



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Corso di Laurea di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina

Direttore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

UOC Malattie del Metabolismo

Direttore: Ch.mo Prof. Angelo Avogaro

TESI DI LAUREA

**CELLULE STAMINALI CIRCOLANTI
E OUTCOMES RENALI NEI
PAZIENTI CON DIABETE DI TIPO 2**

Relatore: Ch.mo Prof. Gian Paolo Fadini

Laureanda: Narjis Elisa Cattaneo

N° matricola:1168467

ANNO ACCADEMICO 2022-2023



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Corso di Laurea di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina
Direttore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

UOC Malattie del Metabolismo
Direttore: Ch.mo Prof. Angelo Avogaro

TESI DI LAUREA

**CELLULE STAMINALI CIRCOLANTI
E OUTCOMES RENALI NEI
PAZIENTI CON DIABETE DI TIPO 2**

Relatore: Ch.mo Prof. Gian Paolo Fadini

Laureanda: Narjis Elisa Cattaneo
N° matricola: 1168467

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
ICONOGRAFIA	5
LISTA TABELLE.....	7
SIGLE E ABBREVIAZIONI.....	9
INTRODUZIONE	11
1. Definizione di diabete	11
2. Epidemiologia.....	12
3. Patogenesi del diabete di tipo 2.....	13
4. Complicanze vasculopatiche del diabete.....	14
4.1 Patogenesi delle complicanze microvascolari.....	15
4.2 Patogenesi delle complicanze macrovascolari	18
5. Nefropatia diabetica	19
5.1 Istopatologia della nefropatia diabetica nel diabete di tipo 1.....	19
5.2 Regolazione tubulare della filtrazione glomerulare	24
5.3 Disfunzione endoteliale, microalbuminuria e patologia cardiovascolare nel diabete	26
6. Malattia renale cronica nel diabete.....	26
6.1 Fenotipi della malattia renale cronica nel diabete.....	28
6.2 Fattori di rischio per lo sviluppo della nefropatia nel paziente diabetico	33
6.3 Modelli predittivi di outcomes renali nel lungo termine.....	34
7. Terapia farmacologica.....	35
7.1 Inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone nella malattia renale diabetica	37
7.2 SGLT2 inibitori nella malattia renale diabetica	38
7.3 Antagonisti dei recettori mineralcorticoidi	40
8. Gli endpoints surrogati dello sviluppo di insufficienza renale nei trials clinici	44
9. Cellule staminali circolanti.....	51
9.1 Cosa sono le cellule staminali circolanti e quale significato possono avere nel diabete	51

9.2 La disfunzione endoteliale come patologia del midollo osseo: studi preclinici	52
9.3 Cellule staminali circolanti e fattori di rischio cardiovascolare.....	58
9.4 Cellule staminali circolanti e outcomes cardiovascolari.....	60
9.5 Significato clinico della riduzione delle cellule staminali circolanti nei pazienti con diabete di tipo 2	63
9.6 Strategie terapeutiche	68
SCOPO DELLO STUDIO.....	71
MATERIALI E METODI.....	73
1. Identificazione e caratterizzazione dei pazienti	73
2. Determinazione delle cellule staminali circolanti.....	75
3. Definizione degli outcomes e follow up	76
4. Analisi statistica.....	76
RISULTATI.....	79
1. Caratteristiche basali dei pazienti	79
2. Follow up e outcomes	81
3. Livelli di HSPCs circolanti e outcomes renali.....	82
4. Conta di HSPCs e capacità predittiva degli outcomes renali avversi	85
DISCUSSIONE.....	87
1. Riassunto dei risultati principali	87
2. Contestualizzazione e interpretazione dei risultati	87
3. Limiti dello studio.....	91
4. Punti di forza.....	92
5. Conclusioni e prospettive future	93
BIBLIOGRAFIA.....	85
RINGRAZIAMENTI.....	103

RIASSUNTO

Presupposti dello studio

Oggi, nei paesi industrializzati, il diabete è la prima causa di dialisi e questi pazienti muoiono principalmente per eventi cardiovascolari. La malattia renale cronica ha un decorso asintomatico e irreversibile, ma le nuove potenzialità nefroprotettive e cardioprotettive di SGLT2 inibitori e degli antagonisti dei recettori mineralcorticoidi rende possibili strategie di prevenzione. È quindi prioritario elaborare modelli predittivi di outcomes renali di lungo termine, non solo in pazienti diabetici già affetti da malattia renale cronica, ma anche in prevenzione primaria. L'elaborazione di scores di rischio efficaci presuppone una comprensione della fisiopatologia della malattia renale, anche come parte della sindrome cardio-renale. Con questo obiettivo, il presente lavoro ha presentato l'ipotesi che la disfunzione midollare e il conseguente esaurimento qualitativo e quantitativo delle cellule staminali ematopoietiche circolanti (HSPCs) sia un meccanismo patogenetico comune delle complicanze macrovascolari e microvascolari nel diabete. C'è evidenza che nel paziente diabetico i livelli di tali cellule siano ridotti e correlati a patologie cardiovascolari ed è stato osservato che ridotti livelli siano significativamente associati alle complicanze microangiopatiche. Il presupposto meccanicistico è la perdita della funzione di riparazione del danno tissutale, in un contesto più ampio di disfunzione endoteliale e stress ossidativo.

I livelli di HSPCs riflettono la correlazione tra sistema ematopoietico e biologia vascolare, all'interno di una nuova ipotesi di fisiopatologia cardiovascolare che include l'amplificazione della mielopoiesi infiammatoria e l'ematopoiesi di cloni cellulari di HSPCs come fattori di rischio di aterosclerosi.

Scopo dello studio

È stato esaminato se l'implementazione della conta delle HSPCs nell'equazione di rischio elaborata dal CKD Prognosis Consortium migliori la capacità predittiva di outcomes renali di lungo termine in pazienti con diabete di tipo 2.

Materiali e metodi

Sono stati inclusi pazienti con diabete di tipo 2 di cui sono stati determinati al baseline il numero di HSPCs per ml di sangue con tecniche di citofluorimetria a flusso. Sulla base del valore di tali livelli, i pazienti sono stati suddivisi nei due gruppi bassa e alta conta di HSPCs. Sono stati raccolti dati riguardo a eGFR e albuminuria fino a dicembre 2022. L'endpoint primario era un endpoint composito: nuovo esordio di macroalbuminuria, declino sostenuto di eGFR >40%, sviluppo di insufficienza renale o morte per ogni causa. Le analisi sono state aggiustate per i fattori predittivi noti di patologia renale nella popolazione con diabete di tipo 2.

Risultati

Si tratta di uno studio pseudoprospectivo, in cui sono stati inclusi 342 pazienti (67.8% uomini) con un'età media di 65.6 anni.

I pazienti con bassa conta di HSPCs (n=171) erano significativamente più anziani, con maggiore prevalenza di ipertensione, di scompenso cardiaco e di nefropatia (45.0% rispetto a 33.9%; p=0.036), evidenziata da minore eGFR (75.0 ml/min/1.73 m² rispetto a 80.1, p=0.021) e maggiore rapporto albumina urinaria/creatinina urinaria al baseline (182.3 mg/g vs 65.3, p=0.008).

Durante un follow up mediano di 6.7 anni, i pazienti con alta conta di HSPCs, rispetto ai pazienti con bassa conta, hanno sviluppato meno frequentemente l'endpoint renale composito (HR 0.69; 95% C.I. 0.49-0.97), hanno avuto un declino di eGFR più lento e un simile incremento di albuminuria. Aggiungendo l'informazione alta/bassa conta di HSPCs allo score di rischio CKD Prognosis Consortium, è stata ottenuta un incremento significativo della C-statistica da 0.695 a 0.751 (+0.056; 95% CI 0.008 to 0.104, p=0.022), di rIDI (+30.6%; p= 0.018) e di NRI (NRI 0.59; 95% CI 0.33-0.84; p<0.0001).

Conclusioni

Livelli superiori di HSPCs al valore mediano sono protettivi contro lo sviluppo di outcomes renali avversi nel paziente con diabete di tipo 2 e l'implementazione della conta alta/bassa di HSPCs nello score di rischio clinico formulato dal CKD Prognosis Consortium ne migliora la performance.

ABSTRACT

Background

Diabetes mellitus is the leading cause for kidney disease and dialysis in the industrialized countries. These patients die mainly of cardiovascular disease. The chronic kidney disease is largely irreversible and clinically silent until its later stages, but we have the unprecedented opportunity to prevent kidney failure and reduce the risk of death from cardiovascular disease with SGLT2 inhibitors and non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonists. As such, optimal medical management requires early identification of patients at high risk of kidney function decline, even in primary prevention. The development of prediction models for the decline in eGFR or kidney failure mandates the comprehension of kidney disease also as part of cardiorenal syndrome. In this work it's hypothesized that the extensive remodelling of the bone marrow niche, with microangiopathy, and the impaired traffic of hematopoietic stem/progenitor cells HSPCs could be a common pathogenic ground for micro- and macroangiopathy. There is evidence that diabetes reduces the levels of circulating HSPCs and that this reduction is strongly associated with cardiovascular disease and is related to microvascular outcomes. Mechanistically, it's lost an endogenous tissue regenerative mechanism, in a background of endothelial dysfunction and oxidative stress.

Levels of CSCs reflects the ontologic overlap between the haematopoietic and vascular systems and should be interpreted in the context of a new pathophysiology hypothesis, which include the enhancement of the inflammatory myelopoiesis and the clonal haematopoiesis as atherosclerotic risk factors.

Objective

The objective of the study was to test whether measuring circulating hematopoietic stem/progenitor cells HSPCs can improve the prediction of long-term kidney outcomes in patients with type 2 diabetes.

Research design and methods

In this study were included patients with type 2 diabetes who had a baseline determination of circulating HSPCs. They were divided in two groups based on their median value per ml of blood. Updated data on eGFR and albuminuria up to December 2022 were collected.

The primary endpoint was a composite of new-onset macroalbuminuria, sustained >40% eGFR decline, end-stage kidney disease or death from any cause. The analyses were adjusted for known predictors of kidney disease in the population affected by type 2 diabetes.

Results

It was a pseudoprospective study which included 342 patients (67.8% men) with a mean age of 65.6 years. Those with low HSPCs (n=171) were significantly older, had a greater prevalence of hypertension, heart failure, and nephropathy (45.0% versus 33.9%; p=0.036), evidenced by lower eGFR (75.0 ml/min/1.73 m² vs 80.1, p=0.021) and higher albuminuria at baseline (182.3 mg/g vs 65.3, p=0.008). During a median follow-up of 6.7 years, patients with high versus low HSPCs had lower rates of the composite renal endpoint (adjusted HR 0.69; 95% C.I. 0.49-0.97), slower decline of eGFR and a similar increase in albuminuria. Adding the high/low HSPC information to the renal risk score of the CKD Prognosis Consortium significantly improved discrimination of patients with future adverse kidney outcomes. It was observed a significant increase in AUC from 0.695 to 0.751 (+0.056; 95% CI 0.008 to 0.104, p=0.022), in rIDI (+30.6%; p= 0.018) and improvement of category-free NRI (NRI 0.59; 95% CI 0.33-0.84; p<0.0001).

Conclusions

Among people with type 2 diabetes observed for up to 10 years, a level of circulating HSPCs above the median value exerted a strong protective effect against the loss of kidney function and the future long-term occurrence of adverse kidney outcomes. Furthermore, adding the measure of HSPCs to the CKD Prognosis Consortium risk score significantly improved the discrimination of patients with a subsequent adverse renal outcome.

