

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

Direttore: Chiar.mo Prof. R. Vettor

UOC DI MALATTIE DEL METABOLISMO

Direttore: Chiar.mo Prof. A. Avogaro

TESI DI LAUREA

IPERGLICEMIA, CELLULE STAMINALI CIRCOLANTI E OUTCOME A LUNGO TERMINE DI COVID-19

RELATORE: Chiar.mo Prof. Gian Paolo Fadini

CORRELATORE: Dott.ssa Benedetta Maria Bonora

LAUREANDA: Marella Marassi

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

*Al mio papà, per aver detto sempre parole di valore e per
aver sempre dato valore alle parole che ha detto*

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
1. DIABETE.....	5
1.1 DEFINIZIONE.....	5
1.2 DIAGNOSI	5
1.3 CLASSIFICAZIONE.....	6
1.4 COMPLICANZE DELLA MALATTIA DIABETICA.....	8
1.5 TERAPIA DELLA MALATTIA DIABETICA	11
2. COVID-19.....	13
2.1 DEFINIZIONE.....	13
2.2 QUADRO CLINICO	14
2.3 DIAGNOSI	15
2.4 COMPLICANZE	16
2.5 TERAPIE APPROVATE.....	17
2.6 LONG-COVID.....	19
3. DIABETE E COVID-19	23
3.1 RUOLO DEL DIABETE NEL RISCHIO DI INFEZIONE E NEL RISCHIO DI COMPLICANZE	23
3.2 COVID-19 E COMPARSA DI NUOVO DIABETE O PEGGIORAMENTO DEL DIABETE	26
4. CELLULE STAMINALI CIRCOLANTI.....	30
4.1 PRINCIPALI SOTTOTIPI DI CELLULE STAMINALI CIRCOLANTI	30
4.2 SIGNIFICATO CLINICO	32
5. CELLULE STAMINALI E DIABETE	35
6. CELLULE STAMINALI E COVID-19	37
SCOPO DELLA TESI	40
MATERIALI E METODI	41
1. Popolazione dello studio	41
2. Valutazione degli outcomes a lungo termine	41
3. Procedure analitiche per la quantificazione delle cellule staminali circolanti	42
4. Analisi statistica	45

RISULTATI	47
1. Caratteristiche cliniche della popolazione dello studio.....	47
2. Stratificazione della popolazione in base all'outcome a lungo termine (12 mesi).....	49
3. Fattori predittivi di outcome sfavorevole a lungo termine (12 mesi).....	52
4. Fattori predittivi indipendenti di outcome sfavorevole a lungo termine (12 mesi).....	54
5. Valutazione dello sviluppo di sindrome long-COVID	56
6. Fattori predittivi dello sviluppo di long-COVID syndrome.....	58
7. Utilizzo di risorse e long-COVID	61
DISCUSSIONE	62
CONCLUSIONI	71
BIBLIOGRAFIA	72

RIASSUNTO

Background. Nel contesto della pandemia da COVID-19, l'iperglicemia al momento dell'ammissione in ospedale, di frequente riscontro nei pazienti con infezione da SARS-CoV-2, si è dimostrata più strettamente associata ad un outcome sfavorevole (forma di COVID-19 severa, ammissione in terapia intensiva e mortalità intra-ospedaliera) rispetto al diabete pre-esistente.

Le cellule staminali ematopoietiche/progenitrici circolanti (HSPC) sono una rara ed eterogenea popolazione cellulare che viene rilasciata dal midollo osseo nel sangue periferico e che è coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi dei tessuti periferici, promuovendo la risposta riparativa endogena in caso di danno. I livelli di HSPC risultano ridotti in presenza di fattori di rischio cardiovascolari e diabete. La loro riduzione si è dimostrata predittiva di mortalità cardiovascolare e per tutte le cause. La riduzione di HSPC nei pazienti con COVID-19 è risultata associata ad un outcome intraospedaliero sfavorevole (trasferimento in ICU/morte) e sembra essere responsabile di parte dell'effetto negativo che l'iperglicemia esercita sull'outcome di malattia.

Scopo della tesi. Valutare se i livelli di HSPC e di glicemia rilevati al momento dell'ospedalizzazione per infezione da SARS-CoV-2, siano predittivi di mortalità a lungo termine (a 12 mesi). Inoltre, valutare se le stesse variabili predicano lo sviluppo di long-COVID (LCS) e quale sia l'impatto sulle risorse sanitarie di questa condizione.

Materiali e Metodi. Tra Dicembre 2020 e Marzo 2021, sono stati consecutivamente arruolati pazienti ricoverati per infezione da SARS-CoV-2 presso il reparto di Malattie Infettive dell'Azienda Ospedale-Università di Padova. Per ciascun paziente sono state raccolte le seguenti informazioni: dati demografici, comorbidità, anamnesi farmacologica, parametri biochimici al momento del ricovero e terapie somministrate durante la malattia acuta; è stato inoltre raccolto un campione ematico per la quantificazione dei livelli di HSPC mediante analisi citofluorimetrica.

È stato eseguito un follow-up per i 12 mesi successivi all'ospedalizzazione mediante revisione delle cartelle cliniche elettroniche e dei registri di anagrafe regionali, al fine di valutare l'insorgenza di morte, lo sviluppo di sintomi indicativi di long-COVID e la necessità di dover ricorrere all'impiego di risorse sanitarie.

Risultati. Dei 100 pazienti arruolati, 20 sono deceduti entro la fine del periodo di follow up. La riduzione di HSPC e l'aumento della glicemia al momento dell'ospedalizzazione sono risultate associate a mortalità a 12 mesi sia all'analisi di regressione univariata che multivariata corretta per fattori confondenti.

Tra gli 85 pazienti valutati per lo sviluppo di segni e sintomi di LCS, 36 hanno sviluppato manifestazioni cliniche indicative di LCS. In questo caso, l'iperglicemia e i livelli di HSPC al momento dell'ingresso in ospedale non si sono dimostrati essere fattori predittivi di sviluppo di LCS. Le variabili risultate significativamente associate a LCS sono state l'aver sviluppato una polmonite COVID-relata e l'aver richiesto l'impiego di glucocorticoidi o plasma iperimmune durante la fase di malattia acuta.

Conclusioni. In una coorte di pazienti ospedalizzati per infezione da SARS-CoV-2, un basso livello di HSPC e l'iperglicemia al momento dell'ospedalizzazione si sono confermati essere predittori indipendenti di mortalità a 12 mesi dal COVID-19. Tuttavia, nella stessa popolazione, tali variabili non sono risultate associate significativamente allo sviluppo di long-COVID syndrome nei 12 mesi successivi al ricovero.

È possibile quindi concludere che ridotti livelli di HSPC possano rappresentare un valido fattore predittivo di mortalità in diverse condizioni caratterizzate da una compromissione dell'omeostasi sistemica.

ABSTRACT

Background. Admission hyperglycemia, a common finding among patients infected by SARS-CoV-2, has shown to predict adverse outcome (severe COVID-19, transfer to intensive care unit and in-hospital death) more than pre-existing diabetes.

Hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) are a rare and heterogeneous cell population, which is released from the bone-marrow to peripheral blood and contributes to peripheral tissue homeostasis by enhancing endogenous repair capacity in response to tissue injuries.

HSPC levels are reduced in the presence of cardiovascular risk factors and diabetes. A reduction in their levels can predict cardiovascular and all-cause mortality.

Among COVID-19 patients, circulating HSPC depletion has been associated to an in-hospital adverse outcome (ICU admittance/death) and it may be a significant mediator of the adverse effect of hyperglycemia on COVID-19 outcomes.

Aims. The aim of the study was to evaluate whether HSPC levels and fasting plasma glucose (FPG) concentration, collected at the time of in-hospital admission for SARS-CoV-2 infection, predict long-term mortality (at 12 months) for COVID-19. Furthermore, we evaluated whether the same variables predict the development of long-COVID syndrome (LCS) and estimated the healthcare burden associated with this condition.

Materials and methods. Between December 2020 and March 2021, patients admitted for SARS-CoV-2 infection to the infectious disease ward of Padova University Hospital were consecutively enrolled. For each patient, we collected the following information: demographic data, comorbidities, ongoing medications, laboratory data at the time of admission and treatments for COVID-19. Furthermore, a blood sample was collected for the quantification of HSPCs with flow cytometer.

Follow-up was performed for 12 months after hospitalization through the review of electronic medical records and demographic local registers in order to assess the occurrence of death, the development of long-COVID symptoms, and the need for medical care after hospitalization.

Results. Among the 100 subjects included in the study, 20 died during the follow-up period. Reduced levels of HSPC and higher FPG at admission were associated with 12-month mortality in both unadjusted and adjusted regression analyses.

Among the 85 patients evaluated for the occurrence of signs and symptoms of long-COVID, 36 developed clinical manifestations related to LCS. Admission hyperglycemia and HSPC levels were not significantly associated with the development of LCS. The development of COVID-pneumonia, and the use of glucocorticoids and plasma during the hospitalization for COVID-19 were associated with the occurrence of LCS.

Conclusions. In a cohort of patients hospitalized for SARS-CoV-2 infection, low HSPCs and hyperglycemia at the time of admission are independent predictors of 12-month mortality for COVID-19. However, in the same population, these variables were not significantly associated with the development of signs and symptoms of long-COVID during the 12 months after hospitalization.

Therefore, reduced levels of HSPCs may represent a valid predictor of mortality in different conditions characterized by an impairment of the systemic homeostasis.

INTRODUZIONE

1. DIABETE

1.1 DEFINIZIONE

Il diabete mellito (DM) è un gruppo di disordini metabolici ad elevata prevalenza il cui hallmark è l'iperglicemia, che può essere secondaria a un difetto assoluto o relativo di insulina (1).

In accordo con la International Diabetic Foundation, la prevalenza della malattia diabetica è stata stimata essere globalmente 9.3% (463 milioni di persone) nel 2019 e potrebbe raggiungere – in accordo con le proiezioni – il 10.9% nel 2050 (2).

Attualmente, il diabete è dunque una delle patologie croniche più comuni, il cui numero di affetti - soprattutto per quanto concerne il diabete di tipo 2 - è in forte crescita sia per l'invecchiamento della popolazione, sia per la sempre più dilagante diffusione dei fattori predisponenti, come obesità e sedentarietà. Inoltre, un contributo alla crescita della prevalenza è dato anche dall'aumento della aspettativa di vita dei pazienti diabetici grazie ai miglioramenti avvenuti nella loro gestione (2)(3).

Il diabete e le complicanze ad esso correlate si configurano come una delle cause più significative di morbilità e si associano ad un aumento di 2-3 volte del rischio di mortalità per tutte le cause, imponendosi come una delle patologie con maggiore impatto sanitario e socio-economico (3).

1.2 DIAGNOSI

Per porre diagnosi di diabete, possono essere applicati i seguenti criteri (1):

- A. Glicemia a digiuno ≥ 126 mg/dl;
- B. sintomi tipici di iperglicemia (poliuria, polidipsia, calo ponderale) e glicemia casuale ≥ 200 mg/dl;
- C. Glicemia a due ore dopo OGTT ≥ 200 mg/dl;
- D. HbA1c ≥ 48 mmol/L.

Nel caso in cui non siano presenti sintomi, la positività a un criterio deve essere confermata dal soddisfacimento del medesimo o altro criterio in una seconda occasione.

Inoltre, si riconoscono due altre condizioni sempre caratterizzate da una alterazione della omeostasi del glucosio ma non tali da soddisfare i criteri per la diagnosi di diabete:

- IFG (Impaired Fasting Glucose), se la glicemia a digiuno è compresa nell'intervallo 100-125 mg/dl.
- IGT (Impaired Glucose Tolerance): se la glicemia 2 ore dopo OGTT è compresa nell'intervallo 140-199 mg/dl.

Esse sono state riunite sotto il termine “prediabete” e non dovrebbero essere considerate delle entità cliniche autonome, quanto piuttosto un fattore di rischio per la progressione verso diabete conclamato e sviluppo di malattia cardiovascolare. Le condizioni di IFG e IGT si trovano infatti spesso associate alla presenza di obesità, ipertensione e dislipidemia e al loro riscontro dovrebbe fare seguito un'attenta valutazione dei fattori di rischio cardiovascolari (1).

1.3 CLASSIFICAZIONE

Pur essendo tutte le forme di diabete accumulate dall'alterazione dell'omeostasi del glucosio, le differenti tipologie vengono distinte sulla base di un criterio eziopatogenetico (1):

- Diabete mellito tipo 1 (DM1): si divide in autoimmune e idiopatico; la seguente trattazione si concentrerà soprattutto sul DM1 autoimmune, la forma più comune.

Il DM1 autoimmune è responsabile di circa il 5% dei casi di DM e si sviluppa a seguito alla distruzione immuno-mediata delle cellule β del pancreas,

causante un deficit assoluto della produzione di insulina.

La malattia si sviluppa in soggetti predisposti a seguito della interazione tra fattori genetici e trigger ambientali e si accompagna ad evidenza di autoanticorpi diretti contro le cellule insulari (anti-GAD-65, anti-insulina, anti-cellule insulari), anche se il loro ruolo nella patogenesi della malattia non è completamente chiarito.

Possono essere individuati tre differenti stadi (1) del DM1: lo stadio I e II corrispondono a una condizione pre-sintomatica con evidenza di autoanticorpi e progressiva perdita del controllo glicemico; lo stadio III definisce la malattia clinicamente evidente, la quale si manifesta

tipicamente prima dei 20 anni d'età, quando vengono distrutte circa l'80% delle cellule β . L'esordio della malattia spesso avviene in modo acuto, presentandosi come chetoacidosi diabetica.

- Diabete mellito tipo 2 (DM2): comprende il 90% dei casi di DM.

I due elementi centrali che lo caratterizzano dal punto di vista fisiopatologico sono l'insulino-resistenza e l'alterata secrezione di insulina. Nei soggetti affetti frequentemente è presente un quadro di obesità viscerale: il tessuto adiposo diviene sede di infiammazione ed è stato riconosciuto secernere differenti sostanze pro-infiammatorie in circolo (come NEFA, leptina, TNF α , IL-6). Queste, agendo primariamente sulle cellule dei tessuti insulino-sensibili, ovvero fegato e muscolo, attivano pathways molecolari che contrastano il *signaling* a valle della interazione dell'insulina con il suo recettore e ciò conduce allo sviluppo di insulino-resistenza (4).

Questa forma di diabete ha un esordio tardivo, spesso subdolo (tant'è che la diagnosi viene spesso posta occasionalmente) ed è preceduto da una lunga fase asintomatica; frequentemente alla diagnosi sono già presenti le complicanze croniche cardiovascolari (1).

Altri tipi di diabete: gruppo eterogeneo di forme di diabete di cui è nota la eziologia.

Rientrano in questo gruppo:

- I) Difetti genetici della B cellula (MODY, DNA MITOCONDRIALE)
 - II) Difetti genetici dell'azione insulinica
 - III) Malattie del pancreas esocrino
 - IV) Endocrinopatie
 - V) Diabete indotto da farmaci o chimici
 - VI) Infezioni
 - VII) Forme non comuni di diabete immuno-mediato
 - VIII) Altre sindromi genetiche talora associate al diabete
- Diabete gestazionale (GDM): forma di ridotta tolleranza glucidica che si instaura durante il secondo o terzo trimestre di gravidanza solitamente diagnosticato tra la 24 e la 28 settimana) a seguito dei cambiamenti metabolici che avvengono in questa condizione. Dopo il parto, c'è

generalmente un ripristino della normale tolleranza al glucosio, anche se sia la madre sia il bambino nato da madre con GDM hanno aumentato rischio di sviluppare DM2 nel corso della vita (5).

1.4 COMPLICANZE DELLA MALATTIA DIABETICA

Uno dei meccanismi preponderanti implicati nello sviluppo delle complicanze legate alla malattia diabetica è il difetto di uptake di glucosio da parte delle cellule e lo stato di iperglicemia che di conseguenza si instaura.

Le complicanze vengono divise in acute e croniche.

Per quanto concerne le complicanze acute, esse sono:

1. Chetoacidosi diabetica: si instaura tipicamente in un contesto di DM1, di cui può rappresentare anche l'esordio clinico.

Nonostante i criteri per definire la chetoacidosi divergano tra le differenti società scientifiche, il riscontro delle seguenti tre alterazioni è fondamentali ai fini della diagnosi: iperglicemia, acidosi metabolica e chetosi (6).

Da un punto di vista fisiopatologico, la condizione incorre quando al difetto insulinico si accompagna un aumento degli ormoni controregolatori a seguito della comparsa di fattori intercorrenti (come infezioni, patologie maggiori, sostanze che interferiscono con il metabolismo glucidico, endocrinopatie). Ciò stimola massivamente la lipolisi, portando a un eccesso di acidi grassi liberi (FFA) che arriva al fegato; in questa situazione, nei mitocondri degli epatociti gli FFA vengono ossidati a corpi chetonici (acetoacetato ed idrossibutirrato) (6) che vengono rilasciati nella circolazione sistemica.

Il quadro clinico si presenta con poliuria, polidipsia, calo ponderale e sintomi ascrivibili alla chetoacidosi (nausea, vomito, dolore addominale).

2. Sindrome iperglicemica iperosmolare: complicanza acuta del DM2.

Si caratterizza per iperglicemia grave (>600 mg/dl), iperosmolarità plasmatica (>320 mOsm/L) e assenza di chetoacidosi.

Dal punto di vista clinico, si evidenziano poliuria osmotica, calo ponderale e marcati segni di disidratazione, mentre sono tipicamente assenti la nausea e il dolore addominale. Possono essere presenti alterazioni dello stato di coscienza a seguito della elevata osmolarità plasmatica come confusione mentale, letargia, coma (7).

Relativamente alle complicanze croniche del diabete mellito, queste sono responsabili della maggior parte della morbilità e della mortalità della malattia e vengono tradizionalmente divise in (8):

1. Complicanze macroangiopatiche: rientrano in questa categoria le differenti declinazioni della malattia aterosclerotica, come la coronaropatia, la malattia arteriosa periferica, le malattie cerebrovascolari.

Nella patogenesi delle complicanze macrovascolari associate al diabete, l'iperglicemia si somma agli altri fattori di rischio cardiovascolari frequentemente concomitanti, come dislipidemia, ipertensione e fumo. Nonostante queste multiple condizioni di rischio, il diabete rimane un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di malattia ischemica, ictus e morte (8).

2. Complicanze microangiopatiche: esse sono più strettamente legate dal punto di vista fisiopatologico alla condizione di iperglicemia.

Infatti, questa contribuisce a danneggiare i tessuti attraverso cinque differenti meccanismi, i quali hanno come denominatore comune la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (9): I) iperattivazione del pathway dei polioli; II) produzione di *advanced glycation end-products* (AGEs); III) attivazione di PKC; IV) iperattivazione della via delle esosammine.

Le complicanze microvascolari sono:

- La retinopatia diabetica, complicanza più frequente del diabete e causa principale di cecità nella popolazione in età lavorativa (8,10).

Da un punto di vista clinico, si distinguono le forme: retinopatia non proliferante (caratterizzata da alterazioni della permeabilità capillare, ispessimento della membrana basale e microaneurismi), retinopatia proliferante (la neoangiogenesi è promossa dalla induzione di VEGF in risposta all'ipossia) e edema maculare, che può presentarsi nel contesto di ambedue le condizioni precedenti (10).

- La neuropatia diabetica: può coinvolgere sia il sistema nervoso periferico sia il sistema nervoso autonomico.

Per quanto riguarda la prima condizione, che è la forma più comune, tipicamente si manifesta sotto forma di polineuropatia distale simmetrica:

sintomatologicamente, appaiono per prime l'alterazione della sensibilità (iperestesi, parestesi, disestesi) e della percezione dolorifica con una distribuzione "a guanto e calzino", solo successivamente seguite dal deficit motorio, che si presenta nella malattia di maggiore durata (11).

Relativamente alla neuropatia autonoma, l'intero SNA può essere coinvolto: alcuni esempi sono l'interessamento del sistema cardiovascolare (ipotensione ortostatica, tachicardia a riposo), del sistema gastrointestinale (gastroparesi, ritardato svuotamento gastrico), disfunzioni genitourinarie e impotenza. Essa è una importante causa di morbilità e mortalità, essendo associata ad un aumentato rischio di ischemia miocardica silente e morte improvvisa (8,11).

- La nefropatia diabetica, causa principale di *end-stage kidney disease*. È una sindrome clinica che coinvolge dal 20% al 50% dei pazienti diabetici ed è caratterizzata da albuminuria persistente e/o riduzione della funzionalità renale, accompagnata da un tipico pattern di malattia glomerulare (12).

La patogenesi di questa complicanza microvascolare vede implicati gli stessi meccanismi coinvolti anche nello sviluppo della retinopatia, con la quale spesso si presenta in associazione (8).

Se nel DM1 la presenza di albuminuria persistente, concomitanza di retinopatia e mancanza di evidenza di malattia renale alternativa si associano strettamente a un quadro istologico compatibile con glomerulopatia diabetica, i pazienti affetti da DM2 possono presentare in maggiore eterogeneità sia clinica sia istologica. Infatti, alcuni pazienti che presentano albuminuria possono presentare all'istologia un quadro non compatibile con la nefropatia diabetica classicamente descritta; viceversa, è sempre maggiormente riconosciuto – sia nel contesto del DM1 sia nel DM2 – un quadro di riduzione della funzionalità renale in presenza di una normale escrezione urinaria di albuminuria (*non-albuminuric diabetic kidney disease*), fatto che potrebbe riflettere un maggior coinvolgimento della componente tubulo-interstiziale nel danno renale (12).

In ogni caso, nonostante il termine "nefropatia diabetica" ora ricomprenda lo spettro eterogeneo di pazienti diabetici che hanno o albuminuria o riduzione della funzionalità renale, il riscontro di albuminuria rimane un

fattore fortemente predittivo di aumento del rischio cardiovascolare e di mortalità.

