assenza di complicazioni secondarie della malattia, di età compresa tra 20 e 40 anni, in totale assenza di immunosoppressione farmacologica. Dei dieci pazienti arruolati nello studio ne sono stati trapiantati, allo stato, quattro. Il procedimento, eseguito in anestesia locale sotto guida ecografica, ha mostrato di essere sprovvisto di effetti collaterali; e, con una massa di insule umane variabile da 400.000 a 600.000 IEQ per paziente (figura 2), sono stati osservati effetti sia metabolici che clinici ben documentati<sup>21</sup>. In particolare – anche se nessuno dei pazienti ha potuto al momento sospendere, ma solo ridurre sia pure consistentemente, il fabbisogno giornaliero di insulina esogena – si sono registrati un deciso decremento dei valori di HbA1c ed una riduzione degli episodi settimanali di ipoglicemia acuta; in assenza di effetti collaterali, soprattutto senza incorrere nei rischi connessi all'immunosoppressione farmaco-indotta.

■ **Per quanto riguarda (II)**, abbiamo sviluppato da molti anni nel nostro laboratorio procedimenti per la separazione e purificazione su larga scala di insule dal pancreas di suini sia adulti sia, a partire dal 2000, neonati. In particolare, le insule di suino neonato (NPI) sono facili da procurare in quantità virtualmente illimitate, ed in certe condizioni sperimentali messe a punto nel nostro laboratorio<sup>22</sup>, sono in grado di acquisire in pochi giorni la loro competenza fisiologica, in termini di adeguata risposta insulinica allo sti-

molo glucidico, che ne consente l'impiego operativo. **Abbiamo in effetti osservato che la co-coltura delle NPI con cellule del Sertoli (SC) omologhe, estratte dai testicoli degli stessi donatori, è in grado di indurre una rapida maturazione funzionale delle insule.** In studi pilota da noi eseguiti abbiamo dimostrato che il trapianto di NPI pre-coltivate con SC e microincapsulate ha completamente risolto la sindrome iperglicemica in topi NOD diabetici per oltre 15 settimane di follow-up post-intervento<sup>22</sup>. Le capsule estratte dal peritoneo di questi riceventi apparivano vitali and ancora in grado di rispondere alla stimolazione *in vitro* con glucosio mostrando un pattern fisiologico di secrezione insulinica (figura 3).

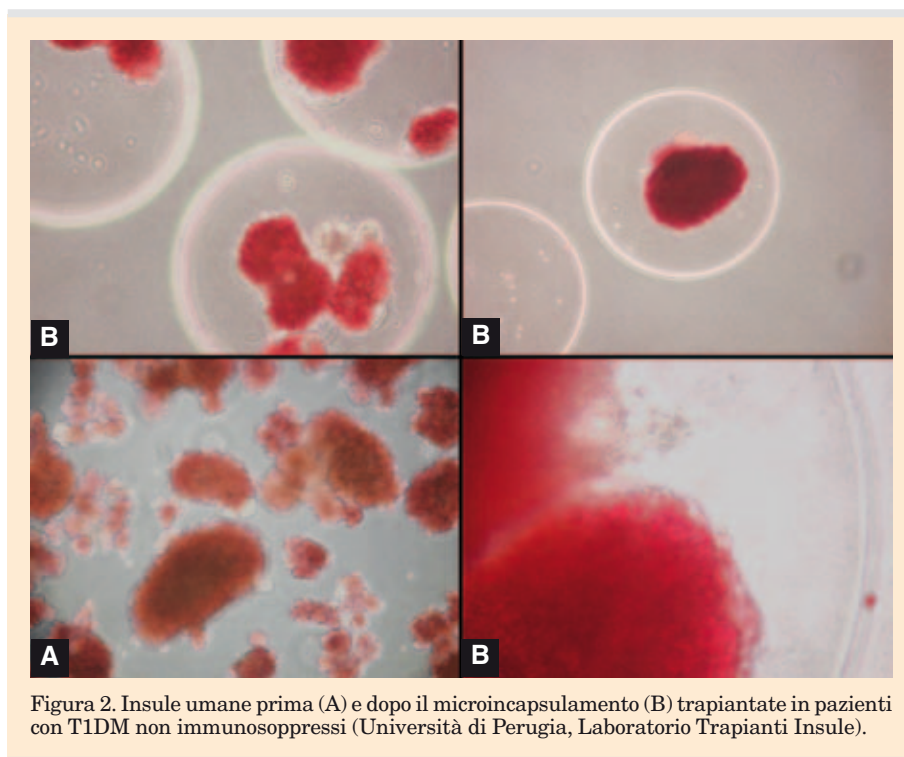


Figura 2. Insule umane prima (A) e dopo il microincapsulamento (B) trapiantate in pazienti con T1DM non immunosoppressi (Università di Perugia, Laboratorio Trapianti Insule).