ICONOGRAFIA

INTRODUZIONE	11
FIGURA 1: meccanismo unificante del danno cellulare indotto dall'iperglicemia.	18
FIGURA 2: vie molecolari di patogenesi delle complicanze macrovascolari.	18
FIGURA 3: illustrazione schematica delle alterazioni strutturali e funzionali del glomerulo nel diabete.....	24
FIGURA 4: resetting del feedback tubulo-glomerulare nel diabete	25
FIGURA 5: categorie prognostiche dell'insufficienza renale cronica (KDIGO 2012).	27
FIGURA 6: rappresentazione dei fenotipi non tradizionali di malattia renale cronica nel diabete.....	29
FIGURA 7: algoritmo della gestione farmacologica del paziente con diabete di tipo 2 (KDIGO 2022)	36
FIGURA 8: effetti del trattamento sullo <i>slope</i> di eGFR in relazione agli endpoints clinici.....	50
FIGURA 9: correlazione molecolare tra 'mobilopatia diabetica' e mielopoiesi....	57
FIGURA 10: correlazione tra livelli di cellule staminali circolanti e alcuni parametri cardiovascolari.....	59
FIGURA 11: correlazione tra livelli delle cellule CD34 ⁺ e fattori di rischio cardiovascolari.	60
FIGURA 12: correlazione tra livelli delle cellule CD34 ⁺ e componenti della sindrome metabolica.	60
FIGURA 13: relazione tra cellule staminali circolanti e outcomes cardiovascolari.	61
FIGURA 14: effetto dell'implementazione della conta delle cellule staminali circolanti nella capacità predittiva di outcomes cardiovascolari.....	62
FIGURA 15: variazione della conta delle cellule CD34 ⁺ nella storia naturale del diabete di tipo 2.....	63
FIGURA 16: associazione tra conta delle cellule staminali circolanti e complicanze microangiopatiche nel diabete di tipo 2	66
SCOPO DELLO STUDIO	71
MATERIALI E METODI	73
RISULTATI	79
FIGURA 17: forest plot di confronto degli outcomes renali tra i due gruppi di pazienti	83

FIGURA 18: curve di incidenza degli outcomes renali nei due gruppi di pazienti negli anni di osservazione.	83
figura 19: cambiamenti di eGFR e di uACR nei due gruppi di pazienti negli anni di osservazione	84
FIGURA 20: confronto della c-statistica calcolata nei due modelli predittivi senza e con l'informazione alta-bassa conta	85
DISCUSSIONE	87
BIBLIOGRAFIA	85

LISTA DELLE TABELLE

INTRODUZIONE	11
TABELLA I: fattori ambientali riconosciuti nella patogenesi del diabete di tipo 2	14
TABELLA II: stadiazione istopatologica della glomerulopatia diabetica	21
TABELLA III: stadiazione della nefropatia diabetica di tipo 1	22
TABELLA IV: fattori di rischio riconosciuti nello sviluppo della malattia renale cronica nel diabete	33
TABELLA V: lista dei trials clinici sugli SGLT2 inibitori	38
TABELLA VI: caratteristiche di albuminuria e di eGFR che li rendono validi endpoints surrogati della funzionalità renale	45, 46
TABELLA VII: risultati degli studi di validazione degli outcomes surrogati della funzionalità renale	47, 48, 49
TABELLA VIII: endpoints surrogati approvati dalle linee guida per la valutazione della malattia renale cronica nella ricerca	50
TABELLA IX: relazione tra immunofenotipo delle cellule staminali circolanti e outcomes microvascolari in pazienti con diabete di tipo 2	65
TABELLA X: strategia terapeutica e effetti sulle cellule staminali circolanti nel diabete di tipo 2	68
SCOPO DELLO STUDIO	71
MATERIALI E METODI	73
TABELLA XI: definizioni cliniche della patologie dei pazienti arruolati nello studio	73, 74, 75
RISULTATI	79
TABELLA XII: caratteristiche basali dei pazienti arruolati, suddivise tra i due gruppi	79, 80, 81
DISCUSSIONE	87
BIBLIOGRAFIA	85

SIGLE E ABBREVIAZIONI

Acronimo	Significato
DMT1	Diabete di tipo 1
DMT2	Diabete di tipo 2
Hb1Ac	Emoglobina glicata
<i>AGEs</i>	<i>Advanced glycosilation products</i>
<i>PKC</i>	<i>Protein Kinase C</i>
<i>VEGF</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<i>TGF-β</i>	<i>Trasforming Growth Factor</i>
<i>ROS</i>	<i>Reactive oxygen species</i>
<i>Mn-SOD</i>	<i>Manganese superoxide dismutase</i>
<i>GFR</i>	<i>Glomerular Filtration Rate</i>
<i>SNGFR</i>	<i>Single nephron GFR</i>
<i>eGFR</i>	<i>Estimated Glomerular Filtration Rate</i>
<i>mGFR</i>	<i>Measured GFR</i>
<i>GBM</i>	<i>Glomerular basement membrane</i>
<i>TBM</i>	<i>Tubular basement membrane</i>
<i>AER</i>	<i>Albumin Excretion Rate</i>
<i>uACR</i>	<i>Urine Albumin-Creatinine Ratio</i>
<i>DKD</i>	<i>Diabetic Kidney Disease</i>
<i>CKD</i>	<i>Chronic Kidney Disease</i>
<i>ESRD</i>	<i>End-stage renal disease</i>
<i>RAAS</i>	<i>Renin-angiotensin-aldosterone system</i>
<i>SGLT1, 2</i>	<i>Sodium Glucose Transporter 1, 2</i>
<i>ACEi</i>	<i>Angiotensin-converting enzyme inhibitor</i>
<i>ARB</i>	<i>angiotensin II receptor blocker o sartani</i>
<i>GLP1RA</i>	<i>Glucagon-like peptide-1 receptor agonists</i>
<i>DPP4</i>	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i>
<i>HF, HFpEF, HFrES</i>	<i>Heart Failure, Heart Failure with preserved Ejection Fraction, Heart Failure with reduced Ejection Fraction</i>
<i>ENaC</i>	<i>Epithelial Sodium Channel</i>
<i>ROMK</i>	<i>Renal Outer Medullary Potassium channel</i>
<i>EPCs</i>	<i>Endothelial progenitor cells</i>
<i>HSPCs</i>	<i>Hematopoietic stem/progenitor cells</i>
<i>CSCs</i>	<i>Circulating stem cells</i>
<i>CPCs</i>	<i>Circulating progenitor cells</i>
<i>PBMCs</i>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
<i>MACs</i>	<i>Myeloid Angiogenic Cells</i>
<i>ECFCs</i>	<i>Endothelial Colony Forming Cells</i>
<i>BM</i>	<i>Bone marrow</i>

<i>CHIP</i>	<i>clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>
<i>VEGFR-2 o KDR</i>	<i>Type 2 vascular endothelial growth factor receptor</i>
<i>CXCL12 o SDF-1</i>	<i>Stromal cell-derived factor</i>
<i>MMPs</i>	<i>Matrix metalloproteinases</i>
<i>GCSF</i>	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factors</i>
<i>HIF1α</i>	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
<i>eNOS</i>	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
<i>hsRCP</i>	<i>High sensitivity C-reactive protein</i>
<i>GFP</i>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<i>MACE</i>	<i>Major adverse cardiovascular events</i>
<i>HR</i>	<i>Hazard Ratio</i>
<i>ROC</i>	<i>Receiver-Operating-Characteristic curves</i>
<i>AUC</i>	<i>Area Under The Curve</i>
<i>LSM</i>	<i>Least Square Mean</i>
<i>rIDI</i>	<i>relative Integrated Discrimination Index</i>
<i>NRI</i>	<i>Net Reclassification Index</i>
<i>PPV</i>	<i>Predictive Positive Value</i>

INTRODUZIONE

1. Definizione di diabete

Il diabete mellito è una patologia cronica caratterizzata da incremento dei livelli di glicemia, determinata da una produzione insufficiente o assente di insulina o da una resistenza periferica all'insulina stessa.

Il diabete può essere classificato nelle seguenti forme, caratterizzate da differente fisiopatologia e caratteristiche cliniche:

1. Diabete di tipo 1 (DMT1): causato dalla distruzione autoimmune delle β -cellule pancreatiche, che solitamente esita nel deficit assoluto di insulina
2. Diabete di tipo 2 (DMT2): caratterizzato dalla progressiva riduzione della secrezione insulinica β -pancreatica in un background di insulino-resistenza
3. Diabete gestazionale: diabete di nuova diagnosi nel 2° o 3° trimestre di gravidanza, che si risolve dopo il parto. Insorge per effetto iperglicemizzante degli ormoni placentari in donne con relativa insufficienza pancreatica.
4. Forme specifiche di diabete dovute ad altre cause: sindromi monogeniche, per esempio il diabete neonatale e il diabete giovanile MODY (*maturity-onset diabetes of the young, MODY*) a trasmissione autosomica dominante, forme secondarie a compromissione del pancreas esocrino, forme iatrogene da uso di glucocorticoidi.

In soggetti asintomatici, la diagnosi di diabete viene posta sulla base del riscontro dei livelli di glicemia o di emoglobina glicata Hb1Ac superiori a determinati cut-off, dipendenti dalla tipologia di test eseguito (1):

- Test a digiuno: si misura la glicemia in soggetto a digiuno da almeno 8 ore. Si pone diagnosi di diabete per riscontro di valori di glicemia ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/L) in almeno due misurazioni.
Per valori compresi tra 100 (5.6 mmol/L) e 125 mg/dl (6.9 mmol/L) si definisce alterata glicemia a digiuno.
- Test di tolleranza orale al glucosio: si somministra al paziente una soluzione glucosata contenente 75g di glucosio e si misurano i livelli di glicemia dopo

2 ore. Si pone diagnosi di diabete per riscontro di valori di glicemia ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L) in almeno due misurazioni.

Per valori compresi tra 140 (7.8 mmol/L) e 199 mg/dl (11 mmol/L) si definisce alterata tolleranza al glucosio.

- Misurazione dei livelli di Hb1Ac: si pone diagnosi di diabete per valori di Hb1Ac $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol).

Per valori compresi tra 5.7 e 6.4% (39-47 mmol/mol) si definisce paziente con prediabete.

Il test deve essere effettuato in un laboratorio clinico certificato con test certificato e standardizzato rispetto a valori di riferimento.

In soggetto con i classici sintomi dell'iperglicemia o crisi iperglicemica, è sufficiente un valore random di glicemia > 200 mg/dl.

2. Epidemiologia

Il diabete di tipo 2 rappresenta il 90% delle diagnosi totali di diabete. Si tratta di una patologia di notevole impatto sulla salute pubblica, con elevati tassi di mortalità, disabilità e ospedalizzazione.

Nell'anno 2021 è stato stimato che 537 milioni di adulti nel mondo, di età compresa tra i 20 e 79 anni, fossero affetti da diabete (10.5% degli adulti di questa fascia di età) (2). L'incremento della prevalenza di questa malattia è in parte dovuta all'invecchiamento generale della popolazione, ma soprattutto alla diffusione di uno stile di vita sedentario e caratterizzato da un eccesso di alimentazione che favorisce lo sviluppo di fattori di rischio, quali il sovrappeso e l'obesità.

Si stima che nel 2021 circa 6.7 milioni di adulti nel mondo e 1.1 milione in Europa siano morti a causa del diabete o di sue complicanze. Nel 2014 in Italia i decessi a causa del diabete sono stati 20.119, con tasso standardizzato di mortalità di 22,0 per 100.000 residenti, mentre i decessi in cui è riportato il diabete come "causa multipla", ovvero causa iniziale o concausa, sono stati 74.022. L'analisi delle cause multiple di morte ha permesso di studiare l'associazione tra le varie patologie e il diabete, attraverso una stima del rischio relativo, e ha portato a definire il diabete come malattia dal quadro nosologico complesso, frequentemente in comorbidità con altre patologie croniche (3). Si conferma la compresenza del diabete con

malattie metaboliche quali obesità (il rischio relativo [RR] dei diabetici è 4,0), dislipidemie (RR=2,5), l'ipertensione (RR=2), le malattie ischemiche del cuore (RR=2). L'aterosclerosi è molto spesso associata al diabete e l'analisi della mortalità evidenzia il ruolo di altre malattie delle arterie come concausa.