1.5 TERAPIA DELLA MALATTIA DIABETICA

Considerato che nella patogenesi delle complicanze associate alla malattia diabetica un ruolo preponderante è svolto dalla iperglicemia, l'obiettivo terapeutico deve essere quello di raggiungere un ottimale controllo glicemico personalizzato per ciascun paziente al fine di ridurre la morbilità e la mortalità associate alla malattia. Sono stati definiti gli obiettivi terapeutici per i pazienti diabetici (13):

- HbA1c < 7.0%
- Glicemia capillare preprandiale: 80-130 mg/dL
- Glucosio capillare postprandiale: < 180 mg/dL

Resta comunque di vitale importanza associare a questo obiettivo la gestione delle complicanze del DM e agire sui fattori di rischio per le malattie che si associano al DM stesso. Pertanto, in accordo con le più recenti linee guida, nella gestione dei pazienti diabetici è fondamentale privilegiare la scelta di quei farmaci che non solo siano ipoglicemizzanti, ma che permettano di ottenere in concomitanza un effetto protettivo anche dal punto di vista cardiovascolare e renale (14).

Per quanto riguarda il DM tipo 1, visto il difetto di produzione endogena di insulina, la terapia consiste nella somministrazione sottocute di insulina esogena (prodotta attraverso la tecnica del DNA ricombinante), in modo tale da simulare la secrezione fisiologica dell'ormone.

Lo schema terapeutico si articola attraverso la somministrazione di una insulina a lunga durata di azione – tale da soddisfare il fabbisogno basale di insulina – e la somministrazione di insulina “rapida” a breve durata di azione, da somministrare in boli in concomitanza dei pasti, in modo da fare fronte al carico di carboidrati forniti dall'assunzione di cibo (15). Bisogna sempre tenere presente che il maggior rischio legato alla terapia insulinica è l'ipoglicemia (13).

Nel DM tipo 2, oltre al controllo glicemico, particolare attenzione deve essere rivolta alla gestione delle comorbilità associate e al controllo del rischio cardiovascolare: l'intervento iniziale dovrebbe essere rivolto al cambiamento dello stile di vita, che ha dimostrato ridurre i fattori di rischio associati allo sviluppo di complicanze cardiovascolari nei pazienti con DM2 (16).

Per quanto riguarda la terapia ipoglicemizzante orale, il farmaco di prima scelta è la metformina (15), che agisce riducendo la produzione epatica di glucosio e come insulino-sensibilizzante, permettendo di ottenere anche una moderata riduzione del rischio cardiovascolare.

Qualora la monoterapia non fosse sufficiente al raggiungimento degli obiettivi, è possibile impostare una terapia di associazione (15). Sulla base delle comorbilità prevalenti – obesità, problematiche cardiovascolari, coinvolgimento renale – è possibile ottimizzare la scelta del farmaco ipoglicemizzante più adatto tra: sulfaniluree, tiazolidinedioni, inibitori di DPP-4, inibitori di SGLT2 e analoghi di GLP-1, terapia insulinica.

In virtù degli studi che hanno dimostrato il loro effetto benefico sugli eventi cardiovascolari maggiori e sulla mortalità da tutte le cause, gli SGLT-2 inibitori e gli agonisti del recettore di GLP-1 sono i farmaci di prima scelta assieme alla metformina per il trattamento dei pazienti con DM2 e pregressi eventi cardiovascolari, in assenza di scompenso cardiaco. Qualora questa condizione fosse presente, si raccomanda l'impiego degli inibitori di SGLT-2 come prima scelta, considerati gli effetti favorevoli che hanno dimostrato avere in questo contesto (14).

2. COVID-19

2.1 DEFINIZIONE

SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) è un betacoronavirus ad elevata trasmissibilità emerso alla fine del 2019 che si è reso responsabile di una patologia sistemica a prevalente coinvolgimento respiratorio di proporzioni pandemiche, denominata COVID-19 (17).

Il primo focolaio di malattia si è sviluppato nella città di Wuhan, Cina, nel Dicembre 2019, dove sono stati registrati una serie di casi con presentazione clinica simile a quella di una polmonite virale, diffusasi velocemente alle altre parti della nazione

fino a coinvolgere il resto del mondo.

Alla fine di Gennaio 2020, la WHO ha definito la malattia COVID-19 “Public Health Emergency of International Concern” (18) e successivamente ha dichiarato lo stato pandemico l’11 Marzo 2020.

La pandemia si è evoluta negli anni 2020, 2021, 2022 attraverso differenti ondate, caratterizzate dalla comparsa in successione di diverse varianti di SARS-CoV-2, il quale si è costantemente evoluto attraverso mutazioni casuali che ne hanno modificato la trasmissibilità o la virulenza. L’imporsi di una nuova variante dominante a livello di popolazione ha modificato di volta in volta alcuni aspetti legati alle manifestazioni cliniche della malattia COVID-19, alla contagiosità del virus e all’efficacia di alcuni trattamenti e dei vaccini sviluppati per trattare o prevenire l’infezione e lo sviluppo di malattia grave.

Brevemente, le varianti identificate durante la pandemia come “VOC” (“Variant of Concern”) e ora riclassificate come “VBM” (“Variant Being Monitored”) sono state Alpha, Beta, Gamma e Delta, quest’ultima emersa nel Dicembre 2020 in India e diventata globalmente dominante nel Luglio 2021 (19). Attualmente, la variante preponderante è Omicron (B.1.1.529), emersa nel Novembre del 2021 e caratterizzata da maggiore trasmissibilità ma minore virulenza. Essa è associata a sviluppo di manifestazioni cliniche più lievi ma ha dimostrato la capacità di evadere la pregressa immunità umorale, aumentando notevolmente il rischio di reinfezione e diminuendo considerevolmente l’efficacia dei vaccini finora sviluppati (20).

Al 29 Maggio 2022 più di 526 milioni di casi di COVID-19 e 6 milioni di morti sono stati riportati globalmente (21).

SARS-CoV-2 infetta le cellule umane attraverso il legame delle glicoproteine virali spike al recettore ACE-2 (22), espresso prevalentemente ma non unicamente sugli pneumociti di tipo 2 del tratto respiratorio, sede principale delle manifestazioni cliniche legate alla patologia. L'entrata del virus nella cellula richiede il taglio proteolitico delle proteine spike da parte di alcune proteasi espresse dalla cellula ospite, come furina o TMPRSS2 (23).

Il contagio interumano può avvenire tramite inalazione di droplets respiratorie, aerosol rilasciati nell'ambiente attraverso le secrezioni emesse da un individuo infetto o via contatto diretto di superfici contaminate dove il virus rimane stabile fino a 72 ore; considerato il riscontro di SARS-CoV-2 vitale nelle feci, è possibile anche una trasmissione feco-orale (24).

Il periodo di incubazione mediamente riscontrato va da 1 a 14 giorni (più comunemente intorno a 5 giorni) (23).

2.2 QUADRO CLINICO

La malattia COVID-19 si manifesta attraverso un'ampia variabilità di sintomi, che vanno dalla malattia lieve-asintomatica a una forma grave che può condurre al decesso.

Gli individui di ogni età sono suscettibili all'infezione; mentre è molto probabile che i bambini riportino sintomi lievi o siano addirittura asintomatici, nella popolazione generale la patologia si presenta attraverso diverse manifestazioni, come febbre, tosse, astenia, dispnea, anoressia, seguite da espettorato, mialgie, faringodinia, cefalea, dolore toracico. Sono anche stati riferiti sintomi intestinali, come diarrea, nausea, vomito, dolore addominale e disfunzioni del senso del gusto e dell'olfatto (23,25).

La metanalisi condotta da Fu et al., che ha preso in considerazione 43 studi pubblicati tra Gennaio e Febbraio 2020, ha evidenziato che i tre sintomi più comunemente riportati erano febbre (83.3%), tosse (60.3%) e astenia (38.0%), mentre le anomalie laboratoristiche più frequenti risultavano essere l'aumento della PCR, linfopenia e l'aumento di LDH (26).

La malattia può manifestarsi in forma moderata (81%), severa (definita da ipossia che richiede ospedalizzazione con frequenza respiratoria > 30 atti al minuto o SaO₂

< 93%, 14%) – o critica (se è richiesta la ventilazione meccanica, c'è evidenza di Multi-Organ-Failure o di shock, 5%) (27).

La presentazione clinica differisce a seconda dell'età, individui anziani (> 60 anni) con comorbilità sono più prone a sviluppare malattia grave tale da richiedere ospedalizzazione (23): ipertensione, comorbilità cardiovascolari, malattia renale cronica, malattia respiratoria cronica e diabete sono fortemente associate allo sviluppo di malattia severa e outcome sfavorevole a seguito della infezione da parte di SARS-CoV-2 (27,28).

Nello studio di Li et al. i fattori predittivi di sviluppo di malattia severa all'ingresso in ospedale sono risultati essere età > 65 anni (OR 2.2), presenza di ipertensione (OR 2.0), LHD > 445 U/L (OR 4.4) e D-Dimero > 1 mg/L (OR 2.2) (29).

2.3 DIAGNOSI

Poter effettuare una diagnosi precoce è fondamentale per poter contenere la diffusione di SARS-CoV-2, permettendo di individuare – e dunque di isolare – gli individui infetti.

Gli individui aventi una sintomatologia compatibile con COVID-19 e coloro che hanno avuto un elevato rischio di esposizione al virus SARS-CoV2, dovrebbero essere sottoposti al test diagnostico per la ricerca di infezione.

Il gold standard per diagnosticare l'infezione è il test molecolare per la ricerca dell'acido nucleico (NAAT) di SARS-CoV-2 effettuata tramite metodica rRT-PCR (23).

Le migliori fonti su cui performare il test si sono rivelate essere i campioni provenienti dal tratto respiratorio inferiore (30), tuttavia questi sono difficilmente ottenibili nella pratica di routine; viene pertanto raccomandato l'utilizzo di un campione nasofaringeo (31), ma possono essere utilizzati anche campioni nasali o orofaringei.

In alternativa al NAAT, possono essere utilizzati i test antigenici per la ricerca di SARS-CoV-2: pur essendo ugualmente specifici, rispetto ai primi sono meno sensibili; pertanto, dovrebbero essere impiegati nelle fasi iniziali della infezione sintomatica, quando la carica virale è stimata essere più elevata (31).

L'utilizzo della Tomografia Computerizzata (TC) è stato dimostrato essere un valido tool diagnostico nell'inquadramento iniziale dei pazienti aventi una delle seguenti caratteristiche (32): I) pazienti con malattia moderata compatibile con

COVID-19 a rischio di progressione; II) pazienti con sintomi moderati-severi compatibili con COVID-19 indipendentemente dall'esito del tampone; III) pazienti con sintomi severi-moderati in ambiente ad elevata prevalenza di infezione e con risorse per performare i test diagnostici limitate. I reperti più comunemente riscontrati alla TC effettuata su pazienti affetti da polmonite indotta da SARS-CoV-2 sono le opacità bilaterali a vetro smerigliato con distribuzione periferica o posteriore (23).

Infine, il test sierologico per la ricerca di anticorpi anti SARS-CoV-2 può essere utilizzato in modo complementare ai test molecolari per la ricerca del virus, permettendo di individuare quella fetta di popolazione che, dopo essere entrata in contatto con il virus, ha sviluppato una immunità anticorpale diretta contro di esso. È comunque da tenere presente che i test sierologici anticorpali risultano negativi nella fase precoce di infezione poiché la sierconversione richiede in media 5 giorni per le IgM e 14 giorni per le IgG (33).

2.4 COMPLICANZE

Le manifestazioni legate al COVID-19 non riguardano soltanto l'apparato respiratorio, ma possono estendersi a livello sistemico: è ormai noto che COVID-19 è una patologia multi-organo che frequentemente si estrinseca anche a livello extra-polmonare.

A livello fisiopatologico, in coloro che presentano forme di COVID-19 più gravi si riscontrano livelli più elevati di markers infiammatori, come PCR, ferritina, IL-1, IL-6 (29). Ciò suggerisce che le alterazioni tissutali sistemiche possano essere causate dalla risposta infiammatoria e dalla tempesta di citochine che si instaurano nei casi severi di infezione da SARS-CoV-2 (34). Inoltre, visto che il recettore ACE2 è espresso in molti tessuti extrapolmonari, il danno d'organo sistemico potrebbe essere secondario all'azione patogenetica diretta di SARS-CoV-2 (35).

Vengono di seguito schematizzate le più comuni complicanze acute descritte in letteratura (25,35):

- Sistema respiratorio: polmonite interstiziale o alveolare, evoluzione ad *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS). L'età avanzata, la presenza di neutrofilia, l'elevazione di LDH e D-Dimero sono risultati essere i fattori maggiormente legati allo sviluppo di ARDS, condizione associata a un tasso di mortalità che può superare il 40% (36).

- Fegato: anormalità della funzionalità epatica, acute liver injury.
- Rene: *Acute Kidney Injury* (AKI), proteinuria, ematuria, anormalità elettrolitiche, acidosi metabolica.
- Sistema gastro-intestinale: diarrea, nausea, vomito, raramente ischemia mesenterica e sanguinamento gastrointestinale.
- Sistema cardio-vascolare: danno cardiaco acuto, miocarditi, cardiomiopatia, aritmia, scompenso cardiaco, sindrome coronarica acuta, shock cardiogeno.
- Sistema nervoso centrale e periferico: cefalea, vertigini, convulsioni, encefalopatia, ictus, sindrome di Guillain-Barrè.
- Sistema ematopoietico: i soggetti affetti da malattia grave sono ad aumentato rischio di trombosi venosa periferica ed embolia polmonare; inoltre, si possono manifestare eventi ischemici legati alla trombosi arteriosa. La linfopenia si è dimostrata essere un marker di prognosi negativa.
- Sistema endocrino: iperglicemia, chetoacidosi.

Tra i pazienti adulti sintomatici ricoverati per COVID-19 si è evidenziata una prevalenza del 14% di ARDS, del 15% di danno cardiaco acuto e di tromboembolismo venoso, del 6% di AKI e coagulopatia e del 3% di shock (37). Lo sviluppo di danno d'organo acuto, in particolare di danno miocardico e di AKI, è strettamente correlato ad un aumento di mortalità COVID-19-relata, imponendo la necessità di uno stretto monitoraggio della funzionalità d'organo nei pazienti con infezione da SARS-CoV-2 severa (28).

2.5 TERAPIE APPROVATE

I presidi terapeutici che possono essere impiegati nel trattamento della malattia COVID-19 devono essere scelti sulla base della sintomatologia, della gravità clinica della patologia, del setting di cura (extra- vs intra-ospedaliero, *Intensive Care Unit* (ICU)), del rischio di progressione e delle comorbilità presenti, in modo tale che la gestione sia appropriata alla situazione clinica del singolo paziente.

Secondo le stime, circa l'80% dei pazienti che sono affetti da COVID-19 non richiedono ospedalizzazione o intervento medico (38). In questa situazione, il cardine del management consiste nel trattamento sintomatico di supporto a domicilio (utilizzo di antipiretici, analgesici, anti-tussivi), riservando le terapie

specifiche a coloro i quali, pur non richiedendo ospedalizzazione, sono a maggiore rischio di progressione. In questo caso, il PINETREE trial ha dimostrato come la somministrazione di *Remdesivir* – un inibitore della replicazione virale, avente dunque azione antivirale diretta – *e.v.* per 3 giorni consecutivi abbia ridotto il rischio di ospedalizzazione e di morte dell'87% rispetto al placebo (39).

Inoltre, sulla base dei risultati forniti dallo studio MOVE-OUT, trial randomizzato di fase 3, è stato approvato l'uso dell'antivirale *Molnupiravir* nella popolazione di pazienti COVID-19 non ospedalizzati a rischio di progressione verso malattia severa. Questo, se somministrato entro 5 giorni dall'esordio dei sintomi, ha dimostrato ridurre il rischio di morte e di ospedalizzazione nella popolazione di pazienti considerata (40). Tuttavia, il Covid-19 Treatment Guidelines Panel raccomanda l'utilizzo del *Molnupiravir* soltanto nel caso in cui il *Remdesivir* non sia disponibile, considerata la minore efficacia del primo (31).

In accordo con una nota rilasciata dall'AIFA, non è raccomandato l'utilizzo di azitromicina o di altro antibiotico nel management della malattia COVID-19, in quanto non c'è evidenza scientifica che il loro impiego limiti la progressione della malattia o riduca la mortalità (41).

Il fatto che il danno d'organo sistemico che si instaura nella malattia grave sia dovuto alla risposta infiammatoria sistemica e alla tempesta di citochine che si verificano a seguito della infezione da SARS-CoV-2, ha fornito il razionale per testare l'impiego di corticosteroidi nei casi di COVID-19.

Infatti, i glucocorticoidi, pur non agendo direttamente contro il virus, potrebbero mitigare la disfunzione d'organo associata alla infiammazione (42); tuttavia, il loro utilizzo inizialmente ha prodotto risultati controversi tanto da richiedere una critica rivalutazione del loro impiego (43).

Al momento, l'utilizzo di glucocorticoidi sistemici non è raccomandato nel setting extra-ospedaliero o nei pazienti ospedalizzati che non richiedono supporto respiratorio poiché mancano le evidenze che ne comprovino l'efficacia (31).

Essi devono essere invece impiegati da soli o in combinazione al *Remdesivir* nel caso in cui nei pazienti ospedalizzati sia richiesta supplementazione di ossigeno o ventilazione non invasiva (42).

Inoltre, un'arma terapeutica che può essere impiegata in caso di ammissione in terapia intensiva è il *Tocilizumab*, un anticorpo diretto contro il recettore di IL-6. Questo ha dimostrato efficacia nel trattamento di COVID-19 severo attraverso l'attenuazione della tempesta di citochine e la limitazione del danno indotto dall'infiammazione e ha provato di migliorare gli outcome in questa categoria di pazienti, inclusa la sopravvivenza (44).

Infine, deve essere fatto un accenno anche alle possibilità di impiego degli anticorpi monoclonali (mAbs) neutralizzanti diretti contro SARS-CoV-2, proposti in monoterapia o in differenti combinazioni e il cui razionale si basa sui principi della immunizzazione passiva (45). Cinque di questi agenti avevano ricevuto l'autorizzazione all'uso di emergenza (EUA) da parte dell'FDA, sia nel contesto della profilassi sia a scopo terapeutico; tuttavia, la loro efficacia è stata drammaticamente ridimensionata dall'imporsi della variante Omicron, la quale ha dimostrato una ridotta suscettibilità a questi agenti (46).

Attualmente, il COVID-19 Treatment Guidelines Panel non raccomanda l'impiego di alcuno di questi agenti per la profilassi post-esposizione; soltanto il *Bebtelovimab* ha dimostrato conservare efficacia contro Omicron e ha ricevuto l'EUA per il trattamento di COVID-19 lieve-moderato in pazienti non ospedalizzati a rischio di progressione a malattia severa (31).

2.6 LONG-COVID

Se la presentazione clinica della fase acuta di COVID-19 è stata precocemente caratterizzata, ci sono dati ancora limitati sulle sue conseguenze a lungo termine.

Infatti, c'è stata una evidenza crescente del fatto che una proporzione variabile tra il 12 e 50% di coloro che sono guariti da COVID-19, anche aventi manifestato la malattia in forma lieve, continuano a lamentare sintomi persistenti o a svilupparne di nuovi a distanza di settimane dalla risoluzione della infezione (47).

Attualmente, esistono differenti definizioni di "long-COVID Syndrome" (LCS), proposte da diversi enti; secondo il National Institute for Health and Care Excellence, il termine LCS ricomprende: I) "ongoing symptomatic COVID-19", che si applica a sintomi persistenti dopo 4-12 settimane dalla risoluzione della infezione acuta; II) "post COVID-19 syndrome", che si applica a sintomi persistenti >12 settimane (48).

È stato anche coniato il termine PASC (*Post-acute Sequelae of COVID-19*), utilizzabile intercambiabilmente per definire il quadro clinico relativo alle complicanze long-term di COVID-19; nonostante non ci sia ancora consensus su quale sia la finestra temporale più appropriata da considerare, è stato proposto di definire le sequele ‘a lungo termine’ se presenti a > 28 giorni dalla infezione acuta (49).

Le stime più recenti indicano che fino al 13% dei pazienti che guariscono da COVID-19 lamentano sintomi persistenti a 2 mesi dalla infezione, il 4.5% è sintomatico per più di 2 mesi e il 2.6% ha sintomi che persistono per 3 mesi o più (50).

Secondo una review, che ha riassunto i risultati degli studi pubblicati tra Dicembre 2019 e Marzo 2021, i sintomi persistenti più comunemente riportati sono: astenia (28-98%), cefalea (91%), dispnea (13.5-88%), tosse (10-13%), dolore toracico, ansia/depressione e disfunzioni del senso del gusto e dell’olfatto (49) .

Sono state inoltre descritti sintomi e sequele organiche a lungo termine interessanti diversi apparati (49,51), come anomalie polmonari (riduzione della capacità aerobica di esercizio, sviluppo di fibrosi, anomalie radiologiche persistenti tipo ground-glass), ematologiche (stato pro-trombotico), cardiovascolari (palpitazioni, dolore toracico, aritmie, tachicardia, fibrosi miocardica), neuropsichiatriche (‘brain fog’, disautonomia, mialgie, impairment cognitivo, ansia, depressione, insonnia), renali ed endocrine (new-onset o peggioramento del diabete mellito) (Figura 1).

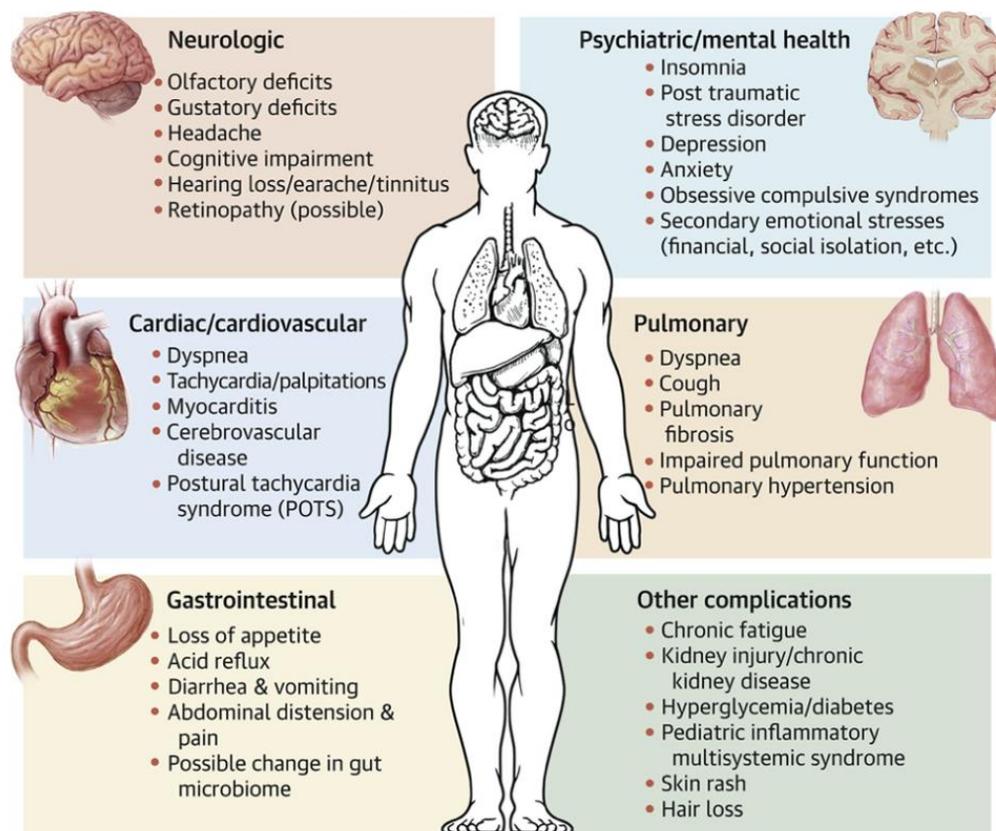


Figura 1: manifestazioni multiorgano di PASC (PostAcute Sequelae of Covid-19). POTS, postural tachycardia syndrome. (Figura tratta da Jiang, D.H. et al. (49)).