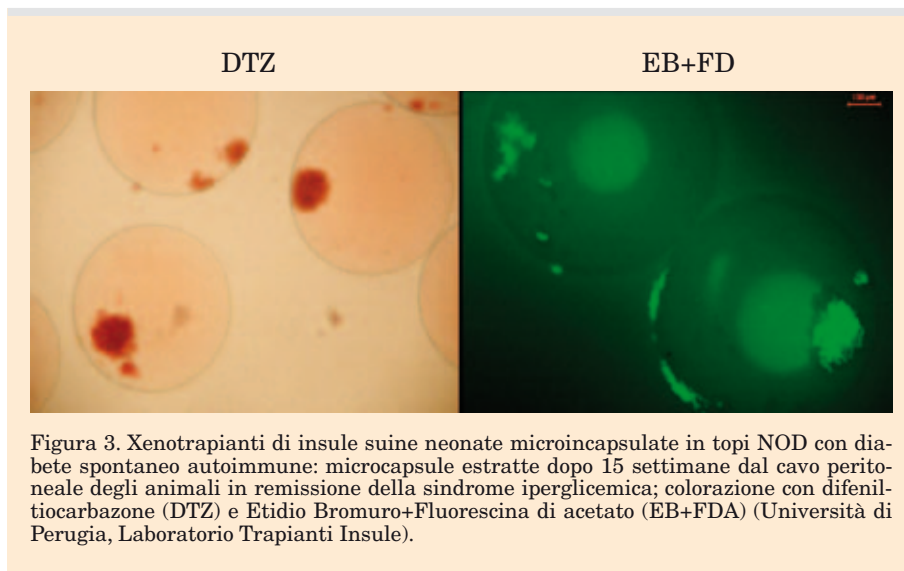


Figura 3. Xenotrasplanti di insule suine neonate microincapsulate in topi NOD con diabete spontaneo autoimmune: microcapsule estratte dopo 15 settimane dal cavo peritoneale degli animali in remissione della sindrome iperglicemica; colorazione con difenil-tiocarbazono (DTZ) e Etidio Bromuro+Fluorescina di acetato (EB+FDA) (Università di Perugia, Laboratorio Trapianti Insule).

Le remore che hanno fin qui di fatto escluso l'applicazione delle insule di suino dai trapianti umani, basate su potenziali rischi di trasmissione all'uomo di retrovirus suini (PERV)<sup>23</sup> sono attualmente molto ridimensionate<sup>24</sup> ed è prevedibile che i trapianti di insule suine neonate pre-condizionate con SC e microincapsulate, in pazienti con T1DM non immunosoppressi possano in effetti rappresentare un effettivo avanzamento di questo filone di ricerca applicata alla cura radicale del T1DM.

### Terapia molecolare e rigenerativa

Lo sviluppo embriologico del pancreas prende origine dal foglietto endodermico allo stadio di gastrula, come evaginazione dell'abbozzo intestinale primitivo<sup>25,26</sup>. Ovviamente, da tale abbozzo derivano sia le componenti esocrine/duttali che quelle endocrine del pancreas. Dai progenitori endocrini deriveranno le insule di Langerhans con il loro corredo cellulare  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e PP, a cui competerà la secrezione dei rispettivi ormoni e cioè glucagone, insulina, somatostatina e polipeptide pancreatico. Proprio a tali progenitori staminali è assegnato il compito di rigenerare/espandere la popolazione cellulare endocrina del pancreas, sostituendo elementi non più funzionanti con tessuto vitale in modo da mantenere la omeostasi glicemica. Questa, d'altra parte, viene meno quando la maggioranza delle cellule  $\beta$  è stata distrutta dal processo autoimmunitario, con l'inevitabile esordio clinico del T1DM. Modulando tale risposta autoimmune con interventi biomolecolari, si potrebbe facilitare la rigenerazione del tessuto distrutto grazie alla presenza dei progenitori staminali preposti ai meccanismi di neogenesi e riparazione tissutale.