Dal punto di vista fisiopatologico, l'eccesso di morbilità e di mortalità nei pazienti affetti da diabete è attribuito alle complicanze microvascolari e macrovascolari determinate dalla perdita dell'omeostasi della glicemia, che includono cecità, insufficienza renale, neuropatia, ulcere dei piedi e patologie cardiovascolari.

3. Patogenesi del diabete di tipo 2

I sistemi endocrini agiscono con meccanismi a feedback integrati per mantenere l'omeostasi di un parametro controllato dalla secrezione ormonale. Nel momento in cui si altera un meccanismo che sottende a questa regolazione, la perdita dell'omeostasi si può manifestare con conseguenze cliniche.

L'omeostasi della glicemia dipende dalla produzione di insulina da parte delle β -cellule pancreatiche e dall'azione ipoglicemizzante dell'insulina. L'insulina agisce con meccanismo recettoriale su tessuti periferici insulino-sensibili, quali muscolo scheletrico, tessuto adiposo e fegato. In presenza di insulino-resistenza, le β -cellule mantengono i valori omeostatici della glicemia incrementando la produzione di insulina; quando tuttavia le β -cellule esauriscono tale capacità compensatoria, la glicemia aumenta.

La condizione di alterata tolleranza al glucosio diagnosticata nel test da carico orale di glucosio rappresenta una manifestazione clinica precoce di esaurimento β -cellulare, il cui decorso progressivo esita nella sua evoluzione naturale nel diabete di tipo 2.

I fattori che contribuiscono allo sviluppo dell'insulino-resistenza e alla disfunzione β -cellulare sono eterogenei e configurano il diabete di tipo 2 come una patologia multifattoriale, che risente di fattori genetici e ambientali (4).

La componente genetica non è in grado di spiegare il rapido incremento della prevalenza di diabete di tipo 2 negli ultimi decenni. Sono stati studiati loci genici le cui mutazioni sono state associate all'obesità, all'insulino-resistenza e alla funzione

β -cellulare, ma che configurano genotipi a rischio, che possono in parte giustificare il carattere di familiarità, ma che non hanno un peso patogenetico riconosciuto (5).

È noto invece il peso predominante dei fattori ambientali nello sviluppo dell'insulino-resistenza e della disfunzione β -cellulare (*tabella I*).

Tabella I: principali fattori patogenetici della disfunzione β -cellulare e dell'insulino-resistenza (4)

Fattore ambientale	Spiegazione
Stile di vita	La sedentarietà e una dieta sbilanciata, in particolare nella proporzione di acidi grassi saturi sono fattori ambientali noti nella patogenesi del diabete di tipo 2.
Invecchiamento	La riduzione della sensibilità di risposta delle β -cellule ai carboidrati spiega in parte la riduzione della tolleranza al glucosio con l'età (6).
Ambiente intrauterino iperglicemico	Sembra determinare modifiche epigenetiche e di espressione genica che influenzano il rischio di sviluppo di obesità e di diabete di tipo 2 nel nascituro (7).
Microbiota intestinale	Non è ancora stata chiarita la relazione tra specie batteriche intestinali e alterazioni metaboliche, ma recenti studi hanno suggerito che cambiamenti funzionali nel microbiota intestinale, valutati da campioni fecali, siano direttamente correlati con lo sviluppo del diabete di tipo (8).
Obesità viscerale	Si associa a una condizione di infiammazione cronica di basso grado e evidenze precliniche correlano l'infiammazione sistemica con la disfunzione β -cellulare. In particolare l'attivazione cronica del sistema immunitario innato e la secrezione di citochine da parte degli adipociti conducono a un processo di apoptosi β -cellulare, affine a quello autoimmune del diabete di tipo 1 (9).

4. Complicanze vasculopatiche del diabete

Le patologie endocrino-metaboliche si estrinsecano in danni sistemici multi-organo.

Nel diabete classicamente le complicanze si classificano in microvascolari e in macrovascolari.

Le complicanze microvascolari includono danni del sistema nervoso, del rene e della retina, mentre le complicanze macrovascolari includono patologie cardiovascolari (coronaropatia e sindromi coronariche acute, con conseguenti

angina e infarto miocardico, e scompenso cardiaco), stroke, arteriopatia periferica. L'arteriopatia periferica può causare ulcere che, se non curate, possono esitare in gangrena e rendere necessaria l'amputazione.

Il comune denominatore della fisiopatologia delle complicanze sistemiche del diabete è l'iperglicemia (Brownlee et al. 2004) (10), ed essa è il punto di partenza della seguente esposizione della loro patogenesi, che è complessa, ma di necessità, data la natura multifattoriale del diabete e la sua diffusione a carattere epidemico. Infatti le sue manifestazioni cliniche dipendono dalle caratteristiche e suscettibilità individuali, che rendono difficile risalire a un meccanismo patogenetico universale alla sua base.

4.1 Patogenesi delle complicanze microvascolari

La prima questione da porsi è: perché le cellule endoteliali della retina, le cellule mesangiali del glomerulo renale e i neuroni e le cellule di Schwann dei nervi periferici sono più vulnerabili all'iperglicemia rispetto alle altre cellule?

La risposta risiede nel fatto che la maggior parte delle cellule sono in grado di regolare l'ingresso di glucosio in relazione alla glicemia, mantenendo costante la concentrazione intracellulare di glucosio. Questo meccanismo è invece carente nelle cellule suscettibili al danno da iperglicemia.

Secondo *Brownlee et al.*, i meccanismi di danno determinati dall'aumentata concentrazione intracellulare di glucosio sono i seguenti quattro:

1. Via dei polioli (11): fisiologicamente l'enzima aldoso-reduttasi ha la funzione di ridurre aldeidi tossici in alcoli. Tuttavia, quando la concentrazione di glucosio intracellulare aumenta, diventa substrato di riduzione dell'enzima in sorbitolo, con ossidazione di NADPH, che viene consumato, in NADP⁺. Ne consegue deplezione di NADPH, che è cofattore essenziale per la riduzione del glutathione e conseguente diminuzione del glutathione ridotto, fondamentale antiossidante intracellulare. È quindi incrementata la suscettibilità allo stress ossidativo intracellulare.
2. Formazione dei prodotti finali di glicazione avanzata (*Advanced glycosilation products, AGEs*): alte concentrazioni di glucosio portano a una maggiore concentrazione di diidrossiacetone fosfato e di gliceraldeide 3-fosfato, composti instabili, che possono spontaneamente generare, tramite una reazione di

condensazione retroaldolica, composti reattivi noti come gliossali. I gliossali a loro volta sono molto reattivi per la presenza di due atomi di ossigeno insaturi, e reagiscono facilmente con residui amminici di proteine, in particolare con arginina, con conseguente formazione di AGEs.

Le cellule endoteliali, del mesangio e i macrofagi esprimono i recettori per gli AGEs, che, stimolati dalle proteine plasmatiche modificate, inducono la secrezione di citochine pro-infiammatorie e fattori di crescita, che contribuiscono al danno vascolare.

3. Attivazione della protein chinasi C (*Protein Kinase C, PKC*): l'aumento intracellulare di glucosio aumenta la quantità di diacilglicerolo, elemento critico di attivazione della PKC, che attiva vie di segnale diverse nelle differenti cellule.
 - Cellule endoteliali: riduce la produzione del vasodilatatore monossido di azoto (NO) e aumenta la produzione del vasocostrittore endotelina 1, aumenta la sintesi dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1 (PAI-1) riducendo la fibrinolisi con effetto pro-trombotico, aumenta la sintesi di VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF*) con effetto di incremento della permeabilità vascolare e della neoangiogenesi.
 - Cellule muscolari lisce: stimola l'attivazione dell'enzima fosfolipasi A2 citosolica e conseguentemente la contrazione muscolare.
 - Cellule del mesangio: stimola la produzione di TGF- β (*Transforming Growth Factor, TGF- β*) promuovendo la sintesi di matrice extracellulare, con possibile insorgenza di fibrosi.
 - Monociti: l'attivazione dei Toll-like-receptors stimola la produzione di citochine pro-infiammatorie e l'aumento dell'adesività.
4. Aumentato flusso attraverso la via delle esosammine: l'aumento della concentrazione intracellulare di glucosio determina, attraverso la glicolisi, aumento del glucosio 6 fosfato e quindi del fruttosio 6 fosfato, che viene convertito dall'enzima glutamina-fruttosio 6 fosfato amidotransferasi in glucosammina 6 fosfato e quindi UDP-N-acetil-glucosammina. Esso è substrato di un enzima transferasi, che catalizza l'aggiunta per legame O-glicosidico di UDP-N-acetil-glucosammina a un residuo di serina e treonina. Questo processo di glicosilazione entra in competizione con il processo di fosforilazione dei

medesimi residui amminoacidici, compresi quelli dei fattori di trascrizione, con conseguente alterazione della trascrizione genica.

Qual è l'elemento comune di queste teorie patogenetiche? Si è ipotizzato che questi meccanismi fossero pathways a valle di un evento a monte comune, ossia l'eccesso di produzione di ione superossido. L'elevata concentrazione di glucosio intracellulare ne comporta il suo maggiore metabolismo attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici, con conseguente maggiore produzione di NADH che alimenta la catena di trasporto mitocondriale degli elettroni. Il blocco del trasferimento di elettroni a livello del complesso III, ne causa la dislocazione al coenzima Q, che dona elettroni alla molecola di ossigeno, generando ione superossido. Lo ione superossido viene neutralizzato dall'enzima superossido-dismutasi mitocondriale (*manganese superoxide dismutase, Mn-SOD*) in $H_2O + O_2$.

Infine lo ione superossido inibisce l'enzima aldeide-3 fosfato-deidrogenasi (*glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase, GADPH*), che media l'attivazione delle quattro pathways:

- Formazione di AGEs: il gliceraldeide-3-fosfato è precursore dei gliosali
- Attivazione della PKC: il diacilglicerolo, che attiva PKC, è formato da gliceraldeide-3-fosfato
- Via delle esosammine: l'inibizione di GADPH inibisce i livelli del primo metabolita della glicolisi, ossia il glucosio
- Via dei polioli: l'incremento di glucosio determina aumento del flusso attraverso la via dei polioli

È stato osservato che l'inibizione con DNA antisense dell'attività di GADPH in cellule coltivate in 90 mg/dl di glucosio, porta all'incremento dell'attività delle quattro pathways, nella medesima entità di quanto osservato nelle cellule in condizioni di iperglicemia (12).

Lo ione superossido causa danni del DNA, attivando quindi l'enzima poli ADP-ribosio polimerasi (PARP), che scinde la molecola di NAD nelle sue due componenti, quali l'acido nicotinico e l'ADP-ribosio. GADPH è una proteina presente a livello citoplasmatico, ma anche intranucleare, dove ha un ruolo critico nella riparazione del DNA. La reazione con ADP-ribosio ne determina l'inibizione.

Il seguente schema (*figura 1*) sintetizza infine il meccanismo di danno iperglicemia-indotto, responsabile del danno ossidativo, alla base della patogenesi delle complicanze microvascolari.