Nonostante non sia stato ancora chiarito il preciso meccanismo responsabile della persistenza della sintomatologia, la sua fisiopatologia è probabilmente multifattoriale e sono stati proposti tre differenti fattori che potrebbero contribuire all'instaurarsi della LCS (51): I) persistenza del danno d'organo indotto direttamente dal virus SARS-CoV-2 durante la fase acuta; II) danno infiammatorio e disregolazione immunitaria in risposta all'infezione acuta; III) *post-intensive care syndrome*, in coloro che hanno necessitato di ricovero protratto in ICU.

Per quanto riguarda il ruolo della disfunzione immunitaria nella patogenesi del long-COVID, un recente lavoro del 2022 pubblicato su Cell (52) ha dimostrato che gli stessi fenotipi di cellule immunitarie presenti in acuto nei casi di COVID-19 severo rimanevano preponderanti anche a 28 giorni dall'infezione e risultavano associati allo sviluppo di PASC. Più nel dettaglio, sono stati individuati 4 differenti gruppi di pazienti sulla base della diversa polarizzazione immunitaria delle cellule T; i diversi profili risultavano associati a diversa gravità di malattia acuta e diversa sintomatologia da long-COVID (gastrointestinale vs respiratoria).

Questi risultati sono in linea con le evidenze in letteratura dell'esistenza di almeno due diversi pattern di sintomatologia da long-COVID (50): pertanto, l'analisi del

trascrittoma delle cellule T CD8+ specifiche per SARS-CoV-2 ha fornito un possibile meccanismo patogenetico che possa spiegare lo sviluppo di diversi profili clinici nel contesto del long-COVID.

Sebbene ci sia ancora poca chiarezza circa i fattori predittivi di sviluppo di long-COVID, la severità della malattia acuta, l'età, la presenza di comorbidità, il genere femminile, l'appartenenza a una minoranza etnica e la provenienza da un ambiente rurale hanno dimostrato essere fattori di rischio significativamente associati (49–51). Un fattore risultato collegato allo sviluppo di PASC in tutti i gruppi di età e in entrambi i sessi è l'aver riportato un numero di sintomi maggiore di 5 nella prima settimana di malattia acuta; i cinque sintomi maggiormente predittivi si sono rivelati essere: astenia, cefalea, dispnea, raucedine, mialgie (50).

Nonostante siano ancora troppo scarse le evidenze per dimostrare un link causale tra condizioni preesistenti e long-COVID, deve essere considerato il fatto che i pazienti con multiple comorbidità sono più a rischio di sviluppare malattia COVID-19 severa, condizione che a sua volta aumenta il rischio di sviluppare long-COVID (49).

Vista l'insufficiente conoscenza riguardo ai meccanismi fisiopatologici che predispongono e contribuiscono al long-COVID, le opzioni terapeutiche sono ad oggi limitate.

Innanzitutto, nonostante ci siano dati insufficienti per stabilire il miglior timing per iniziare la valutazione, appare ragionevole iniziare a screenare i pazienti per sintomi e condizioni associate a PASC almeno 4 settimane dopo la guarigione dall'infezione acuta. I cardini del management sono la riabilitazione fisica e polmonare, in modo da migliorare la capacità di esercizio, la qualità di vita e gli outcomes funzionali; il trattamento delle comorbidità preesistenti, per limitare il deterioramento clinico; l'assicurazione di adeguato supporto psicologico in caso di disturbi relativi alla sfera neuropsichiatrica (53).

Appare sempre più evidente la necessità di sviluppare un modello efficiente per la gestione di questi pazienti, considerate la elevata proporzione di popolazione che è o potrà essere interessata dalla condizione e le ripercussioni e l'impatto a livello sociale ed economico.

3. DIABETE E COVID-19

3.1 RUOLO DEL DIABETE NEL RISCHIO DI INFEZIONE E NEL RISCHIO DI COMPLICANZE

Con il progredire della pandemia, si sono raccolte un numero sempre più cospicuo di evidenze che sottolineano la complessità della relazione che sussiste tra COVID-19 e patologia diabetica.

Per evidenziare l'importanza della condizione diabetica in questo contesto, è stato riportato che l'ipertensione e il DM2 siano tra le comorbilità più frequenti nei pazienti affetti da COVID-19 (54).

Tuttavia, nonostante sia stato ampiamente riconosciuto che il diabete sia una condizione di rischio per lo sviluppo di infezioni in generale, i pazienti diabetici non sembrano avere un aumentato rischio di infezione da parte di SARS-CoV-2 rispetto alla popolazione generale (55).

Al contrario, ci sono forti evidenze che indicano il diabete come fattore di rischio per lo sviluppo di malattia severa, necessità di trattamento intensivo in ospedale, ventilazione meccanica e outcome sfavorevole, rilevando maggiore presenza di ARDS, AKI, shock settico e CID (Coagulazione Intravascolare Disseminata) tra i pazienti diabetici rispetto alla popolazione di riferimento (56,57).

Infatti, un ampio studio di coorte inglese ha evidenziato che *l'odds ratio* per la morte in ospedale dei pazienti con infezione da SARS-CoV-2, corretto per i fattori confondenti, era 3.51 per i pazienti DM1 e 2.03 per i pazienti DM2, rispetto agli infetti senza diabete (58).

A livello fisiopatologico, l'associazione diabete – outcome di malattia severa può essere spiegata dal fatto che le disfunzioni d'organo e le complicanze già presenti nel contesto della patologia diabetica possono aggravare il decorso della infezione (57).

Inoltre, la condizione persistente di infiammazione di basso grado che caratterizza il diabete sembrerebbe favorire l'amplificazione del danno d'organo indotto dal virus, promuovendo il rilascio di citochine in risposta alla infezione da SARS-CoV-2 (59). I pazienti diabetici sono così più proni allo sviluppo di una tempesta citochinica, associata al prolungamento del danno polmonare e ad outcome negativo (57).

La risposta infiammatoria all'infezione da SARS-CoV-2 agisce infine in modo sinergico all'infiammazione promossa dal DM2 e dell'obesità, peggiorando l'insulino-resistenza. Quest'ultima, stimolando l'iper-reattività bronchiale, aumenta il rischio di insufficienza respiratoria e collasso cardio-polmonare nei pazienti con diabete e COVID-19 (60).

Nonostante ciò, è bene sottolineare che, qualora si tengano in considerazione le comorbilità frequentemente concomitanti al DM (soprattutto di tipo 2), l'associazione tra diabete preesistente e malattia grave diviene meno significativa: ciò suggerisce che l'impatto sfavorevole che la malattia diabetica ha sull'outcome sia dovuto soprattutto alle condizioni concomitanti (57,61), riconosciute essere fattori di rischio indipendenti per sviluppo di infezione severa.

Al contrario, il diabete di nuovo riscontro e l'iperglicemia all'ingresso in ospedale sono associate in modo più forte ad evoluzione infausta di malattia rispetto alla condizione di diabete preesistente, sottolineando la correlazione stretta che sussiste tra i livelli ematici di glucosio e l'outcome (61). Nonostante le ragioni di questa associazione non siano ancora state completamente chiarite, è dimostrato che l'iperglicemia contribuisce ad alterare la funzionalità immunitaria, compromettendo la risposta alla infezione (62). Tuttavia, il fattore maggiormente implicato nel mediare l'effetto negativo dell'iperglicemia sull'outcome è il peggioramento della funzionalità respiratoria (61), pertanto l'alterazione dei livelli glicemici sembra poter accelerare direttamente il decorso della malattia.

Inoltre, il significato prognostico negativo dell'iperglicemia si è rivelato indipendente dall'uso di glucocorticoidi, di cui si era ipotizzato poter agire da fattore confondente e mediare almeno parte dell'effetto negativo dell'iperglicemia sull'outcome, essendo usati nelle forme più severe di malattia (63).

Dunque, le evidenze sono concordi nell'indicare l'importanza di testare i livelli di glucosio nei pazienti ricoverati per COVID-19 e di ottenere un buon controllo glicemico a breve termine per migliorare la prognosi (59,62).

In aggiunta, considerato il fatto che le comorbilità associate al DM condividono alcuni dei meccanismi fisiopatologici comuni al danno d'organo indotto da SARS-

Queste ultime evidenze sembrano suggerire che il diabete giochi un ruolo preponderante nell'aumentare il rischio di complicanze durante la fase acuta della infezione piuttosto che nell'aumentare il rischio di sviluppare sequele a lungo termine.

3.2 COVID-19 E COMPARSA DI NUOVO DIABETE O PEGGIORAMENTO DEL DIABETE

La relazione esistente tra COVID-19 e diabete si è rivelata essere bidirezionale: non solo questa patologia è un fattore che contribuisce allo sviluppo di malattia COVID-19 severa, ma ci sono evidenze che supportano il fatto che l'infezione da parte di SARS-CoV-2 possa portare allo sviluppo di complicanze acute della malattia diabetica (come l'iperglicemia e la chetoacidosi), di diabete di nuovo riscontro e possa peggiorare la malattia diabetica preesistente (59).

A sostegno dello sviluppo di scompenso metabolico durante la fase acuta di infezione, uno studio condotto su 658 pazienti ospedalizzati con diagnosi di COVID-19 ha riportato che l'infezione da parte di SARS-CoV-2 era associata allo sviluppo di chetosi o chetoacidosi e induceva sviluppo di chetoacidosi diabetica in coloro che avevano diabete preesistente (66).

Inoltre, numerosi studi hanno evidenziato che nei pazienti affetti da COVID-19 è frequente riscontrare iperglicemia (sia in pazienti con che in pazienti senza diagnosi di diabete preesistente) o diabete di nuova diagnosi all'ingresso in ospedale (67) e sono stati riportati casi in cui l'esposizione a SARS-CoV-2 abbia precipitato l'esordio di diabete (68,69). È bene ricordare che, come già ampiamente esposto nel paragrafo precedente, il riscontro di iperglicemia o diabete di nuova diagnosi è fortemente predittivo di outcome di malattia sfavorevole.

Nonostante tutti questi dati, ancora controverse sono le evidenze riguardo alla capacità del virus di causare *per se* diabete (sia tipo 1 sia tipo 2) e riguardo alla causalità dell'associazione COVID-19 –onset di diabete (70).

Infatti, il meccanismo alla base dello sviluppo di iperglicemia e diabete di nuovo riscontro in COVID-19 non è ancora stato definito, così come non è chiaro se SARS-CoV-2 espleti direttamente un effetto diabetogeno.

È ancora dibattuto se le β -cellule pancreatiche esprimano i recettori ACE2 e TMPRSS2 e siano bersaglio di infezione da parte del virus: se ciò fosse vero,

SARS-CoV-2 potrebbe essere quindi direttamente implicato nel causare una disfunzione delle cellule endocrine pancreatiche e portare così a un difetto della secrezione di insulina fino alla comparsa di diabete; tuttavia, manca evidenza definitiva del tropismo di SARS-CoV-2 per le cellule pancreatiche, non c'è riscontro istologico di distruzione delle β -cellule (70) ed esperimenti condotti in vitro hanno fallito nel dimostrare un effetto citopatico sulle cellule pancreatiche virus-indotto (71).

Nonostante ciò, le β -cellule potrebbero anche essere danneggiate e rese disfunzionali indirettamente durante l'infezione, per effetto dell'infiammazione e dell'infiltrato di cellule immunitarie a livello pancreatico (59).

Inoltre, SARS-CoV-2 potrebbe essere direttamente implicato nel causare iperglicemia inducendo una disfunzione del tessuto adiposo: lo studio di Reiterer et al. ha dimostrato la capacità di SARS-CoV-2 di infettare gli adipociti e alterare la secrezione di adipochine coinvolte nella regolazione del metabolismo, inducendo insulino-resistenza e dunque iperglicemia (72).

Tuttavia, bisogna considerare il fatto che l'iperglicemia durante la fase acuta di COVID-19 potrebbe essere anche dovuta ad un diabete misconosciuto o essere indotta ed esacerbata dalla terapia con glucocorticoidi (67).

Inoltre, l'iperglicemia è un frequente riscontro durante molteplici stati acuti critici di malattia e dunque anche in COVID-19 un importante contributo all'instaurarsi di questa alterazione potrebbe essere fornito dalla condizione di stress e infiammazione (*stress-induced hyperglycemia*) che si instaura durante l'infezione acuta (67): in questo caso, l'iperglicemia sarebbe causata da un fattore potenzialmente reversibile, mettendo in dubbio la persistenza della disregolazione glicemica dopo la risoluzione della fase acuta e il rischio di sviluppare diabete permanente.

Indipendentemente dai meccanismi fisiopatologici sottostanti all'iperglicemia nella fase acuta, è necessario infatti analizzare anche quale possa essere l'impatto a lungo termine dell'infezione da parte di SARS-CoV-2 sul metabolismo glicemico dopo che è avvenuta la clearance virale.

A questo proposito, uno studio condotto negli USA su 181.280 soggetti ha evidenziato che coloro che sono guariti da COVID-19 hanno un rischio aumentato di sviluppare diabete (HR 1.40) fino a 12 mesi dopo l'infezione con una probabilità

tanto maggiore quanto più grave è stata la fase acuta di malattia e quanto più alto era il rischio al baseline di diabete; questa patologia dovrebbe essere quindi considerata una componente della sindrome long-COVID (73). Risultati simili sono stati ottenuti dallo studio eseguito da Maestre-Muniz et al., il quale ha riscontrato che l'1% di coloro che erano guariti da COVID-19 ad un anno ha sviluppato diabete e il 10% di coloro che avevano un diabete preesistente ha sperimentato un peggioramento del controllo glicemico (74).

Inoltre, con lo scopo di indagare se l'iperglicemia riscontrata durante la fase acuta di COVID-19 persistesse a lungo termine, lo studio di Montefusco et al. ha riscontrato che, tra coloro che hanno manifestato iperglicemia all'ammissione in ospedale, il 35.1% dei casi ha riportato iperglicemia persistente a sei mesi dalla risoluzione della infezione e l'1.6% diabete manifesto (75).

Al contrario, un'altra analisi italiana ha prodotto risultati a favore di un effetto solo transitorio di SARS-CoV-2 sull'omeostasi del glucosio. In questo ultimo studio, si è riscontrata un'assenza di disregolazione persistente dei livelli glicemici superata la fase acuta dell'infezione, suggerendo che l'iperglicemia in questo contesto potesse essere prevalentemente legata a fattori reversibili, come l'insulino-resistenza indotta dall'infiammazione (76).

Dunque, l'iperglicemia nella fase acuta di COVID-19 si conferma in tutti gli studi associata ad elevati marker infiammatori e predittore di outcome sfavorevole; tuttavia, non essendo ancora chiarito il meccanismo alla base dell'iperglicemia associata a COVID-19, l'effetto dell'infezione da SARS-CoV-2 sulla regolazione glicemica potrebbe essere non duraturo, imponendo cautela nel dichiarare aumentato il rischio di diabete post infezione.

In ogni caso, è necessario che i pazienti che hanno presentato iperglicemia o diabete di nuovo riscontro al momento del ricovero per COVID-19 vengano sottoposti a un follow up long-term per indagare se sviluppino diabete persistente nella fase post acuta.

Oltre ad indagare il contributo patogenetico da parte della infezione da SARS-CoV-2 alla comparsa di diabete, deve anche essere preso in considerazione l'impatto che la riduzione delle prestazioni ambulatoriali durante il lockdown ha avuto sul Sistema Sanitario e, in particolare, sulla gestione dei pazienti diabetici.

È stato infatti stimato che – nel periodo tra Marzo e Dicembre 2020 – nel Regno Unito siano state mancate o ritardate circa 60.000 diagnosi di DM2 per effetto del primo lockdown e si è rilevato un aumento dei tassi di mortalità negli affetti da DM2, soprattutto tra coloro > 65 anni (77).

Il prototipo di paziente che ha maggiormente risentito delle restrizioni applicate ai servizi ambulatoriali corrisponde infatti all'anziano affetto da DM2, non in grado di usufruire della telemedicina e di sottoporsi ai controlli a distanza (78). Questa è anche la tipologia di paziente più fragile, spesso in polifarmacoterapia, che richiederebbe al contrario stretto monitoraggio.

Sono però necessari ulteriori studi per indagare quali saranno le ripercussioni che l'interruzione delle prestazioni assistenziali, il ritardo nelle diagnosi e il minor monitoraggio clinico avranno sullo sviluppo di complicanze croniche associate al diabete.

4. CELLULE STAMINALI CIRCOLANTI

Le cellule staminali circolanti (CSC) sono un gruppo eterogeneo di globuli bianchi del sangue periferico, la cui frazione più rilevante è rappresentata dalla sottopopolazione delle cellule staminali ematopoietiche e delle cellule progenitrici (HSC/HSPC).

Fenotipi minoritari sono le cellule progenitrici endoteliali (EPC) e le cellule staminali mesenchimali (MSC).

Le CSC, una volta rilasciate dal midollo, possono essere misurate nel sangue periferico attraverso l'analisi citofluorimetrica, che si basa sul riconoscimento della espressione di specifici markers antigenici di immaturità, come CD34 e CD133 (79).

Nonostante la rarità di questa popolazione, le CSC hanno dimostrato di svolgere un ruolo chiave nel mantenimento dell'equilibrio dell'organismo, tanto è che una riduzione dei loro livelli sembra essere indicativa di un'alterazione dell'omeostasi sistemica.

Infatti, nell'uomo i livelli di CSC sono ridotti in presenza di fattori di rischio cardiovascolari e malattia cardiovascolare manifesta, come aterosclerosi coronarica, periferica e cerebrovascolare (80). Questa alterazione rappresenta un possibile meccanismo di difetto della capacità di mantenere l'omeostasi vascolare e un fattore di rischio per evento cardiovascolare futuro.

Di seguito verranno analizzate le caratteristiche delle popolazioni cellulari prima citate.

4.1 PRINCIPALI SOTTOTIPI DI CELLULE STAMINALI CIRCOLANTI

4.1.1. Hematopoietic stem cells/progenitor cells (HSCs/HSPCs)

Le cellule staminali ematopoietiche/cellule progenitrici, identificate dalla espressione del marker di immaturità CD34 nella frazione CD45dim, sono la sottopopolazione più consistente delle CSC, rappresentando lo 0.05% dei globuli bianchi e raggiungendo il numero di 3 cellule/uL nel sangue periferico degli individui sani (81).

Esse vengono rilasciate dal midollo osseo secondo un ritmo circadiano finemente regolato dal sistema nervoso autonomo (82), anche se il ricircolo che queste

effettuano tra il midollo osseo stesso e il sangue periferico è solo in parte biologicamente compreso (83).

Al proposito di spiegare il movimento delle HSPC tra sangue e midollo osseo, diverse ipotesi sono state formulate (84–86).

- Il ricircolo delle HSPC ha come obiettivo la ricollocazione delle cellule in nicchie midollari maggiormente favorevoli al fine di ottimizzare l'emopoiesi.
- Le HSPC sono coinvolte nella sorveglianza degli organi extra-midollari, dove originano cellule dell'immunità innata mature e contribuiscono all'immunosorveglianza.
- Sottopopolazioni di cellule progenitrici derivanti dal midollo contribuiscono all'omeostasi dei tessuti periferici, come il mantenimento della capacità endogena riparativa.

Nonostante la loro scarsa rappresentazione nel sangue periferico, la riduzione dei livelli di HSPC è stata associata sviluppo di eventi clinici avversi (87), come verrà successivamente approfondito.

4.1.2. Cellule progenitrici endoteliali (EPC)

Le conoscenze riguardo alle cellule progenitrici endoteliali (EPC), identificate per la prima volta nel 1997 da Asahara come una rara sottopopolazione delle cellule mononucleate del sangue periferico in grado di dare origine a cellule endoteliali e strutture vascolari tubulari sia in vitro sia in vivo (88), si sono molto evolute negli ultimi anni.

Esse rappresentano una quota molto piccola (0.005-0.01%) dei globuli bianchi circolanti e svolgono una funzione rigenerativa essenziale, contribuendo a rinnovare aree danneggiate della tonaca intima dei vasi sanguigni (89).

Attualmente, si pensa che la maggior parte delle EPC derivino o abbiano un fenotipo parzialmente sovrapponibile alle HSPC, con le quali condividono l'espressione di markers emopoietici (90). Esse vengono identificate alla citofluorimetria come cellule esprimenti CD34, CD133 (cluster di differenziazione della linea staminale, espressione di immaturità) e KDR (anche conosciuto come VEGF-R, marcatore di differenziazione endoteliale).

I meccanismi attraverso cui le EPC contribuiscono a promuovere la rigenerazione e a mantenere l'integrità vascolare sono controversi.

Infatti, se in base ai primi studi erano ritenute capaci di integrarsi direttamente nell'endotelio danneggiato (91), è stato invece dimostrato che le EPC promuovono l'angiogenesi e la riparazione endoteliale attraverso un meccanismo indiretto, secernendo molecole con effetto paracrino poichè incapaci di generare esse stesse cellule endoteliali mature (90). Le cellule che sembrerebbero invece poter contribuire direttamente alla neoangiogenesi *in vivo* sono le ECFCs (*endothelial colony forming cells*). Esse costituiscono una rara popolazione che non esprime fenotipo ematopoietico (CD45⁻) e che non si ritiene originare dal midollo osseo, quanto piuttosto o dalle cellule endoteliali circolanti mature o dalle cellule progenitrici associate alla parete vasale (90).