#### CELLULE STAMINALI PANCREATICHE

È noto che esistono cellule staminali embrionali (ESC) ed adulte (ASC), sebbene queste ultime, alla luce delle restrizioni che in definitiva il concetto stesso di "staminalità" comporta, con particolare riferimento alla capacità di replicazione clonale e a quella di differenziazione verso elementi cellulari funzionalmente competenti e maturi, siano reperibili in numero assai esiguo negli organi ed apparati adulti. **Il vantaggio principale delle ESC, che fanno parte della massa cellulare interna della blastocisti, deriva dalla loro pluripotenza e quindi dalla capacità di dare origine a qualsiasi tipo cellulare conosciuto.** Inoltre, vi sono evidenti analogie tra alcuni passaggi della embriogenesi pancreatica e i processi di rigenerazione del pancreas. In effetti, in entrambi i casi sono stati individuati precursori endocrini multipotenti contenuti in una struttura simil-duttale che, in risposta a segnali particolari e dopo essersi staccati dalla struttura madre, proliferano, si differenziano e formano insule. A tale riguardo sono stati descritti vari marcatori duttali embrionali quali indicatori di proliferazione cellulare insulare<sup>27</sup>. Tuttavia, nonostante segnalazioni posi-

tive<sup>28</sup>, resta tuttora controverso se sia possibile stabilire linee di ESC in grado di evolvere stabilmente verso cellule insulino-secerenti in grado di controllare uno stato iperglicemico in modelli sperimentali animali di T1DM. Nondimeno, esistono anche svantaggi associati al potenziale impiego delle ESC: popolazioni cellulari possono infatti proliferare in modo incontrollato fino a formare teratomi o teratocarcinomi. Rimane aperto il problema della immunogenicità degli stipiti ESC che sono comunque soggetti, a meno che non siano autologhi, alla risposta immunitaria dell'ospite. Questa si potrebbe inoltre evitare ricorrendo ad interventi di ingegneria genetica e/o di fusione cellulare con gli elementi dell'ospite.

Infine, ultimi (ma non certo per importanza) vi sono problemi di bioetica che sono ancora oggetto di attivo dibattito.

Un tempo si riteneva che le cellule staminali scomparissero subito dopo la nascita, ma si è poi chiaramente osservato che elementi staminali esistono anche nei tessuti adulti. Le ASC mostrano inoltre un notevole grado di plasticità che rende possibili fenomeni di transdifferenziazione, ovvero la capacità di una cellula che appartiene ad una determinata origine embrionale e svolge una data funzione di trasformarsi in una cellula del tutto diversa (es. cellule ematopoietiche che divengono neuroni e viceversa) acquisendone inoltre anche i connotati funzionali. È stato descritto che cellule staminali umane possono transdifferenziarsi e formare cellule insulino-secerenti<sup>29</sup> in grado di correggere l'iperglicemia in topi diabetici<sup>27</sup>, ma, come sopra accennato, le ASC sono disponibili in quantità minime, non escludendosi peraltro la futura possibilità di modificarle geneticamente (ad esempio, con un'aumentata espressione del gene della telomerasi) in modo da accrescerne il potenziale replicativo e quindi la massa. Il midollo osseo, che è comunemente impiegato come sorgente di ASC, contiene cellule staminali sia ematopoietiche che mesenchimali (TAB). Queste ultime possono dare origine a cellule simil- $\beta$  in grado di produrre insulina<sup>30</sup> con iniziali risultati positivi di trapianti eseguiti in topi diabetici<sup>31</sup>. Altre sorgenti di ASC sono sicuramente il fegato e il pancreas. Le staminali epatiche possono differenziarsi in cellule insulino-secerenti, esprimendo geni tipici delle  $\beta$ -cellule, e si sono dimostrate in grado di indurre la remissione della sindrome iperglicemica in roditori diabetici<sup>32</sup>.

Quanto al pancreas, mentre studi sperimentali hanno postulato l'origine duttale di precursori pancreatici endocrini<sup>27</sup>, non si esclude, al momento, la possibilità che caratteristiche di staminalità possano ascrivere anche alle stesse cellule  $\beta$  che sarebbero in grado di garantire un certo grado di turnover<sup>28</sup>. È probabile che la limitata proliferazione delle ASC sia controbilanciata entro certi limiti dalla riduzione del rischio di fenomeni di replicazione incontrollata.