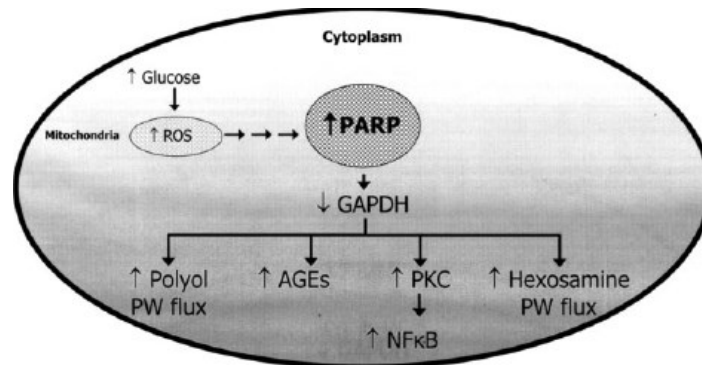


Figura 1: *meccanismo unificante del danno cellulare indotto dall'iperglicemia (10)*

4.2 Patogenesi delle complicanze macrovascolari

L'associazione tra iperglicemia e complicanze macrovascolari è presente, ma non è così forte: un valore di HbA1c di 9.5% si associa ad un rischio 10 volte superiore di complicanze microvascolari e 2 volte superiore di complicanze macrovascolari (10). La patogenesi delle complicanze macrovascolari è un punto di convergenza delle multiple comorbidità che epidemiologicamente il paziente diabetico presenta con maggiore frequenza rispetto alla popolazione generale.

L'incremento del tessuto adiposo viscerale instaura una complessa rete di segnali, in parte responsabile della compresenza di: diabete di tipo 2, dislipidemia, ipertensione, stato infiammatorio sistemico, aterosclerosi. Il diabete è comunque un fattore di rischio cardiovascolare indipendente (13).

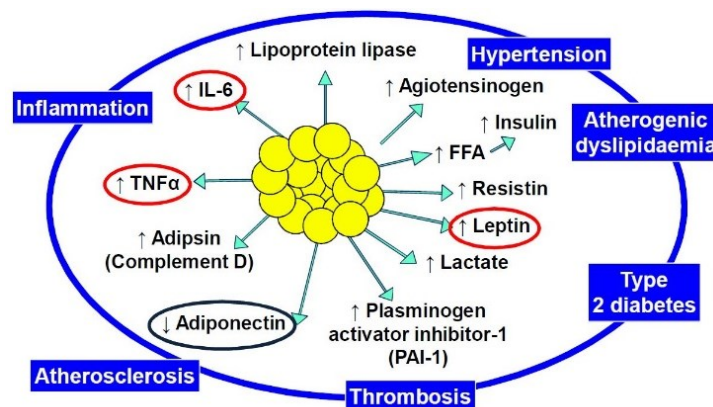


Figura 2: *rappresentazione dell'interconnessione molecolare delle multimorbidità del paziente con diabete di tipo 2 (13).*

5. Nefropatia diabetica

La complessità e variabilità della fisiopatologia del paziente diabetico si riflette nella fisiopatologia del danno renale.

L'idea di delineare un decorso del danno renale patogeneticamente unico, ricondotto all'affezione al diabete di tipo 2, che si riflette in alterazioni di markers clinici, sulla base dei quali intraprendere uno screening di individuazione del danno, è caduto, mentre rimane valido nei pazienti con diabete di tipo 1.

5.1 Istopatologia della nefropatia diabetica nel diabete di tipo 1

Nel paziente con diabete di tipo 1 sono state descritte le alterazioni istopatologiche renali, conseguenti all'iperglicemia e all'ipertensione glomerulare, e i tempi del loro sviluppo, tale da definire la storia naturale della nefropatia diabetica (Fioretto et al. 2007) (14).

Le lesioni morfologiche predominanti interessano il glomerulo, ma anche i tubuli renali, l'interstizio, le arteriole e i podociti.

L'ispessimento della membrana basale glomerulare (*Glomerular basement membrane, GBM*) e della membrana basale tubulare (*Tubular basement membrane, TBM*) si sviluppano precocemente, dopo 1.5-2.5 anni dalla diagnosi di DMT1, e parallelamente, suggerendo che le alterazioni emodinamiche non siano necessarie all'alterazione tubulare (15). Entrambe sono determinate dall'accumulo di matrice extracellulare, con incrementata deposizione di collagene di tipo IV e VI, laminina e fibronectina dovuta alla loro aumentata produzione, ridotta degradazione o entrambe. Tardivamente, dopo 5-7 anni dalla diagnosi di diabete, si sviluppa l'espansione mesangiale (16). L'espansione mesangiale diffusa, comunemente definita glomerulosclerosi diabetica, si può associare a lesioni nodulari, note come noduli di Kimmelstiel Wilson. Essi sono caratterizzati da accumulo di matrice centrale con nuclei a palizzata in periferia e compressione dei capillari glomerulari circostanti. Si definisce mesangiolisi la degenerazione focale delle cellule e della matrice mesangiale, che si associa a dilatazione cistica e aneurismatica del glomerulo coinvolto.

Le arteriole afferenti e efferenti vanno incontro a un processo di arteriosclerosi ialina, che può essere osservata anche a pochi anni dalla diagnosi di diabete. Si tratta di lesioni essudative in cui le proteine plasmatiche, soprattutto immunoglobuline, proteine del complemento, fibrinogeno e albumina rimpiazzano le cellule muscolari lisce. La gravità della ialinosi arteriolare è significativamente correlata con la percentuale di glomeruli sclerotici, suggerendo che queste lesioni vascolari potrebbero contribuire al danno ischemico glomerulare e quindi allo sviluppo di glomerulosclerosi diffusa. Lesioni simili, dal significato clinico ancora incerto, sono i 'hyaline caps' che si possono osservare nello spazio subendoteliale glomerulare e le 'capsular drops' lungo la superficie parietale della capsula di Bowman (17).

È stato ipotizzato che la compromissione del flusso intraglomerulare determinata dall'arteriosclerosi diabetica sia responsabile della mesangiolisi e che quest'ultima concorra allo sviluppo delle lesioni nodulari diabetiche (18).

La vasculosi polare è il risultato della neoangiogenesi attorno all'ilo vascolare del glomerulo. È stato ipotizzato che si tratti di un processo compensatorio di comunicazione tra arteriola afferente e capillari peritubulari, tale da ridurre l'ipertensione glomerulare (19).

Queste lesioni caratterizzano in maniera unica la glomerulopatia diabetica.

Sulla base delle lesioni glomerulari osservate, è stata stilata una stadiazione bioptica a significato prognostico della nefropatia diabetica di tipo 1 (*Tabella II*). Classi più elevate correlano in maniera significativa con elevati livelli di proteinuria, durata di diabete e bassa eGFR (*estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR*).

Tabella II: stadiazione istopatologica della glomerulopatia diabetica (20).

Classe	Descrizione	Criteri di inclusione
I	Si osservano in microscopia ottica alterazioni lievi o non specifiche, in microscopia elettronica ispessimento della membrana basale glomerulare	<i>GBM</i> >395 nm nel sesso femminile, <i>GBM</i> >430 nm nel sesso maschile in soggetti >9 anni
Ila	Moderata espansione mesangiale	Moderata* espansione mesangiale osservata in >25% del mesangio
I Ib	Severa espansione mesangiale	Severa* espansione mesangiale osservata in >25% del mesangio
III	Glomerulosclerosi (Kimmelstiel-Wilson lesion)	Almeno una lesione di Kimmestiel-Wilson
IV	Glomerulosclerosi diabetica avanzata	Glomerulosclerosi in >50% dei glomeruli totali

*La diagnosi è condotta su campione bioptico che contenga almeno 10 glomeruli. L'osservazione in microscopia ottica è eseguita su campioni con colorazione ematossilina-eosina, acido periodico di Schiff (PAS), colorazione tricromica di Masson e colorazione di Grocott-Gomori Metenamina argento (GMS). *In microscopia elettronica, l'espansione mesangiale è definita moderata (Ila) se lo spessore è inferiore all'area media del lume capillare, se superiore è definita severa (I Ib).*

L'analisi morfometrica in microscopia elettronica ha dimostrato l'importanza della biopsia renale nella valutazione della correlazione tra anomalie strutturali e funzione renale. È stato condotto uno studio su 124 pazienti affetti da diabete di tipo 1 sottoposti a biopsia renale, suddivisi in funzione dell'albuminuria in normoalbuminurici, microalbuminurici e macroalbuminurici (21). Da misurazioni eseguite in microscopia elettronica, è risultato che la frazione di glomerulo occupata dal mesangio V_v (*Mes/glom*) correla in maniera inversa con la velocità di filtrazione glomerulare (*Glomerular filtration rate, GFR*). Infatti l'espansione mesangiale deforma i capillari glomerulari, contribuendo alla riduzione della superficie capillare di filtrazione. Invece lo spessore della membrana basale glomerulare correla con la velocità di escrezione di albumina (*Albumin Excretion Rate, AER*) ($r=0.63$, $P < 0.001$), ma meno con il calo di GFR, suggerendone un ruolo nella patogenesi dell'albuminuria piuttosto che nelle alterazioni emodinamiche. Tuttavia V_v (*Mes/glom*) è il parametro morfometrico che meglio correla con la progressione di *AER* ($r=0.75$, $P < 0.001$).

Quindi nel paziente con diabete di tipo 1 è possibile ascrivere la storia naturale della nefropatia diabetica in un percorso di declino ideale (*Tabella III*). Si ha iniziale incremento funzionale della velocità di filtrazione glomerulare, indicativo della risposta adattativa alla perdita di nefroni, seguito da alterazioni strutturali che determinano albuminuria persistente e progressione del danno che esita in insufficienza renale.

Tabella III: stadiazione proposta della nefropatia di tipo 1 (22).

TAB. I - STADI DELLA NEFROPATIA NEL DIABETE TIPO I

	Stadio I dell'ipofiltrazione	Stadio II silente	Stadio III della nefropatia incipiente	Stadio IV della nefropatia clinica	Stadio V dell'uremia
Epoca di insorgenza	Alla diagnosi	2-3 anni	5-15 anni	10-30 anni	20-40 anni
Alterazioni funzionali	↑ GFR ↑ PA intra-glomerulare	= o ↑ GFR = o ↑ PA intragl. ↑ Albuminuria per stress o per cattivo controllo	= o ↓ GFR ↑ Albuminuria (20-200 µg/min)	↓ GFR ↑ Albuminuria > 200 µg/min)	↓ GFR (10 ml/min)
Alterazioni strutturali	↑ Vol. renale ↑ Vol. glomer. ↑ Superficie filtr. glomerulare	↑ Spessore MB ↑ Vol. mesangiale	Inizio della glomerulosclerosi	Glomerulosclerosi diffusa	Glomerulosclerosi globale

Evidenza la corrispondenza tra lesioni anatomico-patologiche e alterazioni funzionali e laboratoristiche, in relazione alla storia naturale della malattia.

Anche la giunzione tubulo-glomerulare e le componenti della barriera di ultrafiltrazione glomerulare sono interessate dal danno e tali lesioni contribuiscono alla patogenesi della malattia renale.

Le anomalie della giunzione tubulo-glomerulare sono manifestazioni tardive della malattia che si associano a sviluppo di proteinuria e concorrono alla progressione da insufficienza renale moderata a terminale (*end-stage renal disease, ESRD*) (18). I tubuli atrofizzano e possono distaccarsi dal glomerulo. La perdita della connessione tra lo spazio glomerulare urinario e il lume tubulare prossimale rende i glomeruli non funzionanti. Spesso le anomalie della giunzione tubulo-glomerulare si associano alla glomerulosclerosi focale segmentale e alle lesioni tubulari (23).

La barriera di ultrafiltrazione è composta da: endotelio glomerulare fenestrato, membrana basale glomerulare, fessure di filtrazione diaframmate formate dall'interdigitazione dei pedicelli. L'alterazione di uno o più di questi elementi conduce a proteinuria.