Alla luce della recente rivalutazione critica, le cellule pro-angiogeniche che derivano dal midollo osseo sembrano essere legate alla plasticità del *lineage* dei monociti-macrofagi e appaiono contribuire ai meccanismi di riparazione endoteliale attraverso un'attività indiretta di supporto cellulare (92).

4.2 SIGNIFICATO CLINICO

Nonostante il fatto che le CSC costituiscano una sottopopolazione decisamente minoritaria delle cellule mononucleate del sangue periferico, è dimostrato che un'alterazione del loro numero sia associata ad eventi clinici sfavorevoli e ad aumento di mortalità (87). Ciò può essere spiegato dal fatto che le CSC contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi cardiaca e vascolare (93).

Infatti, queste vengono rilasciate in risposta a differenti stimoli, come l'ischemia, l'esercizio fisico, citochine e chemochine (91), entrano nel sangue periferico e si dirigono verso i tessuti bersaglio, dove favoriscono la riparazione tissutale e vascolare (94).

Una riduzione dei loro livelli, pertanto, può essere rappresentativa di un difetto della capacità endogena riparativa dell'organismo e si verifica in presenza di condizioni di rischio cardiovascolare.

A questo proposito, è universalmente riconosciuto che l'età avanzata di per sé sia un fattore di rischio cardiovascolare. È stato dunque ipotizzato che il livello di CSC sia soggetto a cambiamenti età-correlati, i quali risultano in una compromissione del loro numero e funzionalità: dunque l'alterazione età-dipendente che coinvolge le cellule staminali circolanti potrebbe contribuire alla disregolazione dei

meccanismi di riparazione portando alle manifestazioni patologiche cardiovascolari che si verificano durante l'invecchiamento (85).

Sempre nell'ambito di indagare la relazione che sussiste tra cellule staminali circolanti ed età, nel 2017 è stata scoperta una correlazione tra la lunghezza dei telomeri leucocitari (LTL) e i livelli di CSC (95).

La LTL è considerata un marker di invecchiamento biologico poiché si crede rifletta l'accumulo di danni a livello cellulare nel tempo ed è stata associata a diverse patologie legate all'invecchiamento – come l'aterosclerosi – e a un aumento della mortalità cardiovascolare (96,97). È stato quindi pensato che l'impatto negativo che la riduzione della LTL (rappresentativa del processo di *biological aging*) ha sull'outcome cardiovascolare potesse essere mediato da un difetto della capacità rigenerativa dell'organismo, rispecchiato dalla presenza di ridotti livelli di CSC nel sangue periferico.

Ciò che è stato dimostrato dallo studio condotto è il fatto che telomeri più corti sono associati a diminuiti livelli di CSC, indipendentemente dall'età e dai fattori di rischio CV. Tuttavia, sia la LTL sia i livelli di CSC agiscono come fattori indipendenti e additivi nel predire eventi cardiovascolari avversi: l'invecchiamento biologico accelerato è associato a un numero ridotto di CSC ed entrambi contribuiscono agli outcome cardiovascolari sfavorevoli indipendentemente dagli altri fattori di rischio (95).

Infine, uno studio recente ha evidenziato che, con l'avanzare dell'età, gli individui con molteplici fattori di rischio cardiovascolare vanno incontro a una progressiva riduzione dei livelli di CSC, fatto che non riguarda invece gli individui sani: probabilmente ciò riflette l'esaurimento del potenziale endogeno riparativo che si verifica in conseguenza di una prolungata mobilitazione delle CSC, avvenuta in risposta agli eventi di danno cardiovascolare presenti nella storia di questi pazienti (98).

Infatti, l'esposizione ai diversi fattori di rischio cardiovascolare in giovane età stimola il rilascio di CSC dal midollo osseo in risposta al danno precoce e questo sostenuto pregresso rilascio porta al declino del numero e della funzionalità delle CSC/EPC in età più avanzata (93).

La riduzione del livello di CSC svolge un ruolo chiave nella progressione della malattia aterosclerotica, riflettendo una compromissione della capacità riparativa

vascolare dell'organismo e predisponendo ad eventi avversi futuri; la deplezione delle EPC contribuisce alla patogenesi della macroangiopatia non solo durante gli stadi iniziali di malattia, favorendo la disfunzione endoteliale e quindi la genesi della placca, ma anche nella fase finale di sviluppo delle complicanze, compromettendo la capacità di sviluppare circoli collaterali di compenso (80).

Dal punto di vista della prognosi, l'alterazione dei livelli di CSC è predittiva di outcome cardiovascolare sfavorevole in differenti coorti di pazienti.

Una metanalisi del 2016, che ha riassunto i risultati provenienti da 21 studi prospettici osservazionali, ha precisato il significato prognostico della quantificazione dei livelli di CSC nei pazienti con fattori di rischio cardiovascolari, malattia coronarica o altre comorbilità cardiovascolari (99).

Si è così evidenziato che la riduzione nel numero di CSC è associata ad un rischio maggiore di due volte di evento cardiovascolare futuro e di mortalità per cause cardiovascolari e per tutte le cause.

I fenotipi di CSC più strettamente associati all'outcome sfavorevole sono risultati essere i cluster $CD34^+$ e $CD34^+CD133^+$; associazione più debole hanno rivelato avere le EPC, fatto dovuto probabilmente alla maggiore rarità di questa sottopopolazione, alle difficoltà intrinseche alla loro misurazione laboratoristica (100) e al fatto che le CSC rispecchiano meglio la funzionalità del midollo osseo (87), riconosciuto essere target di danno in diverse condizioni caratterizzate da morte prematura (101).

Sulla base di quanto esposto, la misurazione delle CSC potrebbe fornire informazioni aggiuntive per effettuare una più accurata stratificazione del rischio cardiovascolare nella pratica clinica (102) e il fenotipo $CD34^+$ potrebbe essere il candidato futuro biomarker (99).

In conclusione, una riduzione dei livelli circolanti di CSC è di frequente riscontro in molteplici condizioni caratterizzate da un aumento del rischio cardiovascolare e mortalità precoce; in queste sindromi, la perturbazione del numero delle CSC rappresenta un'alterazione della capacità endogena rigenerativa in risposta al danno e agisce come fattore di rischio di mortalità indipendente (84).

5. CELLULE STAMINALI E DIABETE

Il diabete è uno dei fattori di rischio più strettamente associati alla riduzione dei livelli di CSC (84); infatti, è stato dimostrato che, negli individui con DM2, il livello di HSPC è ridotto del 30-40% rispetto ai controlli sani (103).

Recentemente, ha acquisito sempre maggiore evidenza l'ipotesi che le complicanze associate alla malattia diabetica siano conseguenza non solo del danno d'organo indotto dall'iperglicemia, come tradizionalmente considerato, ma anche di un difetto delle capacità riparative endogene che dovrebbero attivarsi in risposta al danno tissutale (92) e che ciò sia strettamente connesso alla alterazione sia quantitativa sia funzionale delle CSC che si verifica in questa condizione (104).

Ci sono differenti ragioni che potrebbero spiegare perché si assiste a una diminuzione dei livelli di CSC in circolo: I) insufficiente rilascio dal midollo osseo; II) ridotta sopravvivenza nel sangue periferico; III) uscita dal circolo per aumento dell'homing verso i tessuti periferici danneggiati (100).

Nel diabete, la riduzione del numero di CSC nel sangue periferico è da ricondursi al fatto che questa patologia compromette la capacità delle HSCP di essere rilasciate dal midollo osseo e di raggiungere la circolazione periferica (105,106), condizione definita '*stem cell mobilopathy*' (107).

La compromissione del rilascio di HSPC è stata dimostrata avvenire nel diabetico sia a seguito della stimolazione diretta con G-CSF sia in risposta all'ischemia periferica (100,106), stimoli entrambi associati alla mobilitazione delle cellule progenitrici.

La mobilopatia sembra essere connessa al profondo rimaneggiamento strutturale che le nicchie delle cellule staminali ematopoietiche e, più in generale, il midollo osseo *in toto* subiscono nel corso della malattia diabetica (108): istologicamente, si riscontrano a questo livello molteplici alterazioni, come rarefazione della componente microvascolare, distorsione dei sinusoidi, infiltrazione da parte di tessuto adiposo e neuropatia, con disfunzione dei terminali nervosi simpatici (109). Tutte queste alterazioni anatomiche impattano in modo significativo sul ricircolo delle HSPC.

Dal punto di vista più prettamente meccanicistico, il link tra diabete e difetto di mobilitazione delle HSPC risiede nel fatto che l'iperglicemia è responsabile di uno shift dell'ematopoiesi verso la linea mieloide (*diabetes-associated*

myelopoiesis) (110); pertanto, il midollo osseo diabetico si caratterizza per un eccesso di macrofagi M1 a fenotipo pro-infiammatorio, i quali sono coinvolti nell'alterata mobilizzazione delle HSPC attraverso la produzione di Oncostatina M (OSM) (111).

Nello specifico, l'identificazione questo mediatore solubile ha spiegato la relazione tra la *diabetes-associated myelopoiesis* e la *mobilopathy*: infatti, OSM, prodotta dai macrofagi pro-infiammatori, induce la produzione della chemochina CXCL12 da parte delle cellule stromali midollari che, attraverso la interazione CXCL12-CXCR4, recettore espresso a livello delle HSPC, media il segnale di ritenzione di queste ultime a livello del midollo osseo, impedendone la mobilizzazione (Figura 3).

Per concludere, la riduzione delle cellule staminali circolanti che si verifica nel paziente diabetico è ascrivibile a un difetto di mobilizzazione dal midollo osseo in conseguenza del rimodellamento che questo tessuto subisce in un contesto di iperglicemia.

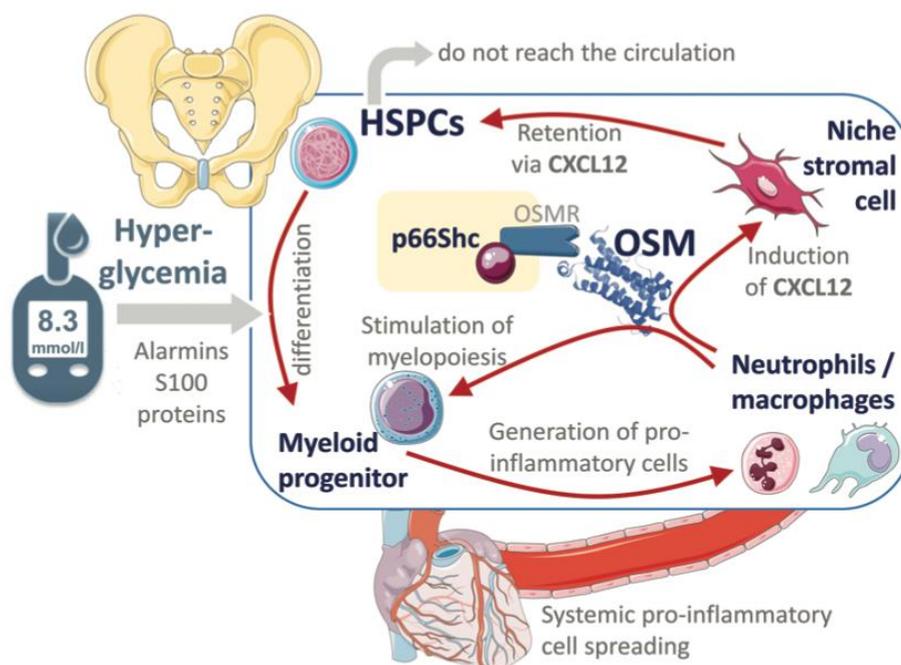


Figura 3: link meccanicistico tra mielopoiesi e mobilopatia nel diabete. HSPC, hematopoietic stem/progenitor cells; OSM, oncostatina M. (Figura tratta da Fadini et al. (112)).

In linea con il ruolo attribuito alle CSC nel mantenimento della omeostasi tissutale in virtù del loro tropismo vascolare, nei pazienti diabetici è stata dimostrata l'associazione tra bassi livelli di HSPC CD34⁺ e comparsa di retinopatia, nefropatia o neuropatia diabetica, oppure di peggioramento delle complicanze microvascolari pre-esistenti, in modo indipendente dai fattori confondenti (113).

Inoltre, i pazienti diabetici con livelli inferiori di HSPC presentano vasculopatia arteriosa periferica di grado più severo, fornendo evidenza a sostegno del ruolo patogenetico della riduzione delle EPC nello sviluppo della macroangiopatia diabetica (114). Dal punto di vista prognostico, infine, i pazienti diabetici con bassi livelli di HSPC hanno un rischio aumentato di due volte di evento cardiovascolare avverso maggiore o ospedalizzazione per cause cardiovascolari rispetto ai diabetici con livelli elevati di HSPC (115).

Pertanto, la riduzione del numero di HSPC nel sangue periferico che si verifica nel paziente diabetico contribuisce allo sviluppo delle complicanze sia micro- sia macrovascolari e alla progressione della malattia (84). Non solo, l'alterazione dei livelli e della funzionalità di queste cellule progenitrici implicate nel mantenimento della omeostasi cardiovascolare potrebbe essere il meccanismo di connessione tra la micro- e la macroangiopatia diabetica.

6. CELLULE STAMINALI E COVID-19

Come è stato ampiamente discusso nel corso dei precedenti paragrafi, il diabete e l'iperglicemia al momento dell'ingresso in ospedale – anche in assenza di diabete preesistente – si sono rivelati essere forti predittori di sviluppo di malattia COVID-19 severa (57).

Partendo dal presupposto che l'iperglicemia causi una riduzione delle HSPC nel sangue periferico e che diminuiti livelli di queste predicano lo sviluppo di complicanze della malattia diabetica, eventi avversi cardiovascolari e morte, è stato proposto che l'iperglicemia nei pazienti affetti da COVID-19 riduca i livelli di HSPC in circolo e che sia questa diminuzione di CSC ad essere responsabile, per lo meno in parte, del significato prognostico negativo che il riscontro di iperglicemia ha sull'outcome di COVID-19.

A sostegno di questa ipotesi, uno studio condotto su 100 pazienti (sia diabetici sia non diabetici) affetti da COVID-19 ha dimostrato come i livelli ematici di glucosio

all'ammissione in ospedale fossero inversamente correlati ai livelli di HSPC e che bassi livelli di HSPC fossero associati a un rischio 3 volte maggiore di outcome sfavorevole di COVID-19 sia a breve sia a lungo termine, in modo indipendente dai fattori confondenti (116).

Pertanto, sulla base dei risultati dell'analisi di mediazione, la riduzione dei livelli di HSPC è risultata essere responsabile dell'effetto prognostico negativo che l'iperglicemia ha sull'outcome di COVID-19 per una percentuale di circa il 28% (Figura 4).

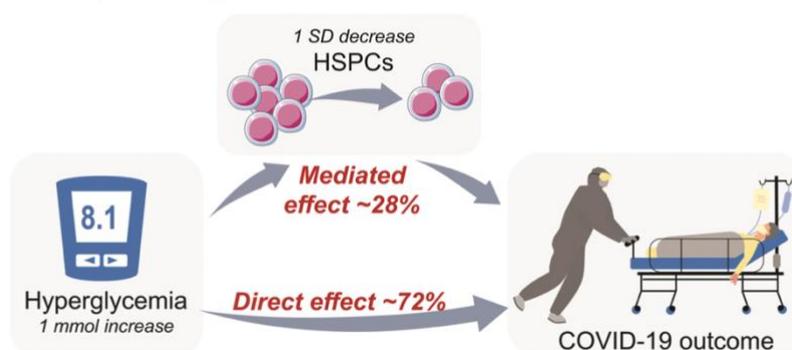


Figura 4: rappresentazione grafica dell'effetto di mediazione di ridotti livelli di HSPCs nei confronti dell'impatto che l'iperglicemia ha sull'outcome di COVID-19. HSPCs, hematopoietic stem/progenitor cells (Figura tratta da Fadini G.P. et al.(116)).

In aggiunta, visto che il riscontro di anomalie ematologiche, linfopenia e aumento del rapporto Neutrofili/Linfociti è frequente nei casi di malattia grave (35), è stato ipotizzato che la malattia COVID-19 possa, nei casi più severi, alterare l'ematopoiesi midollare e causare un'espansione del comparto mieloide a scapito dei progenitori linfoidei (117); l'eccesso di mielopoiesi, caratteristica dunque dei casi di COVID-19 severo, compromette la mobilitazione di HSPC anche in questo contesto (116), in analogia con quanto avviene nell'ambito della *diabetes associated-myelopoiesis* precedentemente discussa.

Infine, è stata avanzata l'ipotesi che la diminuzione del numero di HSPC possa svolgere un ruolo anche nell'insorgenza di long-COVID: infatti, il checkpoint immunitario PD-L1 sembra essere funzionalmente alterato nelle HSPC dei pazienti diabetici e l'iper-espressione di PD-1 è stata associata al long-COVID (118).

Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per confermare l'esistenza di una associazione tra asse PD-1/PDL-1, bassi livelli di HSPC e sviluppo di long-COVID.

SCOPO DELLA TESI

In una coorte di 100 pazienti affetti da COVID-19, è stato riscontrato che i livelli di HSPC erano significativamente più bassi rispetto a controlli sani e che una riduzione di HSPC CD34⁺ di 1 deviazione standard era associata ad un rischio di outcome sfavorevole (definito come necessità di ricovero in terapia intensiva o morte intra-ospedaliera) di 3 volte maggiore, indipendentemente da fattori confondenti; inoltre, bassi livelli di HSPC al momento dell'ospedalizzazione erano associati ad un aumento di mortalità valutata a sei mesi.

Nel presente studio, è stato esteso il follow up della stessa coorte di pazienti a 12 mesi dal momento della ospedalizzazione.

L'obiettivo primario del progetto di tesi è stato valutare la mortalità ad un anno dal ricovero per COVID-19 e determinare se i livelli di HSPC e di glicemia, valutati al momento dell'ospedalizzazione, fossero in grado di predire outcomes sfavorevoli a lungo termine.

Gli obiettivi secondari del presente studio sono stati la valutazione dello sviluppo di sintomi compatibili con "long-COVID Syndrome" e della necessità di avvalersi di risorse sanitarie, come visite e/o accertamenti strumentali, nel corso dei 12 mesi di follow-up.

MATERIALI E METODI

1. Popolazione dello studio

Questo studio prospettico osservazionale è stato condotto in accordo con i principi della dichiarazione di Helsinki e il protocollo è stato approvato dal Comitato etico dell'Azienda Ospedale-Università di Padova. Ciascun paziente ha firmato un consenso informato.

Tra dicembre 2020 e marzo 2021 sono stati arruolati consecutivamente soggetti ricoverati per COVID-19 presso il reparto di Malattie Infettive dell'Azienda Ospedale-Università di Padova

I criteri di inclusione erano: età ≥ 18 anni e infezione da SARS-CoV-2 sintomatica confermata attraverso un test molecolare PCR. Sono stati esclusi dallo studio pazienti con età > 100 anni, patologia epatica o renale severa, neoplasia avanzata, breve aspettativa di vita, stato di gravidanza o allattamento, incapacità di fornire il consenso informato.

Per tutti i pazienti sono state raccolte le seguenti informazioni: età, sesso, anamnesi patologica remota e presenza di comorbidità (diabete, obesità, ipertensione, fumo, malattie cardiovascolari, malattia renale cronica, pregresse neoplasie), anamnesi farmacologica.

Per ciascun paziente inoltre sono state raccolte informazioni in merito a dati laboratoristici al momento del ricovero, radiologici, ai sintomi e al trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2.

Ad ogni paziente è stato effettuato un prelievo ematico al fine di analizzare mediante citofluorimetria le sottopopolazioni di cellule staminali circolanti.

2. Valutazione degli outcomes a lungo termine

Ciascun paziente arruolato nello studio è stato sottoposto a follow up con l'obiettivo di valutare l'insorgenza a 12 mesi dei seguenti outcomes: a) lo stato in vita; b) l'insorgenza di sintomi compatibili con "long-COVID Syndrome"; c) la necessità di dover ricorrere all'impiego di risorse sanitarie.

Al fine di fare questo, è stata condotta una revisione delle cartelle cliniche elettroniche dei pazienti mediante la piattaforma “Galileo”, utilizzata dall’Azienda Ospedale-Università di Padova, e il portale della Sanità Regione Veneto, denominato “SSI6i”.

I sintomi compatibili con long-COVID riscontrati sono stati classificati nelle seguenti categorie:

- Sintomi generali: astenia che interferisce con le attività quotidiane, sintomi che peggiorano dopo sforzo fisico/mentale, febbre.
- Sintomatologia cardiaca o respiratoria: dispnea o mancanza di fiato, tosse, dolore toracico, tachicardia/palpitazioni.
- Sintomi neurologici/psichiatrici: “brain fog”, cefalea, insonnia, vertigini, parestesie, anosmia/ageusia, ansia/depressione.
- Sintomi gastrointestinali: diarrea, dolore addominale, dispesia, perdita di appetito.
- Altri sintomi: artralgie/mialgie, rash, alterazioni del ciclo mestruale.

L’utilizzo di risorse sanitarie è stato definito come come necessità di sottoporsi ad accertamenti strumentali (TC, RX, spirometria) o a visita di controllo pneumologica o infettivologica.

3. Procedure analitiche per la quantificazione delle cellule staminali circolanti

Le cellule HSPC della popolazione in studio sono state identificate e quantificate nel sangue periferico sulla base della espressione di specifici antigeni di superficie marcati con anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi, mediante analisi citofluorimetrica a flusso.

Il citometro a flusso è uno strumento che, attraverso l’integrazione di parametri morfologici e immunologici, permette la valutazione multiparametrica delle caratteristiche antigeniche di singole cellule contenute in una sospensione liquida, tramite l’analisi dei marcatori da queste espressi.

Lo strumento è costituito da quattro elementi:

- un sistema di fluidi, composto da una pompa idraulica, delle taniche di alimentazione e raccolta del liquido di trascinamento e da una cella di analisi;
- un sistema di eccitazione, composto da una sorgente luminosa da cui proviene un fascio laser (ad Argon o a Elio) che attraversa la sospensione liquida che contiene le cellule;
- un sistema ottico, in grado di raccogliere i segnali luminosi e misurarne l'intensità;
- un sistema di analisi computerizzato che permette la digitalizzazione e l'analisi del segnale.