Nel nostro laboratorio abbiamo preliminarmente elaborato metodi per la separazione di progenitori cellulari epatici e pancreatici che abbiamo condizionato ad esprimere il fenotipo endocrino con il contestuale corredo di fattori trascrizionali e la preliminare capacità di rispondere allo stimolo glucidico sia *in vitro* che *in vivo*, previo microincapsulamento, o non, in topi diabetici<sup>33,34</sup>.

ne diabetica, ha notevolmente migliorato la storia clinica della malattia, sia in termini di quadro clinico che di contenimento del rischio di sviluppare complicanze croniche secondarie. Tuttavia, le migliorate condizioni terapeutiche non sono in grado di eliminare, e possono soltanto ridurre, l'incidenza delle complicanze secondarie del T1DM.

**AUTOIMMUNITÀ  
E RIGENERAZIONE  
PANCREATICA ENDOCRINA**


Sulla base di quanto fin qui detto e tra le varie ipotesi, si può con buona approssimazione assumere che precursori cellulari forse di tipo non convenzionale siano localizzati in stretta prossimità o all'interno della massa cellulare endocrina e che essi possano attivarsi in coincidenza di un aumento della richiesta metabolica e con la intermediazione di fattori ancora sconosciuti. Tuttavia questo equilibrio si rompe inesorabilmente con la comparsa di cloni di linfociti T autoreattivi in grado di distruggere progressivamente il patrimonio  $\beta$ -cellulare pancreatico. È ovvio che nel momento in cui l'autodistruzione  $\beta$ -cellulare eccede le capacità rigenerative compensatorie del pancreas, si vanifica irrimediabilmente ogni tentativo di riequilibrare l'omeostasi glicemica e e quindi impedire la comparsa del T1DM manifesto. Come si è potuto osservare nel topo NOD, che resta il miglior modello sperimentale animale di T1DM, l'ablazione farmaco-immunologica dei cloni T cellulari autoreattivi che persistono per lunghi periodi di tempo coincide con una evidente spinta rigenerativa di tessuto  $\beta$ -cellulare<sup>35</sup>.

È quindi possibile teorizzare che una stabile soppressione della autoaggressione immunitaria possa consentire non solo l'attivazione di meccanismi di riparazione delle cellule  $\beta$ , ma anche l'efficiente impiego operativo di progenitori staminali per accelerare e completare la ricostituzione della massa cellulare endocrina distrutta dal processo autoimmune del T1DM.



**Conclusioni**

Non sussistono dubbi sul fatto che la recente introduzione di molecole insuliniche dotate di sempre più flessibile farmacocinetica, in grado di adattarsi in modo progressivamente crescente ai mutevoli stili di vita dei pazienti, con particolare riferimento ai segmenti giovanili della popolazio-

<b>In sintesi: i punti chiave</b>	
<b>Terapia radicale del diabete mellito di tipo I insulino-dipendente</b>	
PRESENTE	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Trapianto di pancreas intero.</li> <li>- Trapianto di insule di Langerhans isolate.</li> </ul>	
FUTURO: MEDIA SCADENZA	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Xenotrapianti di insule suine microincapsulate/immunoisolate.</li> </ul>	
FUTURO: LUNGA SCADENZA	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cellule staminali embrionali.</li> <li>- Cellule staminali adulte.</li> <li>- Rigenerazione <i>in situ</i> delle cellule beta, associata ad induzione della tolleranza autoimmune.</li> <li>- Cellule beta artificiali (ingegneria genetica).</li> <li>- Pancreas artificiale miniaturizzato.</li> </ul>	

**Ringraziamenti**

Si ringrazia il Consorzio Interuniversitario per i Trapianti d'Organo per il continuo sostegno a questo lavoro.

**Bibliografia**

1. Gepts W. Islet morphology in type 1 diabetes. Behring Instr Mitt 1984; 67: 405-10.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004; 27: 1047-53.
3. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993; 329: 977-86.
4. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC). Design, implementation, and preliminary results of a long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial cohort. Diabetes Care 1999; 22: 99-111.
5. Sutherland DE, Gruessner RW, Dunn DL, Matas AJ, Humar A, Kandaswamy R, et al. Lessons learned from more than 1000 pancreas transplants at a single institution. Ann Surg 2001; 233: 463-501.
6. Sutherland DE. Current status of beta-cell replacement therapy (pancreas and islet transplantation) for treatment of diabetes mellitus. Trans Proc 2003; 35: 1625-7.
7. Bottino R, Trucco M, Balamurugan AN, Starzl TE. Pancreas and islet cell transplantation. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2002; 16: 457-74.
8. Bottino R, Balamurugan AN, Giannoukakis N. Islet/Pancreas transplantation: challenges for Pediatrics. Pediatr Diabetes 2002; 3: 210-23.
9. Boggi U, Vistoli F, Signori S, Del Chiaro M, Amorese G, Vanadia-Bartolo T, et al. Outcome of 118 pancreas transplants with retroperitoneal portal-enteric drainage. Trans Proc 2005; 37: 2640-8.