È stato osservato che il danno ossidativo indotto dall'iperglicemia determina nei podociti riarrangiamento citoscheletrico, de-differenziamento, apoptosi, distacco

dalla membrana basale glomerulare, esitando nell'alterazione delle fessure di filtrazione e associandosi allo sviluppo di glomerulosclerosi e delle anomalie della giunzione tubulo-glomerulare (24). In modelli murini è stato analizzato il ruolo della via di Wnt/ β -catenina nel differenziamento, mobilità, adesività e morte dei podociti (25). Nei topi, l'overespressione di tale via nei podociti si associa a espansione della membrana basale glomerulare, albuminuria e incrementata suscettibilità alle lesioni glomerulari, mimando il fenotipo precoce di malattia renale diabetica e suggerendone un ruolo patogenetico. La downregolazione della via incrementa invece la suscettibilità all'apoptosi. Lo studio del ruolo del danno dei podociti è importante per comprendere la patogenesi della malattia renale diabetica.

L'espansione mesangiale e l'ispessimento della membrana basale glomerulare sono presenti nella maggior parte dei pazienti affetti da diabete di tipo 1 che sviluppano nefropatia diabetica, clinicamente caratterizzata da declino di GFR e proteinuria (21). La glomerulosclerosi focale e globale, l'atrofia tubulare, l'espansione interstiziale, le anomalie della giunzione tubulo-glomerulare, ma anche la perdita della fenestrazione delle cellule endoteliali dei capillari glomerulari e il distacco dei podociti dalla membrana basale glomerulare, concorrono, in un processo autoalimentante, alla progressione del danno renale, mentre è stato suggerito che la malattia tubulo-interstiziale concorra in maniera predominante alla progressione da insufficienza renale moderata a insufficienza renale terminale (23).

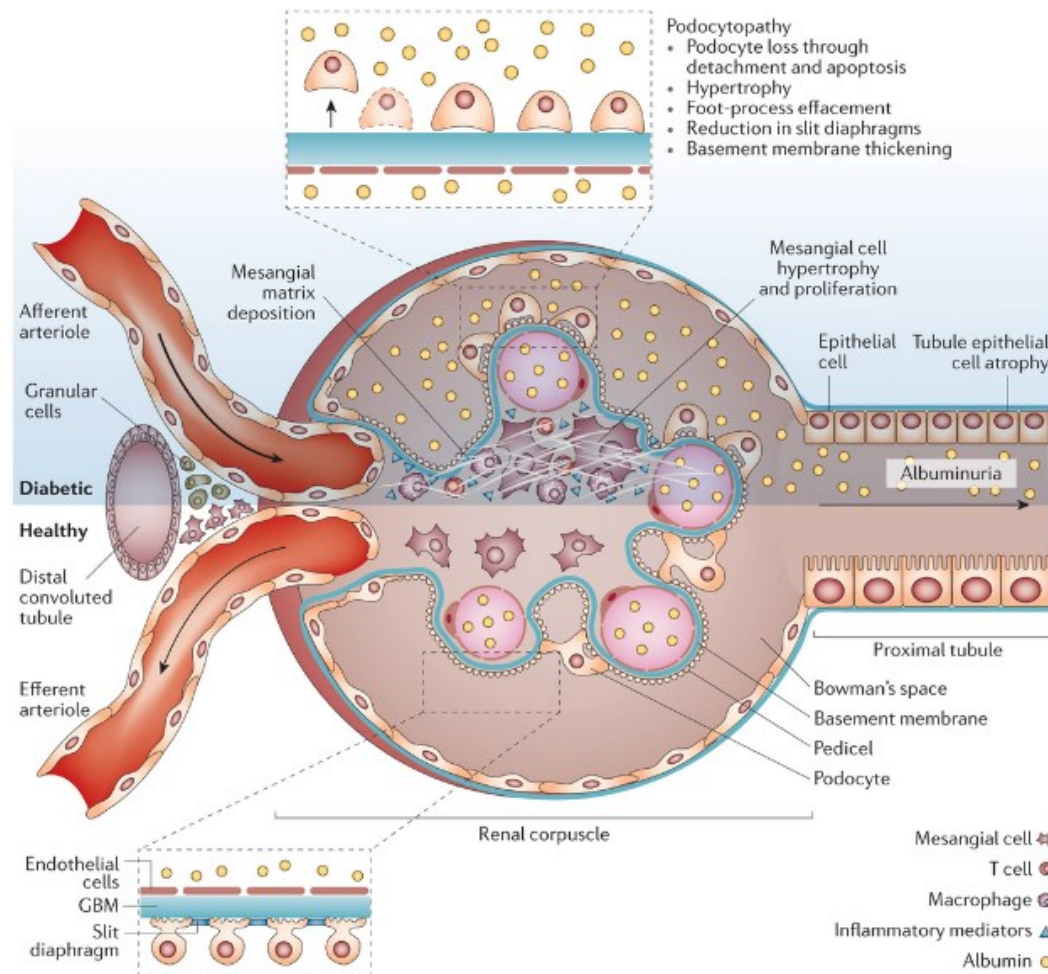


Figura 3: glomerulopatia diabetica. Illustrazione delle alterazioni morfologiche e funzionali del glomerulo caratteristiche della malattia renale nel diabete (49).

5.2 Regolazione tubulare della filtrazione glomerulare

Le alterazioni glomerulari che interessano le cellule mesangiali, la barriera di filtrazione e i podociti rappresentano il substrato patogenetico dello sviluppo della malattia renale nel diabete. Tuttavia è stata anche suggerita un'interconnessione tra le alterazioni emodinamiche glomerulari e le alterazioni tubulari che si osservano nelle fasi precoci della malattia renale diabetica, definita *'Ipotesi tubulare della filtrazione glomerulare'* (26).

Nelle fasi precoci di diabete, l'incrementata filtrazione glomerulare di glucosio innesca un processo maladattativo di ipertrofia e iperplasia dei tubuli corticali. Le vie molecolari che sostengono il processo sono interconnesse con la fibrosi, l'infiammazione, l'ipossia e l'apoptosi tubulo-interstiziali che precludono all'insufficienza renale nelle fasi più avanzate.

All'iperglicemia consegue l'incremento della filtrazione glomerulare di glucosio e l'aumentato riassorbimento di glucosio attraverso i trasportatori sodio-glucosio (*Sodium Glucose Transporter 1, SGLT1* e *Sodium Glucose Transporter, SGLT2*) espressi nel tubulo prossimale. Ne consegue aumentato riassorbimento di glucosio e di Na^+ , quindi riduzione della concentrazione tubulare di $[\text{Na}^+]$ a livello della macula densa e, per inibizione del *feedback* tubulo-glomerulare, vasodilatazione dell'arteriola afferente e incremento della pressione intraglomerulare con iperfiltrazione a livello del singolo nefrone.

Dal seguente grafico (*figura 4*) si osserva anche un *reset* della curva in alto a sinistra con attivazione del *feedback* per valori di filtrazione glomerulare superiori e di concentrazione tubulare di sodio $[\text{Na}^+]$ inferiori rispetto a quelli di un rene normale (27). Questo meccanismo è una possibile spiegazione dei difetti di vasocostrizione dell'arteriola afferente e conseguentemente dell'iperfiltrazione nelle fasi precoci del diabete.

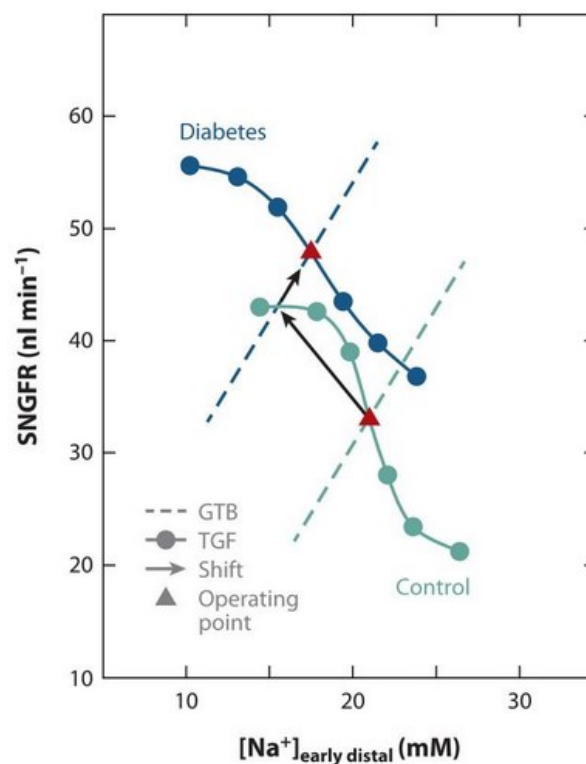


Figura 4: grafico che illustra il *resetting* del *feedback* tubulo-glomerulare (*tubuloglomerular feedback, TGF*). SNGFR è la filtrazione glomerulare per ogni singolo nefrone (*single-nephron GFR, SNGFR*), GTB (*Glomerular-tubular-balance, GTB*) rappresenta la dipendenza del riassorbimento tubulare dal carico glomerulare in relazione alla macula densa. Nel diabete si osserva uno *shift* con incremento di SNGFR per valori di $[\text{Na}^+]$ nel tubulo distale inferiori. Ne consegue lo *shift* degli 'operating point', punto di intersezione tra TGF e GTB (27).

5.3 Disfunzione endoteliale, microalbuminuria e patologia cardiovascolare nel diabete

La disfunzione endoteliale è un meccanismo patogenetico sia della glomerulosclerosi sia dell'aterosclerosi che può spiegare come la microalbuminuria sia un marker di rischio per patologie cardiovascolari aterosclerotiche (28). È stata osservata una correlazione epidemiologica e sperimentale positiva tra albuminuria e mortalità per tutte le cause, mortalità cardiovascolare, patologia cerebrovascolare e arteriopatia periferica. Tale correlazione è continua: il rischio è crescente per valori di albuminuria superiori indipendentemente dalla soglia di definizione della microalbuminuria.

Nel paziente diabetico il danno vascolare è determinato dall'azione degli AGEs e dall'incrementata produzione dello ione superossido, che antagonizzano l'attività vasodilatatrice di NO (6).

Lo studio *Heart Outcomes Prevention Evaluation* HOPE (29) ha mostrato che la presenza di albuminuria è un fattore di rischio cardiovascolare indipendente nei pazienti con e senza diabete e che il rischio cardiovascolare aumenta all'aumentare del valore di *uACR* (*urine albumin/creatinine ratio, uACR*). Sono stati reclutati pazienti di età ≥ 55 anni con patologia cardiovascolare o diabete (numero di pazienti senza diabete=5545, numero di pazienti con diabete=3498) e almeno un fattore di rischio cardiovascolare. La presenza di microalbuminuria al baseline incrementa il rischio relativo di un evento cardiovascolare maggiore di 1.83 volte (95% CI, 1.64-2.05; $P<.001$), di mortalità per tutte le cause di 2.09 volte (95% I.C 1.84 to 2.38) e di ospedalizzazione per scompenso cardiaco di 3.23 volte (95% CI, 2.54-4.10).

6. Malattia renale cronica nel diabete

Attualmente, circa il 40% dei casi di insufficienza renale terminale sono attribuiti al diabete di tipo 2 (89). Dal punto di vista clinico, nelle fasi iniziali l'insufficienza renale decorre asintomatica, manifestandosi solo in fase avanzata con astenia e anoressia. I segni clinici associati sono: ipertensione, edema delle estremità, complicanze microvascolari associate (retinopatia diabetica e neuropatia), segni clinici di uremia, encefalopatia, nausea, vomito e disgeusia, sanguinamento, mioclono e pericardite.

La classificazione della malattia renale cronica nel diabete (*Diabetic Kidney Disease, DKD*) è definita da (30):

- Albuminuria: si misura il rapporto albumina/creatinina (uACR) in un campione random di urine.
Si definisce microalbuminuria un valore ≥ 30 mg/g, macroalbuminuria un valore compreso tra 30 e 300 mg/g, proteinuria un valore ≥ 300 mg/g.
- Progressiva riduzione della velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR)

È una definizione applicata in un setting di paziente con diabete di tipo 1 di durata superiore ai 10 anni, in cui in >95% dei casi si associa a presenza di retinopatia diabetica.