Il campione, preparato in modo da ottenere una soluzione di globuli bianchi marcati con anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi, viene aspirato dal citofluorimetro e presentato alla cella di analisi dello strumento.

Qui avviene l'interazione tra le cellule e i raggi laser provenienti dalla sorgente di eccitazione: quando un fascio luminoso focalizzato incontra una cellula, vengono generati differenti segnali (frutto di fenomeni di rifrazione, riflessione, diffrazione) che rispecchiano le caratteristiche fisiche e morfologiche della cellula stessa.

Quindi, si definiscono:

- il *Forward Scatter* (FSC), segnale luminoso disperso seguendo la direzione del raggio incidente, il quale riflette le dimensioni della cellula;
- il *Side Scatter* (SSC), segnale luminoso raccolto perpendicolarmente rispetto al raggio incidente, il quale rispecchia la complessità intracellulare ed è proporzionale alla granulosità citoplasmatica, al rapporto nucleo/citoplasma e al diametro cellulare.

Questi due parametri vengono combinati assieme al fine di ottenere un diagramma denominato "dot plot", in cui è possibile differenziare le popolazioni cellulari sulla base dei parametri morfologici, come le dimensioni e la complessità intracellulare. Si può quindi selezionare il *gate morfologico* contenente la sottopopolazione cellulare di interesse.

Inoltre, lo strumento allo stesso tempo raccoglie i segnali provenienti anche dall'eccitazione dei fluorocromi coniugati agli anticorpi monoclonali diretti contro gli antigeni cellulari di interesse. I fluorocromi sono infatti molecole che, quando stimolate da una specifica lunghezza d'onda (λ), ne emettono a loro volta una diversa.

Attraverso l'analisi del segnale emesso dai fluorocromi eccitati, è possibile rilevare la presenza di determinati antigeni cellulari e costruire un *gate immunologico*, selezionando le sottopopolazioni cellulari di interesse sulla base della espressione di uno specifico marcatore.

Lo strumento impiegato per condurre questo studio è stato l'analizzatore Beckman Coulter (citofluorimetro NAVIOS EX), con l'obiettivo di registrare 10^6 eventi, e i dati sono stati analizzati impiegando il software Kaluza (Beckman Coulter). Quindi, alla citofluorimetria sono state identificate le diverse sottopopolazioni di HSPC sulla base della espressione dei differenti antigeni.

L'espressione di CD34 con/senza il criterio CD45dim e la co-espressione di CD133 ha permesso di definire la popolazione di HSPC.

Le cellule sono state marcate quindi con i seguenti anticorpi monoclonali: 20 ul di anti-CD34, coniugato al fluorocromo PE (Ficoertina), prodotto da BiosciencesTM; 5 ul di anti-CD133, coniugato al fluorocromo APC (Allofococianina), prodotto da Beckman Coulter;

10 ul di anti-CD45, coniugato al fluorocromo ECD (Electron Coupled Dye), prodotto da Beckman Coulter.

Dopo aver letto il campione al citofluorimetro, esaminando contemporaneamente il *Forward Scatter* (FSC) e il *Side Scatter* (SSC) in un dot plot, è stato possibile costruire un gate morfologico che ci permettesse di riconoscere la popolazione di nostro interesse, ovvero la frazione delle cellule mononucleate.

Successivamente, le cellule totali CD34⁺ sono state quantificate nel plot FSC vs intensità di fluorescenza CD34 per comparabilità con gli studi precedenti e con la letteratura.

Inoltre, l'appartenenza delle cellule CD34⁺ alla popolazione di cellule staminali è stata ulteriormente confermata dalla bassa espressione di CD45, identificando la sottopopolazione di HSPC CD34⁺CD45^{dim}.

Infine, è stato selezionato un *gate* rispettivamente sulle cellule CD34 positive e CD133 positive e, intersecando le cellule separate esprimenti i due marcatori, sono state identificate le cellule CD34⁺CD133⁺.

Dunque, nel sangue periferico sono state quantificate la popolazione totale CD34⁺, CD34⁺CD45dim e CD34⁺CD133⁺.

La conta relativa di cellule è stata espressa come cellule / 10^6 eventi (WBC), mentre la conta assoluta di cellule è stata riportata per ml di sangue. La conta assoluta è stata ottenuta moltiplicando la conta relativa di cellule X WBC (white blood cell count X 10^3 /mL).

4. Analisi statistica

Le variabili continue sono state espresse come media \pm SD e quelle categoriche come percentuali.

Allo scopo di verificare l'obiettivo primario dello studio, i pazienti sono stati divisi in due gruppi sulla base dello stato in vita a 12 mesi. Per confrontare le caratteristiche dei due gruppi, è stato utilizzato il test *t di Student* a due code per campioni indipendenti per le variabili continue, il test χ^2 per campioni indipendenti per le variabili categoriche.

Per valutare quali fossero le variabili rilevate al momento del ricovero che risultassero predittive di mortalità a 12 mesi, è stato utilizzato il modello di regressione di Cox.

Inizialmente si è condotta un'analisi univariata per valutare l'impatto che ciascuna covariata aveva sulla mortalità. Successivamente, è stata sviluppata un'analisi multivariata attraverso dei modelli che tenessero conto delle variabili che all'analisi univariata erano risultate significativamente associate all'endpoint primario, al fine di identificare i fattori associati indipendentemente al rischio di sviluppare l'evento indice. Qualora due variabili collineari fossero entrambe risultate significativamente associate all'outcome all'analisi univariata, nel modello di regressione multivariata è stata inclusa solo una delle variabili. I risultati sono stati espressi come *Hazard Ratio* (HR) ed il rispettivo intervallo di confidenza al 95%. Il livello di significatività è stato settato a $p < 0.05$.

Per quanto riguarda la valutazione degli endpoint secondari, i pazienti sono stati divisi in due gruppi sulla base della presenza/assenza di sintomi da long-COVID durante il follow-up. Al fine di confrontare le caratteristiche tra i due gruppi, per le variabili continue è stato utilizzato il test *t di Student*, per le variabili categoriche è stato impiegato il test *chi-quadrato*. Il livello di significatività è stato impostato a $p < 0.05$.

Per analizzare l'associazione tra le variabili rilevate al momento del ricovero e lo sviluppo di long-COVID è stato realizzato un modello di regressione logistica univariata. I risultati sono stati riportati come *Odds Ratio* (OR) e il rispettivo intervallo di confidenza al 95%.

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati i programmi Microsoft Excel e SPSS versione 24 o superiore in dotazione.

RISULTATI

1. Caratteristiche cliniche della popolazione dello studio

Sono stati arruolati 100 pazienti ricoverati per COVID-19. Le caratteristiche cliniche dei soggetti inclusi nello studio sono riportati nella Tabella I. L'età media era 67.8 anni, il 59% era di sesso maschile e il 75% presentava almeno una comorbidità.

Il 54% dei pazienti era affetto da ipertensione, il 18% da diabete e il 18% da obesità. L'87% ha sviluppato polmonite COVID-relata e, per quanto concerne le terapie somministrate durante il ricovero, il 28% ha richiesto NIV mentre il 21% ha necessitato di ventilazione invasiva; l'87% ha ricevuto glucocorticoidi, un terzo è stato trattato con plasma iperimmune, solo il 2 con Tocilizumab. La quasi totalità dei pazienti è stata somministrata EBPM.

Dei 100 pazienti arruolati, 13 pazienti sono deceduti durante il ricovero, due pazienti sono deceduti entro tre mesi dalla ospedalizzazione pertanto 85 pazienti sono stati valutati per la comparsa o per la persistenza di sequele di COVID-19 a lungo termine.

Tabella I: Caratteristiche cliniche della popolazione in studio

Variabili	Pazienti (n=100)
Demografiche e antropometriche	
Età (anni)	67.8 ± 17.7
Sesso maschile (%)	59
Comorbidità	
Diabete (%)	18
Ipertensione (%)	54
Fumo attivo (%)	4
Obesità (%)	18
CHD (%)	13
Fibrillazione Atriale (%)	12
CKD (%)	13
BPCO (%)	6
Ictus (%)	8
Polmonite COVID-relata (%)	87
Sintomi GI %	11

Variabili	Pazienti (n=100)
Terapie per COVID-19	
Ossigeno a bassi flussi (%)	46
Ossigeno ad alti flussi (%)	43
Ventilazione non invasiva (%)	28
Ventilazione invasiva (%)	21
Remdesivir (%)	43
Glucocorticoidi (%)	87
Tocilizumab (%)	2
EBPM (%)	95
Plasma (%)	35
Farmaci pre-ospedalizzazione	
ACE inibitori (%)	24
ARBs (%)	16
Calcio-antagonisti (%)	19
Beta-bloccanti (%)	21
Anti-aggreganti (%)	23
Statine (%)	27
Warfarin (%)	7
Anticoagulanti orali (%)	8
Insulina (%)	8
Altri ipoglicemizzanti (%)	10
Laboratorio	
FPG, mg/dl	139.1 ± 66.1
HbA1c, mmol/mol	44.4 ± 11.6
Creatinina sierica, umol/l	104.8 ± 122.4
eGFR, ml/min/1.73 mq	76.6 ± 29.1
Proteina C-reattiva, mg/l	93.8 ± 7.7
AST, U/L	40.0 ± 24.6
ALT, U/L	41.1 ± 51.3
LDH, U/L	356 ± 448.7
Outcomes	
Morte/trasferimento in ICU (%)	28
Morte (%)	13
Ricovero in ICU (%)	21
Giorni medi di ospedalizzazione (%)	15.6 ± 12.8

I dati sono presentati come media ± deviazione standard, o percentuali. CHD, coronary heart disease; CKD, chronic kidney disease; BPCO, broncopneumopatia cronica ostruttiva; GI, gastro-intestinali; EBPM, eparina a basso peso molecolare; ARB, Angiotensin receptor blockers; FPG, fasting plasma glucose; eGFR, estimated glomerular filtration rate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; ICU, intensive care unit.

2. Stratificazione della popolazione in base all'outcome a lungo termine (12 mesi)

Al fine di valutare le differenze nella distribuzione di ciascuna variabile analizzata in rapporto al verificarsi dell'outcome primario (morte a un anno), i 100 pazienti arruolati nello studio sono stati divisi sulla base dello stato in vita a 12 mesi (Tabella II). Si sono così ottenuti due gruppi: il primo, formato dai 20 pazienti deceduti nel corso dei 12 mesi di follow-up; il secondo, formato dagli 80 soggetti ancora in vita. Coloro che sono deceduti entro l'anno post ospedalizzazione avevano un'età significativamente più elevata rispetto a coloro che erano ancora vivi (76.5 ± 14.8 vs 65.6 ± 17.8 ; $p=0.013$). Inoltre, presentavano una maggiore prevalenza di malattia coronarica pre-esistente (CHD, 30% vs 8.8%; $p=0.011$) e malattia renale cronica (CKD, 40% vs 6.3%; $p < 0.001$), così come un eGFR al momento del ricovero significativamente inferiore. Al contrario, la prevalenza di altre comorbidità tra cui il diabete differivano in modo statisticamente significativo tra i due gruppi. Infine, coloro che hanno avuto un'evoluzione sfavorevole avevano livelli maggiormente elevati di Proteina C-reattiva e avevano richiesto più frequentemente supplementazione di ossigeno sia a bassi sia ad alti flussi.

Tabella II. Caratteristiche cliniche dei soggetti divisi in due gruppi in base al verificarsi dell'outcome primario (morte a un anno)

Variabile	Outcome primario SI (n=20)	Outcome primario NO (n=80)	p
Età (anni)	76.5 ± 14.8	65.6 ± 17.8	0.013
Sesso maschile, n (%)	55	60	0.884
Diabete, n (%)	30	15	0.118
Ipertensione (%)	70	50	0.108
Fumo (%)	5	3.8	1.000
Obesità (%)	25	16.3	0.362
CHD (%)	30	8.8	0.011
Fibrillazione Atriale (%)	20	10	0.251
CKD (%)	40	6.3	<0.001
BPCO (%)	10	5	0.597
Ictus (%)	15	6.3	0.196
Polmonite COVID (%)	95	85	0.456
Sintomi GI, %	10	11.3	1.000

Variabile	Outcome primario SI (n=20)	Outcome primario NO (n=80)	p
Ossigeno a bassi flussi (%)	25	51.3	0.035
Ossigeno ad alti flussi /NIV	75	35	<0.001
Remdesevir (%)	30	46.3	0.189
Glucocorticoidi (%)	90	86.3	1.000
Tocilizumab (%)	5	1.3	0.362
EBPM (%)	100	93.8	0.580
Plasma (%)	20	38.8	0.189
HbA1c, mmol/mol	49.8 ± 17.0	42.9 ± 9.4	0.104
eGFR, ml/min/1.73 mq	54.8 ± 30.5	82.1 ± 26.2	<0.001
Proteina C-reattiva, mg/l	151.1 ± 89.9	79.8 ± 66.1	0.003
AST, U/L	52.2 ± 38.6	37.3 ± 18.9	0.108
ALT, U/L	50.1 ± 73.5	37.3 ± 18.5	0.386

I dati sono presentati come media ± deviazione standard, o percentuali. CHD, coronary heart disease; CKD, chronic kidney disease; BPCO, broncopneumopatia cronica ostruttiva; GI, gastro-intestinali; EBPM: eparina a basso peso molecolare; FPG, fasting plasma glucose; eGFR, estimated glomerular filtration rate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

I livelli di glicemia plasmatica al momento del ricovero erano significativamente più alti in coloro che risultavano morti al follow-up rispetto ai soggetti ancora in vita (Figura 5).

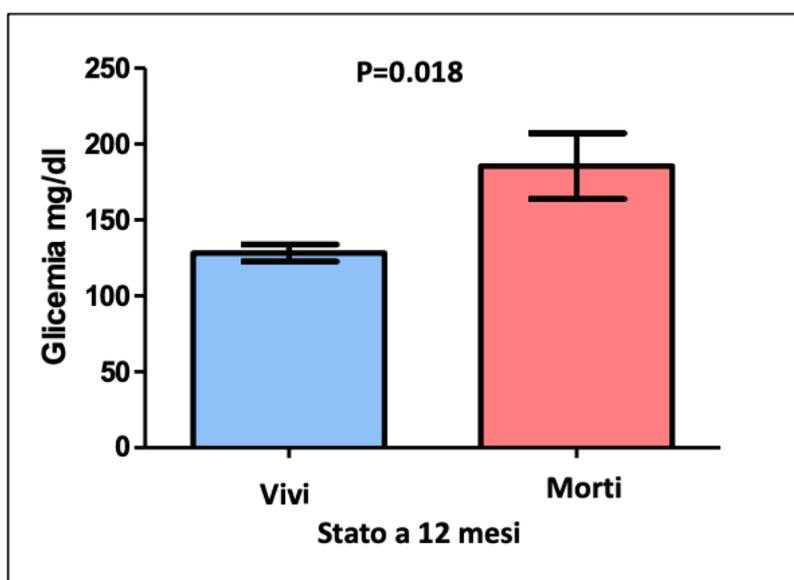


Figura 5: Livelli di glicemia plasmatica al momento del ricovero e stato in vita a 12 mesi.

Per quanto riguarda i fenotipi di HSPC, le cellule $CD34^+$ erano significativamente più basse in coloro che erano morti rispetto a coloro che erano vivi a un anno (99.35 ± 71.05 vs 174.17 ± 114.40 ; $p=0.006$, Figura 6). Un risultato simile si è osservato per gli altri fenotipi di HSPC, $CD34^+CD45^{dim}$ (68.73 ± 59.84 vs 133.16 ± 104.55 ; $p=0.001$, Figura 7) e $CD34^+CD133^+$ (26.47 ± 24.47 vs 69.00 ± 68.77 ; $p<0.001$, Figura 8).

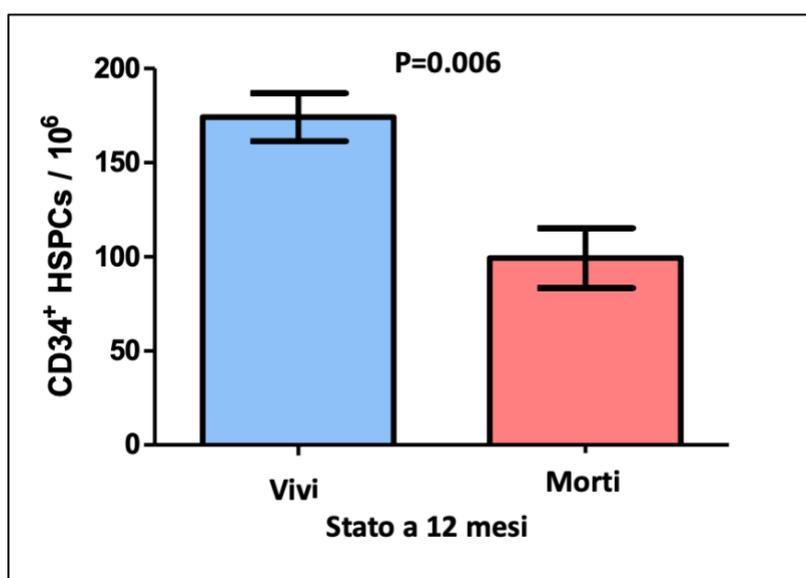


Figura 6: Confronto tra i livelli di HSPC circolanti $CD34^+$ nel gruppo di pazienti vivi a 12 mesi dall'ospedalizzazione (colonna blu) e nel gruppo di pazienti morti (colonna rossa).

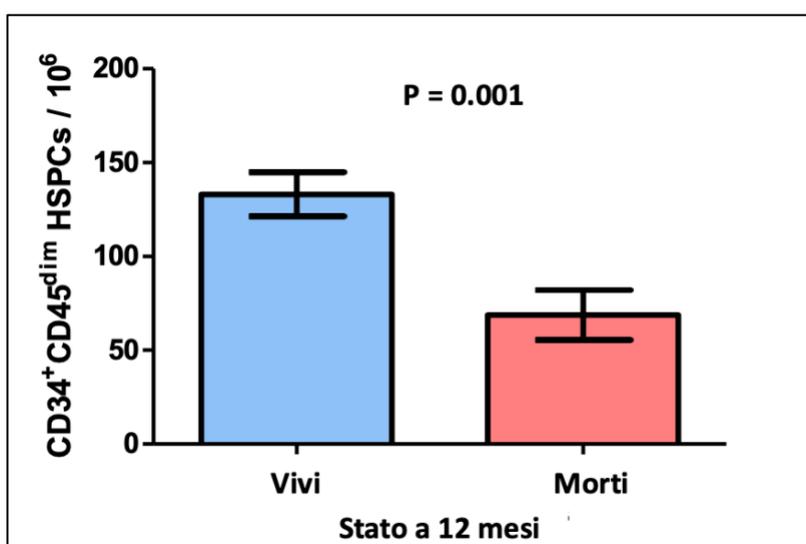


Figura 7: Confronto tra i livelli di HSPC circolanti $CD34^+ CD45^{dim} CD34^+$ nel gruppo di pazienti vivi a 12 mesi dall'ospedalizzazione (colonna blu) e nel gruppo di pazienti morti (colonna rossa).

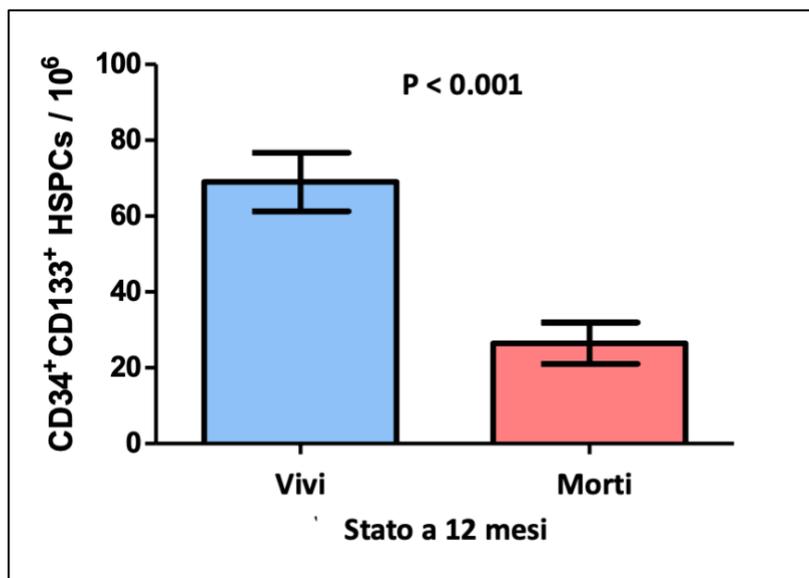


Figura 8: Confronto tra i livelli di HSPC circolanti CD34⁺ CD133⁺ nel gruppo di pazienti vivi a 12 mesi dall'ospedalizzazione (colonna blu) e nel gruppo di pazienti morti (colonna rossa).

3. Fattori predittivi di outcome sfavorevole a lungo termine (12 mesi)

A 12 mesi dal momento dell'ospedalizzazione, 20 pazienti sono deceduti.

È stata effettuata un'analisi di regressione univariata di Cox per valutare quale tra le variabili valutate al momento della ospedalizzazione fosse maggiormente predittiva dell'endpoint primario dello studio, ovvero la mortalità a 12 mesi (Tabella III).

La presenza di cardiopatia ischemica (HR: 3.63; IC 95% 1.39-9.47; p=0.009), malattia renale cronica (HR: 6.22; IC 95% 2.51-15.37; p<0.001) e la necessità di supplementazione di ossigeno ad alti flussi/ventilazione non invasiva (HR: 4.70; IC 95% 1.71-12.97; p=0.003) sono risultate associate in modo significativo a un aumento del rischio di morte a un anno.

Inoltre, anche l'età, i livelli di glicemia, proteina-C reattiva e AST, si sono rivelati fattori predittivi significativi di outcome avverso a 12 mesi.

Al contrario, nel presente studio la presenza di comorbilità al momento della ospedalizzazione quali ipertensione, diabete e obesità, non si è rivelata associata in modo significativo ad un aumento della probabilità di outcome sfavorevole a lungo termine.

Per quanto riguarda l'impatto dei livelli delle sottopopolazioni di cellule staminali circolanti sull'outcome a un anno, all'analisi univariata tutti e tre i fenotipi CD34⁺, CD34⁺CD45^{dim}, CD34⁺CD133⁺, hanno dimostrato predire in modo significativo la mortalità a 12 mesi (rispettivamente p= 0.008; p=0.013; p=0.012). In particolare, la riduzione di una deviazione standard (DS) dei livelli di CD34⁺ è risultata associata ad un aumento della probabilità di morte a 12 mesi di quasi 3 volte (p=0.008).