10. Leonet J, Malaise J, Goffin E, Lefebvre C, Tennstedt D, Vandeleene B, et al. Solitary pancreas transplantation for life-threatening allergy to human insulin. *Transpl Int* 2006; 19: 474-7.
11. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35-9.
12. Bertuzzi F, Secchi A, Di Carlo V. Islet transplantation in type 1 diabetic patients. *Trans Proc* 2004; 36: 603-4.
13. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Toth E, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-8.
14. Bretzel R, Brendel M, Hering B. Newsletter #8, International Islet Transplant Registry 1999.
15. Ryan EA, Bigam D, Shapiro AJM. Current indications for pancreas or islet transplantation. *Diabetes Obesity & Metab* 2006; 8: 1-7.
16. Balamurugan AN, Bottino R, Giannoukakis N, Smetanka C. Prospective and challenges of islet transplantation for the therapy of autoimmune diabetes. *Pancreas* 2006; 32: 231-43.
17. American Diabetes Association. Position statement: pancreas transplantation for patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(suppl 1): S105.
18. Kriz J, Saudek F, Girman P, Novota P. Enhancement of rat islet tolerance with bone marrow transplantation using a non-mieloablative procedure II: failure despite the presence of lymphocyte microchimerism in the fully allogeneic Lewis/Brown-Norway model. *Int J Tissue React* 2004; 26: 75-83.
19. Calafiore R. Alginate microcapsules for pancreatic islet cell graft immunoprotection: struggle and progress towards the final cure for type 1 diabetes mellitus. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3: 201-5.
20. Calafiore R, Basta G, Luca G, Calvitti M, Calabrese G, Racanicchi L, et al. Grafts of microencapsulated pancreatic islet cells for the therapy of diabetes mellitus in nonimmunosuppressed animals. *Biotechnol. and Applied Biochemistry* 2004; 39 (pt 2): 159-64.
21. Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Montanucci P, Calabrese G, Racanicchi L, Mancuso F, Brunetti P. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. *Diabetes Care* 2006; 29: 137-8.
22. Luca G, Nastruzzi C, Calvitti M, Becchetti E, Baroni T, Neri LM, et al. Accelerated functional maturation of isolated neonatal porcine islets: in vitro and in vivo post-transplant results in NOD mice. *Cell Transplantation* 2005; 14: 249-61.
23. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Medicine* 1997; 3: 282-7.
24. Fishman JA, Patience C. Xenotransplantation: infectious risk revisited. *Am J Transplant* 2004; 9: 1383-90.
25. Wells JM. Genes expressed in the developing endocrine pancreas and their importance for stem cells and diabetes research. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19: 191-201.
26. Jensen J. Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev Dyn* 2004; 229: 176-200.
27. Ramiya VK, Maraist M, Afors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000; 6: 278-82.
28. Dor Y, Brown J, Martinez OL, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 2004; 429: 41-6.
29. Bonner-Weir S, Sharma A. Pancreatic stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 519-26.
30. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.
31. Kodama S, Kuhtreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science* 2003; 302: 1223-6.
32. Zalzman M, Gupta S, Giri RK. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7253-8.
33. Guido L, Basta G, Racanicchi L, Mancuso F, Luca G, Macchiarulo G, et al. Short-term stimulation studies on neonatal pig pancreatic duct-derived cell monolayers. *Trans Proc* 2005; 37: 2715-8.
34. Mancuso F, Basta G, Calvitti M, Luca G, Guido L, Racanicchi L, et al. Long-term cultured neonatal porcine islet cell monolayers: a potential tissue source for transplant in diabetes. *Xenotransplantation* 2006; 13: 289-98.
35. Trucco M. Regeneration of the pancreatic beta-cell. *J Clin Invest* 2005; 115: 5-12.

---

Indirizzo per la corrispondenza:  
Prof. Paolo Brunetti  
Università  
Dipartimento di Medicina Interna  
Sezione di Medicina Interna e  
Scienze Endocrine e Metaboliche  
Centro Regionale di Riferimento per la Malattia Diabetica  
Via Enrico Dal Pozzo  
06126 Perugia  
E-mail: pabrunet@unipg.it