La biopsia renale non è di norma necessaria.

Prognosis of CKD by GFR and albuminuria categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories		
				Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30–300 mg/g 3–30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/1.73 m ²) Description and range	G1	Normal or high	≥ 90			
	G2	Mildly decreased	60–89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45–59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30–44			
	G4	Severely decreased	15–29			
	G5	Kidney failure	<15			

Figura 5: categorie prognostiche di malattia renale cronica (Chronic Kidney Disease, CKD). Sono definite dalla combinazione dei valori di albuminuria e di eGFR (KDIGO 2012, 30). Verde: basso rischio di outcomes avversi o malattia renale cronica (kidney chronic disease, CKD) assente; giallo: moderato rischio; rosso: rischio elevato.

Tuttavia l'uso universale di questa strategia di screening di malattia renale implica che il processo patologico sottostante sia la glomerulosclerosi diabetica, ma l'evidenza suggerisce che questo assunto non sia più valido. Per esempio lo studio trasversale dalla *National Health and Nutrition Examination survey NHANES III* (31) ha analizzato la prevalenza di retinopatia e albuminuria nei pazienti diabetici

con CKD. All'interno di un campione di 9737 adulti >40 anni, 1180 pazienti avevano una precedente diagnosi di diabete di tipo 2, e di questi il 13% (n=171) aveva una malattia renale cronica definita da $GFR < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$. In questa popolazione, il 28% (n=58) aveva retinopatia, 45% (n=64) microalbuminuria e il 19% (n=47) macroalbuminuria. Nei soggetti diabetici con CKD, ma assenza di retinopatia e di albuminuria, si ipotizza un processo patologico sottostante differente dalla glomerulosclerosi diabetica. Infatti, secondo Parving et al. (32), mentre la presenza di retinopatia supporta la presenza di nefropatia diabetica, la sua assenza riduce la probabilità che l'albuminuria sia dovuta alla glomerulosclerosi diabetica.

6.1 Fenotipi della malattia renale cronica nel diabete

Tradizionalmente la malattia renale cronica nel diabete veniva quindi ascritta ad un fenotipo clinico uniforme, che è stato caratterizzato nei pazienti affetti da diabete di tipo 1. Tale fenotipo è definito da iniziale albuminuria seguita da progressivo declino di GFR, che conduce all'insufficienza renale e alla morte cardiovascolare (22).

Tuttavia nella pratica clinica è comunemente osservato un andamento differente della malattia renale nel diabete (33) e negli ultimi decenni sono stati descritti tre fenotipi aggiuntivi a quello classico di DKD, sulla base della combinazione delle caratteristiche di declino di eGFR e dell'albuminuria (*figura 6*). Tali fenotipi sono: la forma caratterizzata da regressione di albuminuria, la forma caratterizzata da rapido declino di GFR e la forma non-proteinurica/non-albuminurica.

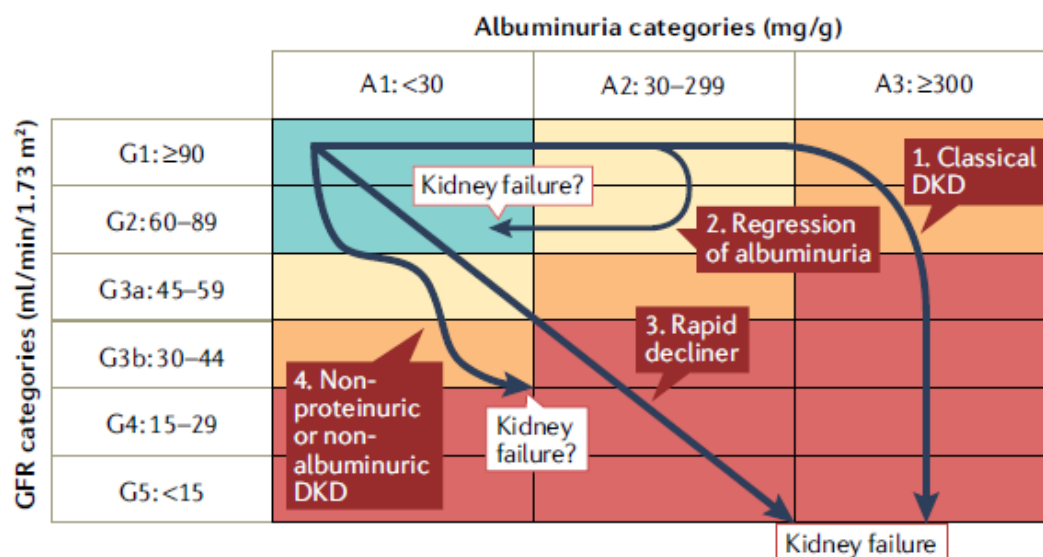


Figura 6: rappresentazione del decorso della malattia renale cronica nel diabete in relazione al declino di GFR e ai valori di uACR all'interno delle categorie di rischio (34). Tali andamenti descrivono i quattro fenotipi della DKD.

Tale eterogeneità è imputabile alla riduzione della prevalenza del fumo e all'incremento della prevalenza di comorbidità, dell'uso di interventi multifattoriali (ipoglicemizzanti, anti-ipertensivi e ipolipemizzanti) e di farmaci con effetti nefroprotettivi come gli inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone (*Renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS*) e gli inibitori del co-trasportatore sodio-glucosio di tipo 2 (*Sodium Glucose Transporter type 2, SGLT2*). Infatti la storia naturale del fenotipo classico di DKD è stata concettualizzata attraverso studi osservazionali condotti prima dell'introduzione di trattamenti ipoglicemizzanti e antipertensivi (34). Queste forme cliniche sottendono processi eziopatogenetici e lesioni anatomico-patologiche differenti e si associano a diverso rischio di outcomes renali e cardiovascolari, richiedono diversi markers clinici di valutazione della progressione del danno renale e interventi (34).

Il fenotipo caratterizzato da regressione di albuminuria si osserva nei pazienti diabetici in fase precoce di DKD sottoposti a corretto trattamento anti-ipertensivo e al controllo della glicemia con l'uso di inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone e inibitori del co-trasportatore sodio-glucosio di tipo 2. Uno studio su campioni bioptici durato 6 anni di reni di pazienti affetti da DKD (35) ha mostrato che una riduzione dei livelli di albuminuria si associa a cambiamenti precoci nella struttura glomerulare, quali ridotto ispessimento della membrana basale glomerulare, della glomerulosclerosi e del volume della matrice mesangiale; tuttavia questi cambiamenti non correlano con variazioni di GFR. In questo studio

però non sono state osservate associazioni tra cambiamenti strutturali renali e trattamento con inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone. Invece, in un altro studio, condotto in pazienti affetti da diabete di tipo 1 e in stadio precoce o avanzato di DKD (36), 10 anni di normoglicemia dopo trapianto di pancreas ha ridotto i livelli di albuminuria, l'ispessimento della membrana basale glomerulare e l'espansione della matrice mesangiale e determinato la clearance delle lesioni nodulari. Questi risultati dimostrano la reversibilità delle lesioni renali nella malattia renale diabetica e gli effetti benefici del mantenimento della normoglicemia.

Il fenotipo caratterizzato da rapido declino di eGFR è definito dal declino sostenuto di eGFR ≥ 5 ml/min/1.73 m²/ anno (37). Negli individui sani si stima un calo annuale di 1 ml/min/1.73 m²/ anno, a causa di cambiamenti strutturali età-correlati, mentre il valore mediano di declino nei pazienti affetti da diabete di tipo 2 è compreso tra 4 e 1.5 ml/min/1.73 m²/ anno. La prevalenza riferita di questo fenotipo è variabile da studio a studio: uno studio osservazionale su 1.955 individui con diabete di tipo 2 con o senza albuminuria, oltre 3 anni, ha riportato una prevalenza del 14% (38). Sono stati condotti studi che hanno indagato in questi pazienti i cambiamenti istopatologici e hanno mostrato un indice di ialinosi arteriolare $>3\%$ / anno, superiore rispetto a quanto osservato negli altri fenotipi (39). Altri studi hanno suggerito che la presenza di lesioni nodulari e mesangiolisi siano fattori di rischio potenziale per il rapido declino di eGFR (40) e che la presenza di fibrosi interstiziale e atrofia tubulare potrebbe predire un rapido declino dell'eGFR ($>14.9\%$ / anno) in pazienti con diabete di tipo 2 e proteinuria (41).

Tuttavia, sono necessarie ulteriori evidenze da studi su campioni biotipici per chiarire le associazioni tra questi cambiamenti istopatologici e il rapido declino dell'eGFR e se questi correlano con l'incremento del rapporto albumina urinaria e creatinina urinaria (uACR).

The second Joslin Kidney Study on the Natural History of Microalbuminuria (42) ha osservato 286 individui con diabete di tipo 1 e normoalbuminuria per 4-10 anni e ha riportato che 10% dei pazienti ha esperito l'accelerazione del declino dell'eGFR ($>3.3\%$ / anno) prima dell'esordio della microalbuminuria. Secondo questo studio, quindi, lo sviluppo di microalbuminuria o macroalbuminuria non è condizione necessaria per il rapido declino dell'eGFR.

Lo studio ADVANCE (43) è stato un trial clinico randomizzato multicentrico che ha valutato gli effetti della terapia anti-ipertensiva e ipoglicemizzante sugli outcomes vascolari in 11.140 pazienti con DMT2, di >55 anni ad elevato rischio cardiovascolare. Lo studio ADVANCE-ON è lo studio di follow up post-trial del trial ADVANCE che ha indagato la relazione tra calo annuale di eGFR e rischio cardiovascolare, in 8.879 di questi pazienti, le cui misurazioni di eGFR sono state ripetute 4, 12, 34, 36 mesi dopo la randomizzazione, eseguite al fine di evitare il bias dell'effetto emodinamico di calo in acuto della GFR determinato dagli inibitori del RAAS. In funzione dell'entità dello *slope* annuale di eGFR (110), i pazienti sono stati suddivisi in quartili.

L'outcome primario dello studio ADVANCE-ON era un outcome composto di eventi renali maggiori (necessità di dialisi o trapianto di rene o morte per cause renali), eventi macrovascolari maggiori (infarto miocardico, stroke fatale e non fatale o altre cause di morte cardiovascolare) e mortalità per ogni causa, che è stato riscontrato in 2221 pazienti (25%).

I pazienti con *slope* annuale di eGFR maggiore (quartile inferiore, <-1.63 ml/min/1.73m²/anno) presentavano un rischio significativamente superiore di sviluppare l'outcome primario (*Hazard Ratio* HR 1.30 [95% CI 1.17, 1.43] $p<0.001$) rispetto ai pazienti con eGFR stabile (quartile intermedio, -1.63 to 0.33). Tra i pazienti con *slope* annuale di eGFR di -3 ml/min/1.73m²/anno, gli HR erano 1.37 (95% CI 1.20, 1.56) per l'outcome primario, 6.14 (3.60, 10.49) per gli eventi renali maggiori, 1.25 (1.06, 1.48) per gli eventi macrovascolari e 1.54 (1.31, 1.81) per tutte le cause di morte. Lo *slope* annuale di eGFR era più ripido nei pazienti più anziani, con livelli di uACR e Hb1Ac maggiori e con livelli di HDL minori.

Il fenotipo di DKD non proteinurico, caratterizzato da assenza di macroalbuminuria, e di DKD non microalbuminurico, caratterizzato da assenza di microalbuminuria, si osserva nel 20% dei pazienti affetti da malattia renale cronica con diabete di tipo 1 e nel 40% di quelli con diabete di tipo 2 (44), dopo aver escluso pazienti con storia di episodi di insufficienza renale acuta, di stenosi dell'arteria renale, individuata con studi di imaging, o malattie renali non diabetiche dimostrate dalla biopsia.