Tabella III: Fattori predittivi di mortalità a 12 mesi

Variabili	HR	95% CI	p
Età (anni)	1.04	1.01 - 1.07	0.013
Sesso maschile (%)	0.83	0.35 - 2.01	0.683
Diabete (%)	2.16	0.83 - 5.62	0.115
Ipertensione (%)	2.12	0.81 - 5.52	0.124
Obesità (%)	1.51	0.55 - 4.16	0.424
CHD	3.63	1.39 - 9.47	0.009
Fibrillazione atriale (%)	2.10	0.70 - 6.29	0.184
CKD	6.22	2.51 - 15.37	<0.001
BPCO	1.89	0.44 - 8.09	0.399
Ictus	2.22	0.65 - 7.57	0.204
Ossigeno a bassi flussi	0.35	0.13 - 0.96	0.042
Ossigeno ad alti flussi/NIV	4.70	1.71 - 12.95	0.003
FPG	1.01	1.01 - 1.02	<0.001
HbA1c	1.03	1.01 - 1.06	0.015
eGFR	0.97	0.96 - 0.99	<0.001
Proteina C-reattiva	1.01	1.00 - 1.01	<0.001
AST	1.01	1.01 - 1.04	0.002
ALT	1.01	1.00 - 1.02	0.063
CD34 ⁺	2.76	1.31 - 5.85	0.008
CD34 ⁺ CD45 ^{dim}	2.86	1.25 - 6.54	0.013
CD34 ⁺ CD133 ⁺	4.98	1.43 - 17.24	0.012

CHD, coronary heart disease; CKD, chronic kidney disease; BPCO, broncopneumopatia cronica ostruttiva; FPG, fasting plasma glucose; eGFR, estimated glomerular filtration rate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

4. Fattori predittivi indipendenti di outcome sfavorevole a lungo termine (12 mesi)

È stata costruita un'analisi di regressione multivariata di Cox per verificare l'impatto dei livelli delle sottopopolazioni di HSPC sulla mortalità a 12 mesi dopo aver corretto per fattori potenzialmente confondenti. Nel modello sono state inserite le variabili che all'analisi univariata erano risultate significativamente associate all'outcome sfavorevole (età, comorbidità renale e cardiovascolare, necessità di ossigeno supplementare, glucosio plasmatico a digiuno, proteina C-reattiva e AST). Qualora due variabili collineari fossero risultate entrambe avere valore predittivo significativo all'analisi univariata, solo una tra esse è stata inclusa nel modello (Tabella IV).

Sono stati realizzati tre modelli al fine di valutare singolarmente il valore predittivo di ciascuna delle tre sottopopolazioni di cellule staminali circolanti ($CD34^+$; $CD34^+CD45^{dim}$; $CD34^+CD133^+$).

Il fenotipo $CD34^+$ è rimasto associato ad un aumento della probabilità di outcome sfavorevole in modo statisticamente significativo ($p=0.042$): per ogni diminuzione di 1 deviazione standard di questa sottopopolazione, si osservava un incremento di 2.6 volte della probabilità di morte a 12 mesi, in modo indipendente dai fattori confondenti ($p=0.042$); similmente si è ottenuto considerando la sottopopolazione $CD34^+CD45^{dim}$ (HR: 2.99; IC 95% 1.09-8.26; $p=0.034$).

Al contrario, nella analisi effettuata tenendo conto degli stessi fattori confondenti, il valore predittivo di evoluzione sfavorevole della popolazione $CD34^+CD133^+$, il fenotipo numericamente inferiore tra le HSPC, è risultato non più significativo ($p=0.105$).

Alla luce dei risultati dell'analisi multivariata, il livello di glucosio plasmatico a digiuno (FPG) si è confermato un predittore significativo di mortalità a 12 mesi in tutti i modelli.

Tabella IV: Fattori predittivi indipendenti di mortalità a 12 mesi**Modello 1**

Variabile	HR	95% CI	p
Età	1.07	1.04 - 1.11	0.001
CHD	0.10	0.01 - 0.75	0.025
CKD	30.35	4.86 - 189.31	<0.001
Ossigeno ad alti flussi /NIV	10.56	2.30 - 48.49	0.002
FPG	1.01	1.00 - 1.02	0.006
PCR	1.00	1.00 - 1.01	0.093
AST	1.05	1.03 - 1.07	<0.001
CD34 ⁺	2.60	1.03 - 6.54	0.042

Modello 2

Variabile	HR	95% CI	p
Età	1.07	1.03 - 1.11	0.001
CHD	0.08	0.01 - 0.57	0.012
CKD	34.15	5.34 - 218.33	<0.001
Ossigeno ad alti flussi /NIV	10.48	2.37 - 46.42	0.002
FPG	1.01	1.00 - 1.02	0.003
PCR	1.01	1.00 - 1.01	0.053
AST	1.05	1.03 - 1.07	<0.001
CD34 ⁺ CD45 ^{dim}	2.99	1.09 - 8.26	0.034

Modello 3

Variabile	HR	95% CI	p
Età	1.06	1.02 - 1.10	0.002
CHD	0.09	0.01 - 0.69	0.020
CKD	25.50	4.34 - 149.68	<0.001
Ossigeno ad alti flussi /NIV	8.79	2.06 - 37.61	0.003
FPG	1.01	1.00 - 1.02	0.006
PCR	1.01	1.00 - 1.01	0.092
AST	1.05	1.02 - 1.07	<0.001
CD34 ⁺ CD133 ⁺	3.62	0.76 - 17.24	0.105

5. Valutazione dello sviluppo di sindrome long-COVID

Uno degli endpoints secondari del presente studio è stato valutare la comparsa o la persistenza di sintomi compatibili con un quadro di “long-COVID Syndrome”. Degli 85 pazienti sui quali questo outcome è stato valutato, 36 hanno riportato sintomatologia da long-COVID nei 12 mesi post ospedalizzazione (Figura 9).

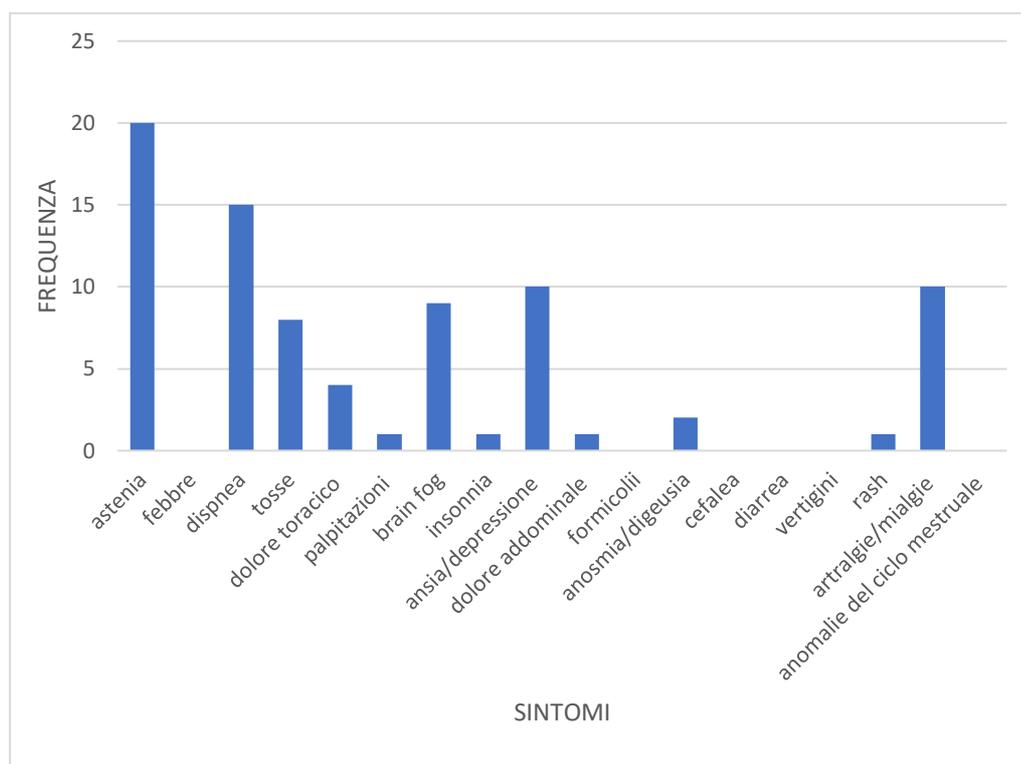


Figura 9: Distribuzione dei sintomi long-COVID nella popolazione in studio.

Tra coloro che hanno lamentato sintomatologia persistente, l’astenia è stato il sintomo più frequentemente dichiarato (20 pazienti, 55,6%) e 15 pazienti hanno riportato dispnea (41,7%).

I singoli sintomi riscontrati sono stati raggruppati in 5 classi: “sintomi generali”, “sintomatologia cardiaca e respiratoria”, “sintomi neurologici”, “sintomi gastrointestinali”, “altri sintomi” (Figura 10).

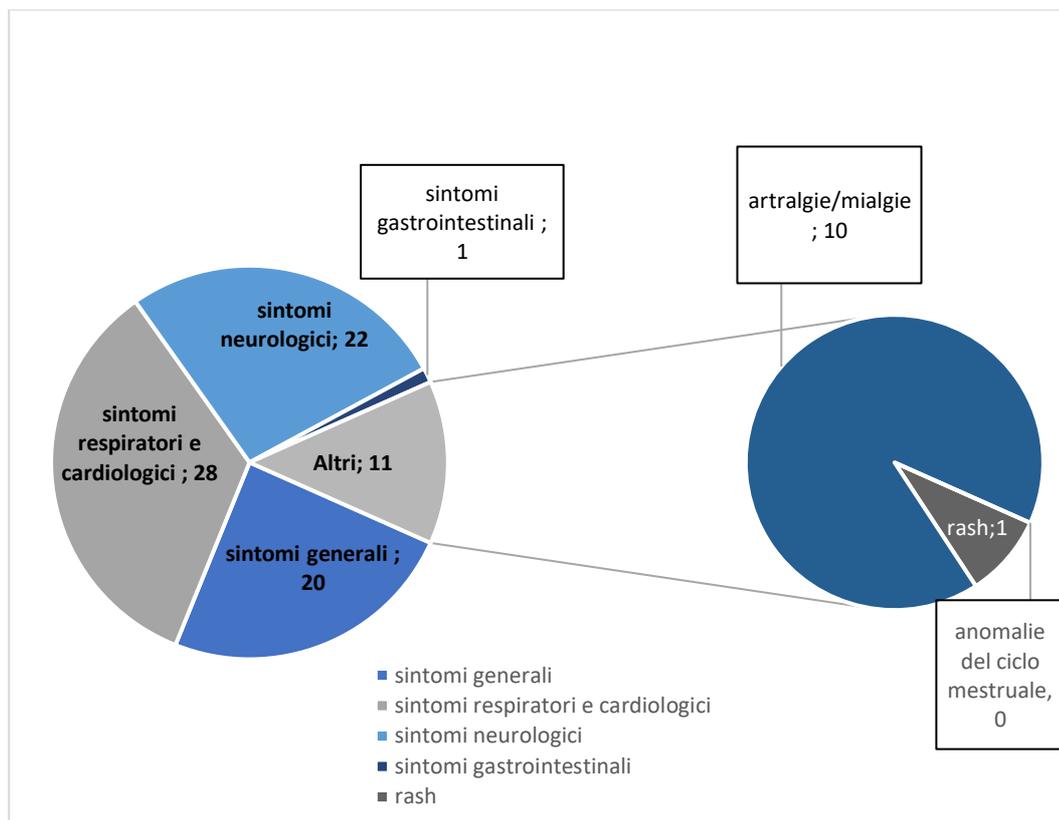


Figura 10: Distribuzione delle frequenze assolute dei sintomi long-COVID nella popolazione in studio, raggruppati in 5 classi.

La maggior parte dei sintomi riscontrati appartenevano al gruppo “sintomatologia cardiaca o respiratoria”; tra questi, oltre alla dispnea precedentemente citata, il dolore toracico è stato lamentato da 4 (11.1%) pazienti sintomatici e la tosse da 8 (22.2%), mentre un solo paziente (2.8%) ha riportato tachicardia persistente.

I sintomi raggruppati come “sintomi neurologici” sono stati la seconda classe più frequentemente riportata (22 volte); tra questi, più frequentemente si è riscontrata ansia/depressione, seguita da “brain fog” (9 pazienti, 25%), anosmia/disgeusia (2 pazienti, 5.6%) e insonnia (1 paziente, 2.8%) mentre i “sintomi generali” sono stati riferiti per 20 volte (astenia, lamentata da 20 soggetti). Solo un paziente (2.8%) ha riportato sintomi gastrointestinali.

Sintomi appartenenti alla categoria “altri sintomi” sono stati riportati 11 volte, nella quale ha predominato il riscontro di artralgie/mialgie e 1 paziente ha lamentato rash. Nella coorte di pazienti considerata, nessuno ha riportato febbre, cefalea, vertigini, formicolii, diarrea o alterazioni del ciclo mestruale.

6. Fattori predittivi dello sviluppo di long-COVID syndrome

Per analizzare le differenze tra le variabili rilevate al momento dell'ospedalizzazione in rapporto allo sviluppo di long-COVID, gli 85 pazienti valutati a questo proposito sono stati divisi sulla base della presenza di sintomi compatibili con long-COVID. Si sono così ottenuti due gruppi: il primo, composto dai 36 pazienti che durante il follow up hanno manifestato sintomi da long-COVID; il secondo, formato dai rimanenti 49 pazienti che non hanno lamentato sintomatologia persistente. Il confronto tra i due gruppi è riportato nella Tabella V. Coloro che hanno lamentato sintomi da long-COVID erano significativamente più giovani (68.5 ± 19.2 vs 61.3 ± 13.8 , $p=0.049$), avevano sviluppato polmonite da COVID-19 più frequentemente rispetto a coloro che non hanno sviluppato sequele a lungo termine (97% vs 76%; $p=0.006$), erano stati più frequentemente trattati con glucocorticoidi (97% vs 78%; $p=0.011$) e avevano ricevuto per una proporzione maggiore plasma iperimmune (56% vs 24%; $p=0.006$).

Al contrario, la prevalenza di comorbidità al momento del ricovero (come diabete, obesità, ipertensione) non è risultata differire in modo statisticamente significativo tra i due gruppi.

Allo stesso modo, i livelli di esami laboratoristici valutati al momento del ricovero non hanno dimostrato differenze significative tra i due gruppi, compresa la glicemia.

Non sono state riportate differenze statisticamente significative nemmeno tra i livelli di HSPC, qualunque fosse il fenotipo della sottopopolazione considerata, tra il gruppo dei pazienti che ha sviluppato long-COVID e coloro che non hanno avuto sequele a lungo termine.

Tabella V: Caratteristiche cliniche dei soggetti divisi in due gruppi in base alla presenza di Long COVID Syndrome

Variabili	Long COVID sì n=36	Long COVID no n=49	p
Età (anni)	61.3 ± 13.8	68.5 ± 19.2	0.049
Sesso maschile (%)	69	55	0.260
Diabete (%)	11	16	0.547
Ipertensione (%)	47	53	0.663
Fumo attivo (%)	8	10	0.634
Obesità (%)	14	20	0.568

Variabili	Long COVID sì n=36	Long COVID no n=49	p
CHD (%)	6	10	0.694
Fibrillazione Atriale (%)	0	18	0.009
CKD (%)	6	8	1.000
BPCO (%)	3	8	0.390
Ictus (%)	8	6	0.695
Polmonite COVID-relata (%)	97	76	0.006
Sintomi GI (%)	14	8	0.485
Ossigeno a bassi flussi (%)	50	49	1.000
Ossigeno ad alti flussi (%)	42	35	0.651
Ventilazione invasiva (%)	33	27	0.631
Remdesevir (%)	53	41	0.378
Glucocorticoidi (%)	97	78	0.011
Tocilizumab (%)	3	0	0.424
EBPM (%)	100	90	0.070
Plasma (%)	56	24	0.006
ACE inibitori (%)	25	22	0.081
ARBs (%)	19	14	0.565
Calcio-antagonisti (%)	11	22	0.251
Beta-bloccanti (%)	19	14	0.565
Calcio-antagonisti (%)	22	18	0.785
Statine (%)	22	22	1.000
Warfarin (%)	0	10	0.070
Anticoagulanti orali (%)	0	8	0.134
Insulina (%)	3	6	0.634
Altri ipoglicemizzanti (%)	6	12	0.457
FPG, mg/dl	124.9 ± 33.1	129 ± 57.7	0.682
HbA1c, mmol/mol	42.1 ± 6.5	43.5 ± 10.9	0.535
Creatinina sierica, umol/l	110.1 ± 171.0	83.2 ± 33.9	0.358
eGFR, ml/min/1.73 mq	86.3 ± 27.7	79.1 ± 24.3	0.206
Proteina C-reattiva, mg/l	83.5 ± 70.7	82.9 ± 67.2	0.970
AST, U/L	35.9 ± 14.4	38.0 ± 21.1	0.598
ALT, U/L	36.6 ± 26.1	33.5 ± 34.3	0.650
LDH, U/L	295.4 ± 89.0	292.3 ± 94.0	0.882
Ricovero in ICU (%)	19	16	0.777
Giorni medi di ospedalizzazione (%)	15.6 ± 15.4	15.9 ± 10.7	0.920
CD34+	166.1 ± 18.8	172.6 ± 16.4	0.796
CD34+CD45dim	130.6 ± 17.3	129.3 ± 14.8	0.955
CD34+CD133+	66.0 ± 9.8	66.9 ± 10.6	0.954

I dati sono presentati come media ± deviazione standard, o percentuali. CHD, coronary heart disease; CKD, chronic kidney disease; BPCO, broncopneumopatia cronica ostruttiva; GI, gastro-intestinali; EBPM, eparina a basso peso molecolare; ARB, Angiotensin receptor blockers; GLM, glucose-lowering medication; FPG, fasting plasma glucose; eGFR, estimated glomerular filtration rate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; ICU, intensive care unit.

È stata quindi effettuata un'analisi logistica di regressione univariata per valutare l'associazione tra le variabili precedentemente considerate e lo sviluppo di long-COVID (Tabella VI).

In modo coerente con la precedente analisi, gli *odds ratio* per insorgenza di long-COVID relativi a pregressa polmonite COVID-19 relata ($p=0.023$), all'uso di glucocorticoidi ($p=0.031$) e alla somministrazione di plasma ($p=0.004$) sono risultati statisticamente significativi. In particolare, lo sviluppo di polmonite COVID-relata è risultato associato a un rischio maggiore di più di 11 volte di sviluppo di long-COVID.

Al contrario, nel presente studio il genere, la presenza di diabete e di ipertensione, la glicemia a digiuno e la durata dell'ospedalizzazione non si sono dimostrati significativamente associati a sviluppo di long-COVID.

Tabella VI: Fattori predittivi di long-COVID syndrome

Variabile	OR	95% CI	p
Età (anni)	0.98	0.95 - 1.00	0.064
Sesso maschile, n (%)	1.85	0.75 - 4.58	0.182
Diabete, n (%)	0.64	0.18 - 2.32	0.497
Ipertensione (%)	0.79	0.33 - 1.87	0.595
Fumo (%)	0.87	0.26 - 2.90	0.815
Obesità (%)	0.63	0.19 - 2.03	0.438
CHD (%)	0.52	0.58 - 2.83	0.448
CKD (%)	0.66	0.11 - 3.83	0.645
BPCO (%)	0.32	0.03 - 3.00	0.320
Ictus (%)	1.39	0.26 - 7.34	0.695
Polmonite COVID (%)	11.35	1.40 - 91.93	0.023
Sintomi GI (%)	1.82	0.45 - 7.30	0.402
Ossigeno a bassi flussi (%)	1.04	0.44 - 2.46	0.926
Ossigeno ad alti flussi (%)	1.35	0.55 - 3.26	0.513
Ventilazione invasiva (%)	1.39	0.54 - 3.54	0.497
Remdesevir (%)	1.62	0.68 - 3.86	0.275
Glucocorticoidi (%)	10.13	1.24 - 82.57	0.031
Plasma (%)	3.85	1.53 - 9.72	0.004
FPG, mg/dl	1.00	0.99 - 1.01	0.701
HbA1c, mmol/mol	0.98	0.94 - 1.04	0.534
Creatinina sierica, umol/l	1.00	1.00 - 1.01	0.348
eGFR, ml/min/.173 mq	1.01	0.99 - 1.03	0.207
Proteina C-reattiva, mg/l	1.00	0.99 - 1.01	0.970
AST, U/L	0.99	0.97 - 1.02	0.594
ALT, U/L	1.00	0.99 - 1.02	0.648
LDH, U/L	1.00	1.00 - 1.01	0.880

Variabile	OR	95% CI	p
CD34⁺/DS	0.94	0.61 - 1.46	0.793
CD34⁺CD45^{dim}/DS	1.01	0.66 - 1.56	0.955
CD34⁺CD133⁺/DS	0.99	0.64 - 1.52	0.954
Giorni di ospedalizzazione (%)	1.00	0.97 - 1.03	0.918

CHD, coronary heart disease; CKD, chronic kidney disease; BPCO, broncopneumopatia cronica ostruttiva; GI, gastro-intestinali; FPG, fasting plasma glucose; eGFR, estimated glomerular filtration rate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase.

7. Utilizzo di risorse e long-COVID

Nel corso dei 12 mesi di follow up, i pazienti arruolati nello studio sono stati complessivamente sottoposti a 38 TC, 20 RX e 50 spirometrie. Inoltre, sono state erogate 64 visite infettivologiche e 71 visite pneumologiche.

Coloro i quali hanno sviluppato sintomi da long-COVID hanno maggiormente subito accertamenti strumentali rispetto agli appartenenti al gruppo che non ha manifestato sequele post fase acuta (83.3% vs 24.5%; $p=0.001$) e, parimenti, sono stati per una proporzione maggiore sottoposti a visite pneumologiche o infettivologiche (83.3% vs 26.5%; $p<0.001$).

DISCUSSIONE

Dall'elaborazione dei dati raccolti per il presente studio, il diabete o gli elevati livelli di glucosio plasmatico a digiuno (FPG) non si sono dimostrati significativamente associati allo sviluppo di segni e sintomi compatibili con long-COVID a 12 mesi dal momento dell'ospedalizzazione.