Da diversi studi condotti, le caratteristiche istopatologiche osservate nelle biopsie renali dei pazienti con questo fenotipo sono risultate discordanti. Infatti in una

coorte di pazienti affetti da diabete sia di tipo 1 che di tipo 2 è stata osservata una bassa frequenza delle lesioni caratteristiche della nefropatia diabetica e una prevalenza di nefroangiosclerosi ipertensiva, caratterizzata da glomerulosclerosi, fibrosi interstiziale, atrofia tubulare e arteriosclerosi (45), mentre invece in un'altra coorte di pazienti con diabete di tipo 2 e normoalbuminuria, i pazienti con ridotta GFR presentavano caratteristiche lesioni nodulari, tubulo-interstiziali e vascolari (46). Le differenze riscontrate sono probabilmente dovute a un *bias* di selezione, in particolare riguardante la prevalenza dei fattori di rischio e quindi lo sviluppo di nefroangiosclerosi ipertensiva. Ulteriori studi sono necessari.

La correlazione tra fenotipo non-albuminurico e rischio cardiovascolare è stato indagato nello studio *RIACE (for the Renal Insufficiency And Cardiovascular Events Study Group, RIACE)* (47). Si tratta di uno studio osservazionale condotto su 15.773 pazienti affetti da DMT2, classificati in base alle caratteristiche della funzionalità renale: pazienti senza DKD, con sola albuminuria, con sola riduzione di eGFR o con entrambe albuminuria e ridotta eGFR. È stato osservato che il rischio di mortalità, aggiustato per i confondenti, era minore nei pazienti senza DKD, maggiore nei pazienti con entrambe albuminuria e riduzione di eGFR (HR 2.08 [95% CI 1.88, 2.30]), simile nei pazienti con uno dei due elementi (pazienti con albuminuria HR 1.45 [1.33, 1.58], pazienti con ridotta eGFR (1.58 [1.43, 1.75])). I risultati ottenuti erano simili dopo stratificazione per sesso, età e precedente evento cardiovascolare. In pazienti normoalbuminurici con eGFR < 45 ml/min/1.73 m² il rischio di mortalità era superiore rispetto a quello dei pazienti microalbuminurici e simile a quello dei pazienti macroalbuminurici con eGFR preservata.

In tutti i fenotipi, la prevalenza di patologia cardiovascolare e i livelli inferiori di HDL erano i principali elementi a correlare con la mortalità. Le conseguenze microvascolari all'esposizione alla glicemia, per esempio la retinopatia, correlavano con la mortalità solo negli individui con fenotipo albuminurico.

L'associazione tra DKD non albuminurica e retinopatia diabetica è debole, con i livelli di Hb1Ac è assente, suggerendo che sottenda come processo patologico la macroangiopatia e i fattori di rischio cardiovascolari (ipertensione, dislipidemia, obesità centrale, e invecchiamento) (48).

6.2 Fattori di rischio per lo sviluppo della nefropatia nel paziente diabetico

Scarso controllo della glicemia, ipertensione, dislipidemia, obesità, sindrome metabolica e fumo sono fattori di rischio acquisiti riconosciuti nello sviluppo e nella progressione della malattia renale cronica del diabete (*tabella IV*) (49).

Tabella IV: elenco dei principali fattori di rischio modificabili riconosciuti della malattia renale cronica nel diabete (49).

Fattori di rischio non modificabili	
Iperglicemia	Determinante delle complicanze microvascolari, è il fattore di rischio più importante. L'incidenza di microalbuminuria correla con i livelli di HbA1c (50).
Ipertensione	L'importanza dell'ipertensione nella patogenesi del danno renale è in parte spiegata dalle alterazioni emodinamiche in un contesto di compromessa autoregolazione renale (51)
Dislipidemia	Elevati livelli di trigliceridi, VLDL, apolipoproteina B-100 o bassi livelli di HDL sono fattori di rischio indipendenti di sviluppo di insufficienza renale cronica sia nei pazienti con diabete di tipo 1 che nei pazienti con diabete di tipo 2 (52)
Obesità	Si associa ai fattori di rischio maggiori di insufficienza renale cronica, inclusi dislipidemia, pressione arteriosa, controllo della glicemia, insulino-resistenza; ma è anche fattore di rischio indipendente. I danni renali diretti sono determinati dalle alterazioni emodinamiche glomerulari, l'aumentato tono simpatico, l'ipertensione, l'infiammazione sistemica, la disfunzione endoteliale, l'alterata espressione dei fattori di crescita e la compromissione renale direttamente determinata dal grasso viscerale. La glomerulopatia-obesità associata è un'entità fisiopatologica ampiamente descritta, indipendente dal diabete (53).
Insulino-resistenza	Fattore di rischio indipendente da glicemia, pressione arteriosa, peso corporeo e livelli lipidici di sviluppo dell'insufficienza renale cronica (54). Interventi insulino-sensibilizzanti, per es. terapia con tiazolidinedioni, esercizio fisico e perdita ponderale, riducono l'albuminuria. L'insulino-resistenza dei podociti (24, 55) conduce a progressivo danno glomerulare. Inoltre, l'iperinsulinemia compensatoria potrebbe contribuire ad un'anomala vasoreattività, angiogenesi, fibrogenesi e ad altri meccanismi implicati nella progressione del danno renale (56) e nell'aterogenesi (57).
Fumo	L'elevato stress ossidativo contribuisce alle complicanze microvascolari. È stato osservato il contributo del fumo all'espansione della membrana basale glomerulare, all'espansione mesangiale e alla progressione della glomerulosclerosi e della fibrosi interstiziale (58)

Fattori di rischio non modificabili riconosciuti nella patogenesi della DKD sono: invecchiamento, età di esordio precoce della malattia (59), lunga storia di malattia, fattori genetici (60), etnia, storia familiare di CKD, di diabete di tipo 2, di ipertensione o di insulino-resistenza, ritardata crescita intrauterina, diabete gestazionale o esposizione a ambiente intrauterino iperglicemico (61).

6.3 Modelli predittivi di outcomes renali nel lungo termine

Noti i fattori di rischio di progressione della malattia renale, essi possono essere usati per disegnare modelli predittivi di progressione della malattia renale cronica a insufficienza renale da applicare in pazienti nelle fasi precoci di CKD ad elevato rischio di riduzione della funzionalità renale e di sviluppo di insufficienza renale.

L'equazione di rischio di sviluppo di insufficienza renale (*kidney failure risk equation, KFRE*) di Tangri et al. (62), usa dati demografici e di laboratorio, quali età, sesso, eGFR e uACR, per predire nei pazienti con eGFR <60 ml/min/1.73 m² il rischio di progressione di CKD a insufficienza renale. L'insufficienza renale è definita dalla necessità di terapia sostitutiva, outcome maggiore nei trials clinici di pazienti affetti da CKD avanzata. eGFR è calcolata con equazione CDK-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration, CDK-EPI*) (63).

Nei pazienti con eGFR_≥60 ml/min/1.73 m² il rischio di sviluppo di CKD nel breve e medio termine è molto basso. L'outcome surrogato usato nei trials clinici, approvato dalla *US Food and Drug Administration* e *European Medicines Agency*, è il declino di eGFR del 40% (110). Tuttavia attualmente non sono diffusi modelli predittivi di declino della eGFR del 40% applicabili alla popolazione generale (64, 65).

È stata condotta una metanalisi su oltre 1 milione di pazienti (n=1,621,817) di 43 coorti in 23 paesi (66), con valori di albuminuria e di creatinina noti al baseline, osservati dal 2000 al 2019, allo scopo di disegnare un modello predittivo, per pazienti con eGFR_≥60 ml/min/1.73m², ma uACR>30mg/g e elevato rischio cardiovascolare, di declino della eGFR_≥40% o di sviluppo di insufficienza renale in un periodo di tempo di 2-3 anni (*Morgan, Tangri et al. 2022*). Sono stati valutati anche gli outcomes composti: declino di eGFR_≥30% o insufficienza renale e declino di eGFR_≥50% o insufficienza renale. Tale modello aggiunge all'equazione

di rischio *KFRE*: valori di pressione sistolica, uso di farmaci anti-ipertensivi, storia di scompenso cardiaco, coronaropatia, fibrillazione atriale, storia di fumo, BMI. Le analisi sono state stratificate in base a presenza o assenza di diabete. Nei pazienti con diabete sono stati considerati i livelli di HbA1c, uso di insulina e di farmaci orali per il diabete.

Nei pazienti con $eGFR > 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ il modello predittivo di rischio calcolato con equazione *KFRE* presentava la C-statistica mediana di 0.704 (0.681, 0.738) nella popolazione generale e di 0.750 (0.719, 0.758) nella popolazione con diabete. L'incorporazione delle altre variabili porta a incremento della C statistica mediana a 0.740 (0.717, 0.763) nella popolazione senza diabete, a 0.774 (0.753, 0.782) nella popolazione con diabete.

Il valore di pressione sistolica, storia di scompenso cardiaco, fumo e, nella corte di pazienti diabetici, i valori di HbA1c e uso di insulina, si sono rilevati fortemente associati all'outcome. Il fattore di rischio più consistente in tutti i modelli è l'albuminuria.

Tuttavia limiti importanti di questo modello sono la modesta associazione tra endpoint surrogato e outcome clinico (relative hazard 0.83–1.03 per $5 \text{ mL/min/1.73 m}^2$) e il fatto che la maggior parte dei pazienti con CKD precoce non sviluppa insufficienza renale

Sono necessari nuovi studi per migliorare la predittività dell'equazione.

7. **Terapia farmacologica**

I pazienti con diabete e malattia renale cronica devono essere trattati con una strategia olistica mirata alla riduzione della progressione della malattia renale e del rischio cardiovascolare.

Questo approccio non può prescindere da cambiamenti dello stile di vita, che includano dieta, esercizio fisico, cessazione del fumo e calo ponderale (67).

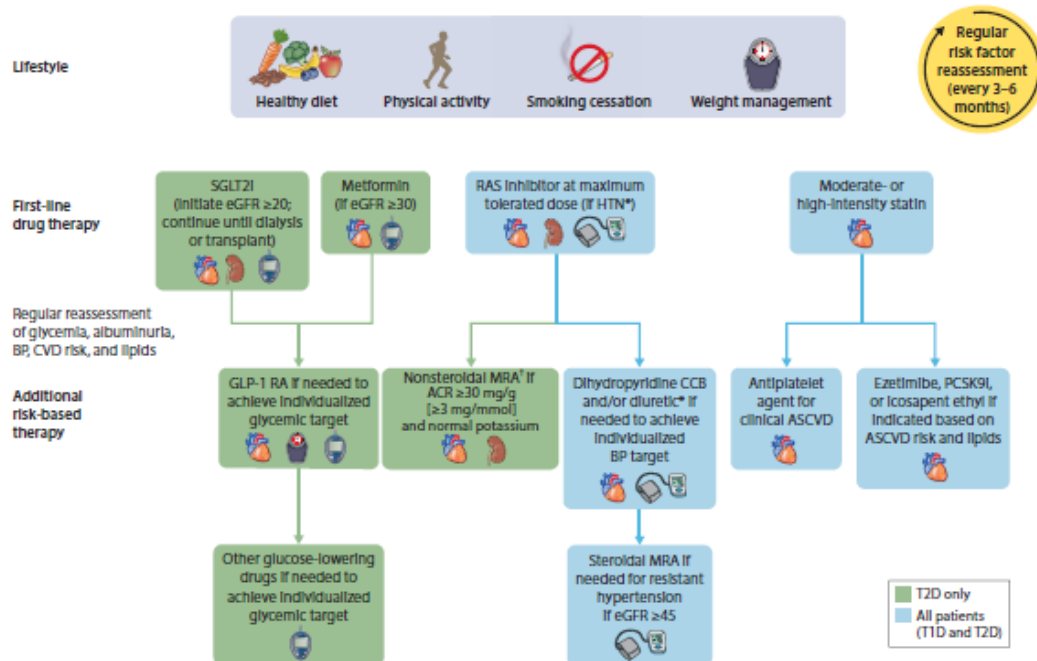


Figura 7: algoritmo di cura del paziente con diabete di tipo 2 (linee guida KDIGO 2022) (67).