Inoltre, è stato confermato che ridotti livelli di cellule staminali circolanti al momento del ricovero per COVID-19 sono in grado di predire un outcome sfavorevole a lungo termine, per quanto riguarda la sopravvivenza, in modo indipendente da fattori confondenti.

Questi risultati si inseriscono in una linea di ricerca che si è prefissata l'obiettivo di indagare quale relazione sussista tra il decorso della malattia COVID-19 nelle sue diverse fasi (acuta; post-acuta; long-COVID), la disregolazione del metabolismo glucidico nelle sue differenti declinazioni (iperglicemia; diabete di nuovo riscontro; diabete pre-esistente) e l'alterazione dei livelli di cellule staminali circolanti.

Lo studio oggetto del presente progetto di tesi ha esteso a 12 mesi il follow-up di una coorte di pazienti considerata in un'analisi precedente, la quale ha prodotto evidenze a supporto della nozione che una diminuzione dei livelli di HSPC, sia associata a un rischio aumentato di ammissione in terapia intensiva e mortalità intra-ospedaliera. Partendo dal presupposto che l'iperglicemia si associa a una riduzione dei livelli di HSPC, questa diminuzione potrebbe essere responsabile di parte dell'effetto negativo – ben conosciuto in letteratura – che l'iperglicemia stessa ha sull'evoluzione a breve termine di COVID-19. Inoltre, nella stessa analisi, ridotti livelli di HSPC al momento dell'ospedalizzazione sono risultati associati alla mortalità per COVID-19 valutata a sei mesi (116).

I dati prodotti nell'ambito della presente analisi avvalorano l'esistenza di una stretta associazione tra cellule staminali circolanti ed evoluzione sfavorevole di COVID-19 e confermano il valore predittivo negativo indipendente della riduzione della popolazione HSPC nei riguardi dell'outcome di COVID-19 anche a lungo termine. Inoltre, i risultati del presente studio confermano il valore prognostico negativo che il riscontro di iperglicemia al momento dell'ingresso in ospedale ha nei confronti dell'outcome di COVID-19, non solo short- ma anche long-term, in modo

indipendente da fattori confondenti. Lo stesso significato predittivo non è invece attribuibile al diabete pre-esistente, in linea con i risultati in letteratura che hanno dimostrato che l'iperglicemia è più strettamente associata all'outcome sfavorevole di COVID-19 rispetto a quanto lo sia il diabete pre-esistente (61).

In merito allo sviluppo di long-COVID, il presente studio si contestualizza in un quadro di evidenze contrastanti riguardanti l'associazione tra diabete e lo sviluppo di sequele di COVID-19 a lungo termine.

I dati ottenuti dalla presente analisi avvalorano le conclusioni di diversi studi che, indagando specificamente la relazione tra diabete e lo sviluppo di long-COVID, non hanno riportato un'associazione significativa (64,65).

Tuttavia, in letteratura è stato ipotizzato che la condizione di infiammazione cronica e di disregolazione immuno-metabolica che caratterizza il diabete possa essere un substrato fisiopatologico plausibile non solo per lo sviluppo di COVID-19 severo ma anche per l'instaurarsi di PASC (47) e la malattia diabetica è stata recentemente riconosciuta in uno studio come fattore biologico precocemente valutabile per identificare la suscettibilità allo sviluppo di LCS (52).

Inoltre, a dimostrazione della complessità del rapporto esistente tra diabete e COVID-19, non solo è stato ipotizzato che il primo sia un fattore di rischio per lo sviluppo di LCS, ma, specularmente, è stato proposto che la patologia diabetica stessa possa manifestarsi nello spettro delle complicanze di COVID-19 a lungo termine e quindi rientrare nel quadro di long-COVID (73). Nonostante l'alterazione dei livelli glicemici sia di frequente riscontro nel quadro di malattia acuta e il suo significato prognostico negativo sia stato ampiamente confermato in letteratura (57,67) e anche nel contesto della presente analisi, i dati finora disponibili circa il rischio di sviluppare diabete permanente nella fase post-acuta di infezione non sono però ancora univoci. Relativamente a ciò, un recente lavoro italiano ha prodotto risultati a supporto del fatto che le alterazioni glicemiche rilevate durante COVID-19 non permangano dopo la risoluzione dell'infezione acuta ma siano per la maggior parte transitorie, ridimensionando dunque il rischio che la disregolazione glicemica associata all'infezione da SARS-CoV-2 evolva in diabete permanente. Per giustificare la reversibilità dell'iperglicemia superata la fase acuta di COVID-19, è stato ipotizzato che fattori transitori, come lo stato infiammatorio che si genera contestualmente all'infezione acuta, possano rivestire un ruolo determinante

nell'alterare i livelli plasmatici di glucosio e che pertanto, una volta risolto lo stato di malattia acuta, essi ritornino ai valori pre-infezione (76).

Da quanto emerge dalla presente analisi, gli unici fattori significativamente associati allo sviluppo di long-COVID sono risultati essere lo sviluppo di polmonite COVID-relata, ovvero un quadro di malattia caratterizzato da impegno polmonare significativo, e alcune terapie somministrate nel corso dell'ospedalizzazione, nello specifico l'impiego di glucocorticoidi e di plasma iperimmune. Queste variabili riflettono tutte una condizione di malattia acuta grave: ciò permette di individuare in coloro che hanno sviluppato un quadro acuto di COVID-19 severo la popolazione maggiormente a rischio di sviluppare sequele permanenti a lungo termine, relazione già evidenziata in molteplici analisi in letteratura (49,51). Dunque, la disfunzione immuno-infiammatoria e le alterazioni multi-organo che caratterizzano la malattia acuta COVID-19 grave possono costituire un substrato plausibile per la persistenza e/o lo sviluppo di manifestazioni patologiche durature nel tempo.

La non concordanza dei risultati provenienti dagli studi che hanno cercato di individuare i fattori predittivi di sviluppo di long-COVID risiede *in primis* nella mancanza di una definizione univocamente condivisa del termine stesso "long-COVID" (119). Inoltre, la prevalenza di coloro che devono convivere con long-COVID è incerta, così come non c'è accordo su quale sia il *cut-off* temporale più appropriato dall'infezione acuta per iniziare a considerare un sintomo come indicativo di long-COVID (120). Tra i lavori presenti in letteratura non c'è concordanza nella metodologia impiegata per raccogliere le informazioni, nella stratificazione dei pazienti e nella terminologia utilizzata per definire i sintomi, spesso vaghi e aspecifici. Dunque, gli studi finora condotti mancano di standardizzazione, risultando poco comparabili tra loro e si sono caratterizzati per un follow-up limitato nel tempo (120). Tutte queste criticità, assieme alla mancanza di chiarezza nei riguardi della fisiopatologia della sindrome long-COVID e del ruolo rivestito dalla disregolazione metabolica in questo contesto, potrebbero rendere ragione almeno in parte dell'eterogeneità dei risultati che si sono ottenuti nei diversi studi che hanno indagato quale rapporto sussista tra diabete e long-COVID.

Inoltre, bisogna sottolineare il fatto che nei pazienti diabetici possa risultare difficile distinguere tra lo sviluppo di una sintomatologia indicativa di long-COVID e la comparsa o l'aggravamento delle complicanze croniche della malattia diabetica,

visto che molteplici manifestazioni cliniche possono essere riconducibili a entrambe le condizioni. Ciò assume rilevanza soprattutto alla luce dell'ipotesi che l'infezione stessa da parte di SARS-CoV-2 possa favorire in questa popolazione un peggioramento del quadro clinico, considerato come COVID-19 e patologia diabetica sembrino influenzare vicendevolmente i rispettivi decorsi e il parallelismo che è stato spesso effettuato tra la fisiopatologia di queste due malattie (57).

Al contrario dell'associazione tra COVID-19 e malattia diabetica, caratterizzata dall'essere oggetto di molteplici lavori e di altrettante incertezze, il valore prognostico attribuito ai livelli di cellule staminali circolanti in relazione all'outcome di COVID-19 sia a breve sia a lungo termine è stato soltanto marginalmente esplorato nella letteratura, ma il suo valore è stato definito e confermato dalla presente analisi. Ciò si inserisce in un filone di ricerca che presta sempre maggiore attenzione al significato predittivo assunto dalle HSPC circolanti in differenti quadri clinici sia acuti sia cronici. Esse, infatti, non solo risultano ridotte in tutte quelle condizioni caratterizzate da un aumentato rischio cardiovascolare (93) e nella patologia diabetica in particolare (84), ma hanno dimostrato essere anche fattori predittivi indipendenti, qualora diminuite, di eventi cardiovascolari futuri e di mortalità per tutte le cause in diverse coorti di pazienti caratterizzati da comorbidità croniche (99). Inoltre, nel contesto di un evento acuto – quale infarto miocardico, ictus o ischemia periferica – le cellule staminali circolanti vengono reclutate in periferia, dove contribuiscono a favorire la riparazione del tessuto ischemico: un'efficace mobilitazione si è dimostrata associata alla capacità di recupero del tessuto soggetto a danno (93).

I risultati del presente studio sostengono dunque l'ipotesi secondo cui le HSPC possano rappresentare un fattore importante nel mantenimento dell'omeostasi sistemica e che una loro riduzione possa essere associata allo sviluppo di sequele avverse e aumentare la mortalità (87).

Inoltre, vale la pena precisare che nell'analisi multivariata si è raggiunta la significatività statistica per i fenotipi di HSPC $CD34^+$ e $CD34^+CD45^{dim}$ ma non per la sottopopolazione $CD34^+CD133^+$, la quale è meno rappresentata nel sangue periferico. Il fatto di non aver raggiunto la significatività per quest'ultimo fenotipo è attribuibile in parte anche a una questione metodologica: le popolazioni cellulari più rare si caratterizzano infatti per un'intrinseca maggiore incertezza di

misurazione e, considerato che il coefficiente di variazione aumenta al diminuire della numerosità assoluta delle cellule, la maggiore variabilità rende ragione in parte del riscontro di un'associazione non significativa.

Questi risultati sono consistenti con le evidenze che identificano nel fenotipo CD34⁺ la sottopopolazione maggiormente in grado di predire la mortalità, essendo quella maggiormente rappresentata (87).

L'aver rilevato una forte associazione tra ridotti livelli di HSPC e outcome di COVID-19 anche a lungo termine impone di fare alcune considerazioni al fine di interpretare tale valore predittivo.

In primis, la diminuzione delle HSPC può riflettere l'instaurazione di una risposta maladattativa da parte del sistema ematopoietico; i casi severi di COVID-19 sono caratterizzati da molteplici anomalie ematologiche (117) e ciò potrebbe rappresentare una situazione di disregolazione dell'ematopoiesi, che può portare al fallimento della capacità di rispondere in modo appropriato all'infezione. È ancora oggetto di studio se la disfunzione di questo comparto sia dovuta ad un effetto diretto da parte di SARS-CoV-2 o sia favorita in modo indiretto dall'iper-secrezione di citochine, reperto caratteristico dei casi gravi di malattia e a sua volta alimentato dall'alterata risposta immunitaria, instaurando un circolo vizioso (121). In ogni caso, è probabile che l'anomala risposta immuno-infiammatoria contribuisca all'evoluzione sfavorevole di COVID-19.

Inoltre, ridotti livelli di HSPC possono essere considerati segno di uno *skewing* dell'ematopoiesi verso la linea mieloide: infatti, l'eccesso di mielopoiesi compromette la mobilitazione delle HSPC dal midollo osseo e ne riduce i livelli circolanti (116). La disregolazione dell'ematopoiesi, l'eccesso di progenitori mieloidi e un aumento del rapporto Neutrofili/Linfociti sono stati associati a COVID-19 severo (117) e la riduzione di cellule staminali circolanti potrebbe non solo esserne un epifenomeno ma anche essere il link tra queste alterazioni e l'aumento di mortalità.

Per terzo, è possibile che la riduzione dei livelli di HSPC rappresenti un difetto della capacità endogena riparativa da parte del pool di cellule staminali. Il forte legame tra HSPC e outcome sfavorevole si basa infatti anche sul ruolo attribuito al ricircolo che le cellule staminali compiono tra il midollo osseo e sangue periferico: attraverso questo si pensa che le HSPC ottimizzino l'ematopoiesi, contribuiscano alla modulazione dell'immuno-infiammazione e mantengano l'omeostasi dei tessuti

periferici, venendo ivi reclutate in risposta a un danno e favorendo la riparazione tissutale e vascolare (84).

La riduzione dei livelli di HSPC può dunque compromettere i meccanismi endogeni di risposta al danno tissutale, predisponendo così allo sviluppo di eventi avversi e all'aumento della mortalità legata a COVID-19 anche a lungo termine.

Infine, un'altra possibilità da considerare quando si indaga il link tra cellule staminali e outcome di COVID-19 è il fatto che il virus SARS-CoV-2 sia in grado di infettare le cellule staminali ematopoietiche e causarne direttamente una disfunzione e/o morte. Ciò potrebbe contribuire alle anomalie ematologiche rilevabili nel sangue periferico dei pazienti COVID-19 e compromettere la capacità del sistema ematopoietico di riconoscere e rispondere in modo adeguato all'infezione.

Possiamo dunque concludere, sulla base delle attuali conoscenze, che bassi livelli di cellule staminali circolanti siano dei validi indicatori di evoluzione sfavorevole di malattia COVID-19 sia a breve sia a lungo termine.

È possibile che questa associazione sia dovuta a una combinazione di meccanismi indiretti, essendo le cellule staminali circolanti diminuite in quelle condizioni di alterazione ematopoietica che compromettono la risposta immuno-infiammatoria nei confronti di SARS-CoV-2 e favoriscono un esito di malattia infausto, e di meccanismi diretti, visto che la loro riduzione può essere interpretata come un difetto della capacità endogena riparativa e di mantenimento dell'omeostasi d'organo.

Per quanto riguarda i limiti del presente lavoro di tesi, bisogna innanzitutto sottolineare che la numerosità campionaria dello studio è stata relativamente piccola. Infatti, sono stati originariamente arruolati 100 pazienti e 85 sono stati valutati per l'insorgenza di sintomi compatibili con long-COVID. Ciò può avere influito sul livello di significatività emerso dall'analisi statistica dei dati relativi ai fattori predittivi di long-COVID, non permettendoci di evidenziare alcune associazioni che sarebbero potute emergere come rilevanti considerando un campione più ampio.

Un altro fattore limitante della presente analisi è rappresentato dalla mancanza di una valutazione standardizzata di quello che viene definito come "long-COVID". Infatti, i soggetti sono stati considerati come affetti da sequele a lungo termine di

COVID-19 sulla base delle informazioni reperibili nelle cartelle cliniche elettroniche e dei referti delle visite pneumologiche e infettivologiche eseguite a partire dal termine del ricovero per COVID-19.

Tuttavia, durante il periodo dello studio, “long-COVID” ha rappresentato una diagnosi nuova e la sua definizione si è continuamente evoluta. Ancora al momento attuale non ci sono criteri diagnostici universalmente condivisi per definire il long-COVID. Attualmente si è propensi a considerare come affetti da long-COVID coloro che lamentano la persistenza o lo sviluppo di sintomi compatibili a partire da 4 settimane dopo l’infezione acuta da SARS-CoV-2: è fondamentale utilizzare una terminologia condivisa poiché ciò è alla base della definizione dei dati clinici necessari al riconoscimento e al monitoraggio di questa condizione (119).

Inoltre, al fine di rendere il presente studio comparabile con quelli presenti in letteratura, gli strumenti diagnostici utilizzati per rilevare la sintomatologia riconducibile al quadro di long-COVID dovrebbero essere resi omogenei. Per esempio, bisognerebbe impiegare scale standardizzate per la valutazione dei sintomi al fine di rendere le diagnosi più oggettivabili e comparabili (119).

Infine, un ulteriore limite dello studio può essere individuato nella mancanza di una maggiore caratterizzazione delle cellule staminali. Esse, infatti, sono state valutate soltanto da un punto di vista quantitativo, misurandone i livelli nel sangue periferico mediante analisi citofluorimetrica, mentre non sono state caratterizzate da un punto di vista del fenotipo: non è stato preso in considerazione quale fosse il livello di maturità delle HSPC circolanti o se fossero *committed* verso la linea linfoide o mieloide. Inoltre, mancano informazioni anche relativamente alla caratterizzazione funzionale delle HSPC: è stata tralasciata la valutazione della loro capacità differenziativa e di rigenerazione dei tessuti periferici, così come non è stato indagato se funzionalmente presentassero un’attività pro- o anti-infiammatoria.

Per quanto concerne invece i punti di forza del presente studio, bisogna innanzitutto sottolineare come esso rappresenti un elemento di originalità all’interno della ricerca scientifica rivolta a caratterizzare il ruolo fisiopatologico delle cellule staminali circolanti. Infatti, è già presente una cospicua letteratura rivolta alla comprensione del valore patogenetico e prognostico che l’alterazione delle HSPC riveste in differenti contesti clinici sia acuti sia cronici, spesso accumulati da un aumentato rischio cardiovascolare (93,95,99,113). Tuttavia, l’aver indagato quale

possa essere l'impatto di ridotti livelli di cellule staminali circolanti in una condizione complessa e multidimensionale come quella della malattia COVID-19 rappresenta un'assoluta novità, che pone le basi per ampliare le conoscenze sul significato biologico di questa popolazione cellulare. Inoltre, nonostante la maggior parte della produzione scientifica degli ultimi due anni sia stata incentrata sulla malattia COVID-19, in questo contesto poco è ancora compreso riguardo alla fisiopatologia delle alterazioni del sistema ematopoietico, che con sempre maggiore evidenza sembrano rendersi responsabili dell'evoluzione verso un esito infausto.

Il presente studio è il primo ad avere indagato il valore predittivo a lungo termine della riduzione delle cellule staminali circolanti nel contesto di COVID-19 e offre la possibilità di individuare nella loro alterazione il *trait d'union* tra disregolazione ematopoietica e outcome sfavorevole di COVID-19.

In aggiunta, un ulteriore pregio dello studio è stata la durata del follow-up: i pazienti arruolati sono stati seguiti per 12 mesi dal momento dell'ospedalizzazione, permettendoci di individuare quali fattori valutabili al momento del ricovero conservassero un impatto significativo sull'evoluzione sfavorevole di malattia anche a lungo termine o risultassero maggiormente associati al rischio di lamentare una sintomatologia persistente nel tempo. L'aver esteso il follow-up dello studio a un anno ha permesso inoltre di valutare l'insorgenza di manifestazioni compatibili con long-COVID anche a distanza dall'episodio acuto e di individuare i sintomi più proni alla cronicizzazione. Il lungo follow-up che ha caratterizzato il presente lavoro ha il vantaggio, infine, di avere offerto la possibilità, non permessa dagli studi che hanno seguito i pazienti per un periodo relativamente breve, di valutare quale siano il decorso di COVID-19 a lungo termine e i fattori che ne possono maggiormente condizionare l'evoluzione, ponendo le basi per una migliore caratterizzazione del quadro clinico.

Le prospettive future del presente lavoro sono in primo luogo rappresentate dall'ampliamento della popolazione in oggetto: in questo modo si potrebbe effettuare una valida inferenza statistica sulla popolazione affetta da long-COVID e superare la non significatività di alcune relazioni, considerato che alcune analisi del presente studio sono risultate sottopotenziare ai fini di dimostrare un'associazione significativa.

Inoltre, potrebbe essere interessante non solo raccogliere le informazioni relative allo sviluppo di long-COVID attraverso la revisione delle cartelle cliniche elettroniche dei pazienti, ma anche effettuare interviste telefoniche ai soggetti reclutati al fine di avere una testimonianza diretta, limitando il rischio che alcuni sintomi vengano sottostimati poiché non riportati all'attenzione medica e raccogliendo così un'anamnesi più completa.

Un'ulteriore opportunità di sviluppo del presente studio può essere la valutazione non solo dell'aspetto quantitativo, ma anche qualitativo – ovvero funzionale e fenotipico – delle cellule staminali circolanti: ciò permetterebbe di ottenere una migliore comprensione sia riguardo a quali siano le alterazioni della funzionalità delle HSPC che avvengono nel contesto di COVID-19, sia riguardo ai meccanismi attraverso cui le HSPC disfunzionali contribuiscono all'evoluzione verso esito infausto di COVID-19.

Da ultimo, il prolungamento del follow-up per un tempo superiore a 12 mesi consentirebbe di approfondire il significato prognostico delle cellule staminali circolanti nel contesto della condizione di COVID-19. Inoltre, estendere il follow-up permetterebbe di monitorare l'evoluzione dei sintomi indicativi di long-COVID, di individuare quali siano le alterazioni più a rischio di non andare incontro a risoluzione e consentirebbe di dare impulso ad ulteriori avanzamenti nella comprensione della complessa fisiopatologia che caratterizza il quadro clinico di long-COVID.

CONCLUSIONI

In conclusione, nonostante una numerosità campionaria relativamente limitata e la mancanza di una valutazione standardizzata della condizione di long-COVID, il presente progetto di tesi ha fornito evidenze a supporto del fatto che il diabete pre-esistente e il riscontro di iperglicemia al momento dell'ospedalizzazione non si associno in maniera significativa allo sviluppo di segni e sintomi indicativi di long-COVID.

Inoltre, anche se è stata eseguita una caratterizzazione relativamente non esaustiva delle alterazioni delle cellule staminali circolanti, il presente lavoro costituisce un buon punto di partenza per la definizione del valore prognostico che le cellule staminali circolanti hanno in relazione all'evoluzione di COVID-19.

È stato infatti confermato che la diminuzione dei livelli di questa popolazione cellulare si associa a un aumento di probabilità di outcome sfavorevole di malattia COVID-19 anche a lungo termine.

Il presente studio apporta pertanto un valido contributo al miglioramento della comprensione della multiforme e complessa relazione esistente tra disregolazione metabolica e malattia COVID-19, nel corso della sua evoluzione nel tempo.

Inoltre, il presente progetto di tesi avvalorava l'ipotesi che le cellule staminali circolanti siano un forte predittore di sopravvivenza: questa relazione sembra essere valida non solo quando si considerano le molteplici patologie croniche, accumulate da un aumentato rischio cardiovascolare, nel contesto delle quali questa popolazione cellulare è stata tradizionalmente studiata, ma anche in una condizione che nasce infettiva acuta come è COVID-19.

Ciò potrebbe costituire la base per approfondire i meccanismi attraverso i quali l'alterazione delle cellule staminali circolanti sia in grado di favorire la mortalità precoce. In aggiunta, le evidenze che emergono dal presente lavoro possono fornire ulteriore stimolo alla comprensione del perché il difetto della rara popolazione di *HSPC* appaia così strettamente connesso a quadri fisiopatologici che si caratterizzano per una compromissione dell'omeostasi sistemica.

BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*. 2022;45(Suppl 1):S17–38.
2. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2019 Nov 1;157.
3. Lin X, Xu Y, Pan X, Xu J, Ding Y, Sun X, et al. Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. *Scientific Reports*. 2020 Dec 1;10(1).
4. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. Vol. 126, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2016. p. 12–22.
5. McIntyre HD, Catalano P, Zhang C, Desoye G, Mathiesen ER, Damm P. Gestational diabetes mellitus. Vol. 5, *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group; 2019.
6. Dhatariya KK, Glaser NS, Codner E, Umpierrez GE. Diabetic ketoacidosis. Vol. 6, *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Research; 2020.
7. Stoner GD. Hyperosmolar Hyperglycemic State. *Am Fam Physician*. 2017 Dec 1;96(11):729–36.
8. Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes [Internet]. Vol. 26, *Clinical Diabetes* •. 2008. Available from: <http://clinical.diabetesjournals.org>
9. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Vol. 107, *Circulation Research*. 2010. p. 1058–70.
10. Antonetti DA, Silva PS, Stitt AW. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. Vol. 17, *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Research; 2021. p. 195–206.
11. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, et al. Diabetic neuropathy. Vol. 5, *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group; 2019.
12. Selby NM, Taal MW. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines. Vol. 22, *Diabetes, Obesity and Metabolism*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 3–15.
13. American Diabetes Association Professional Practice Committee, Draznin B, Aroda VR, Bakris G, Benson G, Brown FM, et al. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*. 2022;45(Suppl 1):S83–96.

14. https://snlg.iss.it/wp-content/uploads/2021/07/LG_379_diabete_2.pdf.
15. American Diabetes Association Professional Practice Committee, Draznin B, Aroda VR, Bakris G, Benson G, Brown FM, et al. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*. 2022;45(Suppl 1):S125–43.
16. Chen L, Pei JH, Kuang J, Chen HM, Chen Z, Li ZW, et al. Effect of lifestyle intervention in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2015 Feb 1;64(2):338–47.
17. Yuen KS, Ye ZW, Fung SY, Chan CP, Jin DY. SARS-CoV-2 and COVID-19: The most important research questions. *Cell and Bioscience*. 2020 Mar 16;10(1).
18. Eurosurveillance Editorial Team. Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2020 Feb 1;25(5).
19. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>.
20. Araf Y, Akter F, Tang Y dong, Fatemi R, Parvez MSA, Zheng C, et al. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. Vol. 94, *Journal of Medical Virology*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 1825–32.
21. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports> .
22. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8.
23. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Vol. 19, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research; 2021. p. 141–54.
24. Li H, Wang Y, Ji M, Pei F, Zhao Q, Zhou Y, et al. Transmission Routes Analysis of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Case Report. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020 Jul 10;8.
25. Kordzadeh-Kermani E, Khalili H, Karimzadeh I. Pathogenesis, clinical manifestations and complications of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Vol. 15, *Future Microbiology*. Future Medicine Ltd.; 2020. p. 1287–305.
26. Fu L, Wang B, Yuan T, Chen X, Ao Y, Fitzpatrick T, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*. 2020 Jun 1;80(6):656–65.
27. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and

- Prevention. Vol. 323, JAMA - Journal of the American Medical Association. American Medical Association; 2020. p. 1239–42.
28. Wang X, Fang X, Cai Z, Wu X, Gao X, Min J, et al. Comorbid Chronic Diseases and Acute Organ Injuries Are Strongly Correlated with Disease Severity and Mortality among COVID-19 Patients: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Research*. 2020 Apr 19;2020:1–17.
 29. Li X, Xu S, Yu M, Wang K, Tao Y, Zhou Y, et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020 Jul 1;146(1):110–8.
 30. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020 Feb 20;382(8):727–33.
 31. COVID-19 Treatment Guidelines 2 [Internet]. Available from: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>
 32. Pontone G, Scafuri S, Mancini ME, Agalbato C, Guglielmo M, Baggiano A, et al. Role of computed tomography in COVID-19. Vol. 15, *Journal of Cardiovascular Computed Tomography*. Elsevier Inc.; 2021. p. 27–36.
 33. Ghaffari A, Meurant R, Ardakani A. COVID-19 serological tests: how well do they actually perform? Vol. 10, *Diagnostics*. MDPI AG; 2020.
 34. Mahmudpour M, Roozbeh J, Keshavarz M, Farrokhi S, Nabipour I. COVID-19 cytokine storm: The anger of inflammation. Vol. 133, *Cytokine*. Academic Press; 2020.
 35. Gupta A, Madhavan M v., Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. Vol. 26, *Nature Medicine*. Nature Research; 2020. p. 1017–32.
 36. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk Factors Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients with Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Internal Medicine*. 2020 Jul 1;180(7):934–43.
 37. Potere N, Valeriani E, Candeloro M, Tana M, Porreca E, Abbate A, et al. Acute complications and mortality in hospitalized patients with coronavirus disease 2019: A systematic review and meta-analysis. Vol. 24, *Critical Care*. BioMed Central; 2020.
 38. Stokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, Marder EP, Raz KM, El S, et al. MMWR - Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance — United States, January 22–May 30, 2020 [Internet]. 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/reporting-pui.html>.
 39. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, Mera J, Webb BJ, Perez G, et al. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *New England Journal of Medicine*. 2022 Jan 27;386(4):305–15.
 40. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Delos Reyes V, et al. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N Engl J Med*. 2022;386(6):509–20.

41. https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1621225/Comunicato_AIFA_682_EN.pdf.
42. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021 Feb 25;384(8):693–704.
43. Budhathoki P, Shrestha DB, Rawal E, Khadka S. Corticosteroids in COVID-19: Is it Rational? A Systematic Review and Meta-Analysis. *SN Comprehensive Clinical Medicine*. 2020 Dec;2(12):2600–20.
44. Gordon AC, Angus DC, Derde LPG. Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with Covid-19. Reply. *N Engl J Med*. 2021;385(12):1147–9.
45. Taylor PC, Adams AC, Hufford MM, de la Torre I, Winthrop K, Gottlieb RL. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. Vol. 21, *Nature Reviews Immunology*. Nature Research; 2021. p. 382–93.
46. Iketani S, Liu L, Guo Y, Liu L, Chan JFW, Huang Y, et al. Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Nature*. 2022 Apr 21;604(7906):553–6.
47. Scherer PE, Kirwan JP, Rosen CJ. Post-acute sequelae of COVID-19: A metabolic perspective. Vol. 11, *eLife*. eLife Sciences Publications Ltd; 2022.
48. Shah W, Hillman T, Playford ED, Hishmeh L. Managing the long term effects of covid-19: summary of NICE, SIGN, and RCGP rapid guideline. *BMJ*. 2021 Jan 22;n136.
49. Jiang DH, Roy DJ, Gu BJ, Hassett LC, McCoy RG. Postacute Sequelae of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection: A State-of-the-Art Review. Vol. 6, *JACC: Basic to Translational Science*. Elsevier Inc.; 2021. p. 796–811.
50. Sudre CH, Murray B, Varsavsky T, Graham MS, Penfold RS, Bowyer RC, et al. Attributes and predictors of long COVID. *Nature Medicine*. 2021 Apr 1;27(4):626–31.
51. Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, Madhavan M v., McGroder C, Stevens JS, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. Vol. 27, *Nature Medicine*. Nature Research; 2021. p. 601–15.
52. Su Y, Yuan D, Chen DG, Ng RH, Wang K, Choi J, et al. Multiple early factors anticipate post-acute COVID-19 sequelae. *Cell*. 2022 Mar 3;185(5):881-895.e20.
53. Aiyegbusi OL, Hughes SE, Turner G, Rivera SC, McMullan C, Chandan JS, et al. Symptoms, complications and management of long COVID: a review. Vol. 114, *Journal of the Royal Society of Medicine*. SAGE Publications Ltd; 2021. p. 428–42.
54. Singh AK, Gillies CL, Singh R, Singh A, Chudasama Y, Coles B, et al. Prevalence of co-morbidities and their association with mortality in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2020 Oct 1;22(10):1915–24.

55. Fadini GP, Morieri ML, Longato E, Avogaro A. Prevalence and impact of diabetes among people infected with SARS-CoV-2. Vol. 43, *Journal of Endocrinological Investigation*. Springer; 2020. p. 867–9.
56. Guo W, Li M, Dong Y, Zhou H, Zhang Z, Tian C, et al. Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2020 Oct 1;36(7).
57. Feldman EL, Savelieff MG, Hayek SS, Pennathur S, Kretzler M, Pop-Busui R. Covid-19 and diabetes: A collision and collusion of two diseases. *Diabetes*. 2020 Dec 1;69(12):2549–65.
58. Barron E, Bakhai C, Kar P, Weaver A, Bradley D, Ismail H, et al. Associations of type 1 and type 2 diabetes with COVID-19-related mortality in England: a whole-population study. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. 2020 Oct 1;8(10):813–22.
59. Steenblock C, Schwarz PEH, Ludwig B, Linkermann A, Zimmet P, Kulebyakin K, et al. COVID-19 and metabolic disease: mechanisms and clinical management. Vol. 9, *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. Elsevier Ltd; 2021. p. 786–98.
60. Santos A, Magro DO, Evangelista-Poderoso R, Saad MJA. Diabetes, obesity, and insulin resistance in COVID-19: molecular interrelationship and therapeutic implications. Vol. 13, *Diabetology and Metabolic Syndrome*. BioMed Central Ltd; 2021.
61. Fadini GP, Morieri ML, Boscari F, Fioretto P, Maran A, Busetto L, et al. Newly-diagnosed diabetes and admission hyperglycemia predict COVID-19 severity by aggravating respiratory deterioration. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2020 Oct 1;168.
62. Zhu L, She ZG, Cheng X, Qin JJ, Zhang XJ, Cai J, et al. Association of Blood Glucose Control and Outcomes in Patients with COVID-19 and Pre-existing Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism*. 2020 Jun 2;31(6):1068-1077.e3.
63. Morieri ML, Fadini GP, Boscari F, Fioretto P, Maran A, Busetto L, et al. Hyperglycemia, glucocorticoid therapy, and outcome of COVID-19. Vol. 168, *Diabetes Research and Clinical Practice*. Elsevier Ireland Ltd; 2020.
64. Loosen SH, Jensen BEO, Tanislav C, Luedde T, Roderburg C, Kostev K. Obesity and lipid metabolism disorders determine the risk for development of long COVID syndrome: a cross-sectional study from 50,402 COVID-19 patients. *Infection*. 2022 Mar 30;
65. Fernóandez-De-las-Penas C, Guijarro C, Torres-Macho J, Velasco-Arribas M, Plaza-Canteli S, Hernóandez-Barrera V, et al. Diabetes and the Risk of Long-term Post-COVID Symptoms. *Diabetes*. 2021 Dec 1;70(12):2917–21.
66. Li J, Wang X, Chen J, Zuo X, Zhang H, Deng A. COVID-19 infection may cause ketosis and ketoacidosis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2020 Oct 1;22(10):1935–41.
67. Khunti K, Prato S del, Mathieu C, Kahn SE, Gabbay RA, Buse JB. Covid-19, hyperglycemia, and new-onset diabetes. *Diabetes Care*. 2021 Dec 1;44(12):2645–55.

68. Sathish T, Kapoor N, Cao Y, Tapp RJ, Zimmet P. Proportion of newly diagnosed diabetes in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. Vol. 23, *Diabetes, Obesity and Metabolism*. Blackwell Publishing Ltd; 2021. p. 870–4.
69. Unsworth R, Wallace S, Oliver NS, Yeung S, Kshirsagar A, Naidu H, et al. New-onset type 1 diabetes in children during COVID-19: Multicenter regional findings in the U.K. Vol. 43, *Diabetes Care*. American Diabetes Association Inc.; 2020. p. e170–1.
70. Atkinson MA, Powers AC. Distinguishing the real from the hyperglycaemia: does COVID-19 induce diabetes? Vol. 9, *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. Lancet Publishing Group; 2021. p. 328–9.
71. van der Heide V, Jangra S, Cohen P, Rathnasinghe R, Aslam S, Aydillo T, et al. Limited extent and consequences of pancreatic SARS-CoV-2 infection. *Cell Reports*. 2022 Mar 15;38(11).
72. Reiterer M, Rajan M, Gómez-Banoy N, Lau JD, Gomez-Escobar LG, Ma L, et al. Hyperglycemia in acute COVID-19 is characterized by insulin resistance and adipose tissue infectivity by SARS-CoV-2. *Cell Metabolism*. 2021 Nov 2;33(11):2174-2188.e5.
73. Xie Y, Al-Aly Z. Risks and burdens of incident diabetes in long COVID: a cohort study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2022 May;10(5):311–21.
74. Maestre-Muñiz MM, Arias Á, Mata-Vázquez E, Martín-Toledano M, López-Larramona G, Ruiz-Chicote AM, et al. Long-term outcomes of patients with coronavirus disease 2019 at one year after hospital discharge. *Journal of Clinical Medicine*. 2021 Jul 1;10(13).
75. Montefusco L, ben Nasr M, D’Addio F, Loretelli C, Rossi A, Pastore I, et al. Acute and long-term disruption of glycometabolic control after SARS-CoV-2 infection. *Nature Metabolism*. 2021 Jun 1;3(6):774–85.
76. Laurenzi A, Caretto A, Molinari C, Mercalli A, Melzi R, Nano R, et al. No Evidence of Long-Term Disruption of Glycometabolic Control after SARS-CoV-2 Infection. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2022 Mar 1;107(3):E1009–19.
77. Carr MJ, Wright AK, Leelarathna L, Thabit H, Milne N, Kanumilli N, et al. Impact of COVID-19 on diagnoses, monitoring, and mortality in people with type 2 diabetes in the UK. Vol. 9, *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. Lancet Publishing Group; 2021. p. 413–5.
78. Fadini GP, Bonora BM, Morieri ML, Avogaro A. Why diabetes outpatient clinics should not close during pandemic crises. Vol. 44, *Journal of Endocrinological Investigation*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 1795–8.
79. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. Vol. 110, *Circulation Research*. 2012. p. 624–37.
80. Fadini GP, Agostini C, Sartore S, Avogaro A. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2007 Sep;194(1):46–54.

81. Fukuda J, Kaneko T, Egashira M, Oshimi K. Direct Measurement of CD34⁺ Blood Stem Cell Absolute Counts by Flow Cytometry. *STEM CELLS*. 1998 Jul;16(4):294–300.
82. Méndez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*. 2008 Mar 27;452(7186):442–7.
83. Welner RS, Kincade PW. Stem cells on patrol. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):842–4.
84. Fadini GP, Ciciliot S, Albiero M. Concise Review: Perspectives and Clinical Implications of Bone Marrow and Circulating Stem Cell Defects in Diabetes. Vol. 35, *Stem Cells*. Wiley-Blackwell; 2017. p. 106–16.
85. Ballard VLT, Edelberg JM. Stem cells and the regeneration of the aging cardiovascular system. Vol. 100, *Circulation Research*. 2007. p. 1116–27.
86. Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, Köllnberger M, Tubo N, Moseman EA, et al. Immunosurveillance by Hematopoietic Progenitor Cells Trafficking through Blood, Lymph, and Peripheral Tissues. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):994–1008.
87. Fadini GP. A look at the bone marrow predicts the global outcome. *Circ Res*. 2015 Jan 16;116(2):232–4.
88. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964–7.
89. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: Mobilization, differentiation, and homing. Vol. 23, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003. p. 1185–9.
90. Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: Identity defined? Vol. 13, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009. p. 87–102.
91. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999 Aug 6;85(3):221–8.
92. Fadini GP. A reappraisal of the role of circulating (progenitor) cells in the pathobiology of diabetic complications. Vol. 57, *Diabetologia*. 2014. p. 4–15.
93. Fadini GP, Mehta A, Dhindsa DS, Bonora BM, Sreejit G, Nagareddy P, et al. Circulating stem cells and cardiovascular outcomes: from basic science to the clinic. Vol. 41, *European heart journal*. NLM (Medline); 2020. p. 4271–82.
94. Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. Vol. 78, *Cardiovascular Research*. 2008. p. 413–21.
95. Hammadah M, al Mheid I, Wilmot K, Ramadan R, Abdelhadi N, Alkhoder A, et al. Telomere shortening, regenerative capacity, and cardiovascular outcomes. *Circulation Research*. 2017 Mar 31;120(7):1130–8.

96. Rode L, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Peripheral blood leukocyte telomere length and mortality among 64 637 individuals from the general population. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Jun 1;107(6).
97. Sanders JL, Newman AB. Telomere length in epidemiology: A biomarker of aging, age-related disease, both, or neither? *Epidemiologic Reviews.* 2013 Jan 1;35(1):112–31.
98. al Mheid I, Hayek SS, Ko YA, Akbik F, Li Q, Ghasemzadeh N, et al. Age and Human Regenerative Capacity: Impact of Cardiovascular Risk Factors. *Circulation Research.* 2016 Sep 16;119(7):801–9.
99. Rigato M, Avogaro A, Fadini GP. Levels of Circulating Progenitor Cells, Cardiovascular Outcomes and Death: A Meta-Analysis of Prospective Observational Studies. *Circulation Research.* 2016 Jun 10;118(12):1930–9.
100. Fadini GP, Albiero M, Seeger F, Poncina N, Menegazzo L, Angelini A, et al. Stem cell compartmentalization in diabetes and high cardiovascular risk reveals the role of DPP-4 in diabetic stem cell mobilopathy. *Basic Research in Cardiology.* 2013 Jan 1;108(1).
101. Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood.* 2014 Oct 30;124(18):2775–83.
102. Fadini GP, Maruyama S, Ozaki T, Taguchi A, Meigs J, Dimmeler S, et al. Circulating progenitor cell count for cardiovascular risk stratification: A pooled analysis. *PLoS ONE.* 2010;5(7).
103. Fadini GP, Boscaro E, de Kreutzenberg S, Agostini C, Seeger F, Dimmeler S, et al. Time course and mechanisms of circulating progenitor cell reduction in the natural history of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2010 May;33(5):1097–102.
104. Fadini GP, Avogaro A. It is all in the blood: The multifaceted contribution of circulating progenitor cells in diabetic complications. Vol. 2012, *Experimental Diabetes Research.* 2012.
105. Fadini GP, Albiero M, de Kreutzenberg SV, Boscaro E, Cappellari R, Marescotti M, et al. Diabetes impairs stem cell and proangiogenic cell mobilization in humans. *Diabetes Care.* 2013 Apr;36(4):943–9.
106. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, Albiero M, Baesso I, Cabrelle A, et al. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia.* 2006 Dec;49(12):3075–84.
107. DiPersio JF. Diabetic stem-cell “mobilopathy”. *N Engl J Med.* 2011 Dec 29;365(26):2536–8.
108. Fadini GP, Ferraro F, Quaini F, Asahara T, Madeddu P. Concise Review: Diabetes, the Bone Marrow Niche, and Impaired Vascular Regeneration. *Stem Cells Translational Medicine.* 2014 Aug 1;3(8):949–57.
109. Spinetti G, Cordella D, Fortunato O, Sangalli E, Losa S, Gotti A, et al. Global remodeling of the vascular stem cell niche in bone marrow of diabetic patients: Implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway. *Circulation Research.* 2013 Feb 1;112(3):510–22.

110. Nagareddy PR, Murphy AJ, Stirzaker RA, Hu Y, Yu S, Miller RG, et al. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metabolism*. 2013 May 7;17(5):695–708.
111. Albiero M, Poncina N, Ciciliot S, Cappellari R, Menegazzo L, Ferraro F, et al. Bone marrow macrophages contribute to diabetic stem cell mobilopathy by producing oncostatin M. *Diabetes*. 2015 Aug 1;64(8):2957–68.
112. Fadini GP, Albiero M. Impaired haematopoietic stem / progenitor cell traffic and multi-organ damage in diabetes. Available from: <https://academic.oup.com/stmcls/advance-article/doi/10.1093/stmcls/sxac035/6584806>
113. Rigato M, Bittante C, Albiero M, Avogaro A, Fadini GP. Circulating progenitor cell count predicts microvascular outcomes in type 2 diabetic patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015 Jul 1;100(7):2666–72.
114. Fadini GP, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M, et al. Number and Function of Endothelial Progenitor Cells as a Marker of Severity for Diabetic Vasculopathy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006 Sep;26(9):2140–6.
115. Fadini GP, Rigato M, Cappellari R, Bonora BM, Avogaro A. Long-term prediction of cardiovascular outcomes by circulating CD34+ and CD34+CD133+ stem cells in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2017 Jan 1;40(1):125–31.
116. Bonora BM, Fogar P, Zuin J, Falaguasta D, Cappellari R, Cattelan A, et al. Hyperglycemia, Reduced Hematopoietic Stem Cells, and Outcome of COVID-19. *Diabetes*. 2022 Apr 1;71(4):788–94.
117. Wang X, Wen Y, Xie X, Liu Y, Tan X, Cai Q, et al. Dysregulated hematopoiesis in bone marrow marks severe COVID-19. *Cell Discovery*. 2021 Dec 4;7(1):60.
118. Loretelli C, Abdelsalam A, D’Addio F, Nasr M ben, Assi E, Usuelli V, et al. PD-1 blockade counteracts post-COVID-19 immune abnormalities and stimulates the anti-SARS-CoV-2 immune response. *JCI Insight*. 2021 Dec 22;6(24).
119. Rajan S, Khunti K, Alwan N, Steves C, Greenhalgh T, Macdermott N, et al. In the wake of the pandemic Preparing for Long COVID HEALTH SYSTEMS AND POLICY ANALYSIS. 2021; Available from: <http://www.euro.who.int/en/about-us/partners/>
120. Rando HM, Bennett TD, Byrd JB, Bramante C, Callahan TJ, Chute CG, et al. Challenges in defining Long COVID: Striking differences across literature, Electronic Health Records, and patient-reported information. *medRxiv*. 2021 Mar 26;
121. Elahi S. Hematopoietic responses to SARS-CoV-2 infection. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022 Mar 13;79(3):187.