La strategia terapeutica di prima linea raccomanda la combinazione di SGLT2 inibitori ($eGFR \geq 20$ ml/min/1.73 m²) e metformina (se $eGFR \geq 30$ ml/min/1.73 m²). La classe di raccomandazione è 1A.

In pazienti con ipertensione e albuminuria in prima linea è raccomandato l'uso di inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone, ossia gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (*angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEi*) e gli antagonisti del recettore per l'angiotensina II o sartani (*angiotensin II receptor blocker, ARB*) alla massima dose tollerata, con monitoraggio a 2-4 settimane dei valori di potassio, per il rischio di iperkaliemia, e dei livelli plasmatici di creatinina. Un incremento > 30% di creatinemia deve far sospettare una stenosi dell'arteria renale. La classe di raccomandazione è 1B.

In *add-on therapy* è suggerito l'uso dell'antagonista dei recettori mineralcorticoidi non steroideo finerenone ($eGFR \geq 25$ ml/min/1.73 m²), in cui è dimostrato il beneficio renale e cardiovascolare nei pazienti con diabete di tipo 2, normokaliemia, persistenza di albuminuria (≥ 30 mg/g) nonostante l'uso di inibitori del RAAS e di SGLT2 inibitori. La classe di raccomandazione è 2A.

Nei pazienti con diabete di tipo 2 e malattia renale, in cui non è raggiunto il target di glicemia nonostante la combinazione di metformina e inibitori di SGLT2, sono

indicati in *add-on therapy* i *Glucagon-like peptide-1 receptor agonists (GLP1RA)*. La classe di raccomandazione è 1B.

7.1 Inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone nella malattia renale diabetica

L'uso di sartani è supportato da forti evidenze.

Lo studio *Irbesartan Diabetic Nephropathy IDNT* (68) è un trial clinico multicentrico randomizzato in doppio cieco eseguito su 1715 pazienti con DKD e ipertensione randomizzati in tre bracci di trattamento con 300 mg al giorno di irbesartan, 10 mg al giorno amlodipina e placebo, seguiti per una media di 2.6 anni. I criteri di inclusione erano: proteinuria > 900 mg/24h, valori di creatinina sierica compresi tra 1 e 3 mg/dl nelle donne e 1.2 e 3 mg/dl negli uomini, valori pressori $\geq 135/85$ mmHg

L'endpoint primario combinato era il raddoppiamento della creatinina sierica, sviluppo di insufficienza renale e morte. L'uso di Irbesartan è stato associato ad una riduzione del rischio di: sviluppo dell'endpoint del 20% rispetto al gruppo placebo ($p=0.02$) e del 23% ($p=0.006$) rispetto al gruppo trattato con amlodipina; raddoppiamento della creatininemia rispettivamente del 33% ($p=0.003$) e del 37% ($p<0.001$), di ESRD del 23% rispetto ad entrambi i gruppi ($p=0.07$).

Lo studio ha concluso la superiorità dell'uso di irbesartan contro la progressione della nefropatia in pazienti con diabete di tipo 2, non spiegabile dall'entità di riduzione dei valori pressori.

Il trial clinico randomizzato IRMA-2 (69) ha valutato gli effetti nefroprotettivi di Irbesartan in pazienti con microalbuminuria, INNOVATION (70) gli effetti nefroprotettivi di Telmisartan in pazienti normotesi, RENAAL (71) gli effetti nefroprotettivi di Losartan in pazienti con macroalbuminuria. Le conclusioni sono in linea con quelle dello studio IDTN.

Pazienti con malattia renale cronica, diabete, scompenso cardiaco congestizio, età avanzata e in politerapia farmacologica presentano maggiore rischio di sviluppare iperkaliemia in conseguenza all'uso di farmaci inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone. In caso di iperkaliemia, la sospensione del farmaco deve essere l'ultima scelta, mentre devono essere adottate strategie ipokaliemizzanti, quali ridotto introito alimentare, revisione della politerapia farmacologica,

trattamento con diuretici risparmiatori di potassio in pazienti ipervolemici, bicarbonato di sodio per via orale in pazienti con acidosi metabolica o binders come il patiromer o il sodio zirconio ciclosilicato (67).

7.2 SGLT2 inibitori nella malattia renale diabetica

L'evidenza ha confermato gli effetti nefroprotettivi e cardioprotettivi degli SGLT2 inibitori nei pazienti con diabete di tipo 2 e malattia renale cronica (*tabella V*).

Tabella V: elenco dei trials clinici che hanno dimostrato l'efficacia degli SGLT2 inibitori nei relativi outcomes.

Trial clinico	Outcomes del trial
EMPA-REG (72), CANVAS (73), DECLARE-TIMI 28 (74)	Tre larghi trials clinici randomizzati con outcome primario cardiovascolare e outcome secondario renale hanno dimostrato l'efficacia degli SGLT2 inibitori
VERTIS CV (75)	Trial clinico che ha concluso la non inferiorità degli SGLT2 inibitori negli outcomes cardiovascolari, incluso nei sottogruppi con malattia renale cronica.
CREDENCE (76), DAPA-CKD (77)	Due trials clinici randomizzati condotti in una popolazione con CKD con e senza DMT2 con outcome primario renale e outcomes secondari cardiovascolari
EMPA-Kidney (78)	Trial clinico condotto su una popolazione affetta da CKD con valutazione di un outcome composito cardio-renale, interrotta precocemente per evidenza di efficacia
SCORED (79)	Trial clinico che ha reclutato esclusivamente pazienti con diabete e CKD valutando un outcome primario cardiovascolare
DAPA-HF (80), EMPEROR-Reduced (81)	Due trials clinici che hanno reclutato pazienti con scompenso cardiaco e frazione di eiezione ridotta con e senza DMT2, stratificati per eGFR <60 ml/min/1.73 m ² e ≥60 ml/min/1.73 m ²
EMPEROR-Preserved (82)	Trial clinico che ha reclutato pazienti con scompenso cardiaco e frazione di eiezione preservata con e senza DMT2
SOLOIST-WHF (83)	Trial clinico che ha reclutato pazienti ospedalizzati per scompenso cardiaco acuto con e senza frazione di eiezione ridotta

Gli SGLT2 inibitori inibiscono il trasportatore Na^+ /glucosio SGLT2 espresso nel tubulo prossimale con conseguente riduzione della glicemia e diuresi osmotica. Gli effetti di riduzione della HbA1c, abbassamento della pressione sistolica e calo ponderale sono modesti (84) e gli effetti cardioprotettivi e nefroprotettivi sembrano indipendenti dalla riduzione della glicemia e suggeriscono altri meccanismi, quali la riduzione della pressione intraglomerulare e dell'iperfiltrazione del singolo nefrone. Infatti la riduzione del riassorbimento di Na^+ e glucosio nel tubulo prossimale, comporta l'aumento della concentrazione tubulare di $[\text{Na}^+]$ a livello della macula densa e, riattivando il *feedback* tubulo-glomerulare, stimola la vasocostrizione dell'arteriola afferente. In questo modo viene ridotta la velocità di filtrazione del singolo nefrone, correggendo l'iperfiltrazione.

L'effetto emodinamico di riduzione dell'iperfiltrazione glomerulare degli SGLT2 inibitori a livello dell'arteriola afferente è sinergico a quello esercitato dagli inibitori del RAAS che riducono la resistenza dell'arteriola efferente, per contrasto dell'effetto vasocostrittivo di angiotensina II sui recettori AT1, cui l'arteriola efferente è più sensibile (85).

Lo studio CREDENCE (76) è stato il primo trial clinico randomizzato condotto esclusivamente su pazienti con DMT2 e DKD albuminurica ad alto rischio di insufficienza renale (eGFR compresa tra 30 e 90 ml/min/1.73 m² e uACR compresa tra 300 e 5000) e elevato rischio cardiovascolare, con outcome primario composto di sviluppo di malattia renale terminale (dialisi, trapianto o eGFR < 15 ml/min/1.73 m²), raddoppio della creatinemia o morte per cause renali o cardiovascolari. Era richiesto che ogni paziente fosse in terapia con la dose massima tollerata di un farmaco inibitore del RAAS da quattro settimane prima della randomizzazione. Sono stati reclutati 4401 pazienti randomizzati in un gruppo che ha ricevuto 100 mg di canaglifozina e in un gruppo placebo. Il follow up è durato 2.62 anni. Il rischio relativo di sviluppo dell'outcome primario era inferiore del 30% nei pazienti in terapia con canaglifozina rispetto al gruppo placebo, il tasso di eventi è stato rispettivamente di 43.2 rispetto a 61.2 per 1000 pazienti/anno (HR=0.70; intervallo di confidenza 95%, 0.59-0.82; p=0.00001) e il rischio relativo di sviluppo di ESRD era <32% (HR=0.61, IC 95%, 0.54-0.86; p=0.002). E' stato inoltre mostrato nel gruppo sottoposto a canaglifozina un minore rischio di morte cardiovascolare, infarto miocardico o stroke (hazard ratio, 0.80; 95% CI, 0.67-0.95; P = 0.01) e

ospedalizzazione per scompenso cardiaco (hazard ratio, 0.61; 95% CI, 0.47-0.80; $P < 0.001$), in linea con lo studio CANVAS.

La significatività clinica del beneficio apportata dalla canaglifozina è enfatizzata dall'assunzione al basale di inibitori del RAAS, che fino ad allora erano l'unico farmaco approvato nei pazienti con DMT2 per effetto nefroprotettivo.

L'effetto di riattivazione del *feedback* tubulo-glomerulare spiega il motivo per cui nello studio CREDENCE (76) si sia osservata, durante le prime tre settimane, un'importante riduzione della eGFR nei pazienti trattati con canaglifozina rispetto al placebo (-3.72 ± 0.25 vs. -0.55 ± 0.25 ml/min/1.73 m²), ma poi il successivo declino della eGFR sia stato inferiore, come atteso (-1.85 ± 0.13 vs. -4.59 ± 0.13 ml/min/1.73 m²/ anno).

7.3 Antagonisti dei recettori mineralcorticoidi

La raccomandazione dell'uso del finerenone in seconda linea in *add-on therapy* agli inibitori del RAAS e SGLT2 inibitori deriva dall'evidenza fornita da due trials clinici randomizzati, FIDELIO (86) e FIGARO-DKD (87), che hanno dimostrato l'efficacia di finerenone nel rallentare la progressiva riduzione della eGFR e nel ridurre il rischio cardiovascolare tra i pazienti con DMT2 e albuminuria.

Dal punto di vista farmacodinamico, è stato osservato che in pazienti in terapia in cronico con gli inibitori del RAAS, i livelli di aldosterone inizialmente scendono per poi aumentare nel lungo termine, fenomeno noto come *aldosterone escape* (88). Questo suggerisce un margine di azione per inibitori dei recettori dei mineralcorticoidi.

Gli antagonisti dei recettori mineralcorticoidi steroidei spironolattone e eplerenone hanno benefici cardiovascolari dimostrati nei pazienti con scompenso cardiaco (livello di evidenza IA) e sono farmaci di prima linea nel trattamento dell'iperaldosteronismo e dell'ipertensione refrattaria (89, 90). I recettori degli antagonisti mineralcorticoidi steroidei riducono l'albuminuria (91), tuttavia non sono stati condotti trials adeguati di valutazione dell'efficacia in outcomes renali, noti il rischio di iperkaliemia e di danno renale acuto nelle popolazioni ad alto rischio (92).

È stato dimostrato che osservato che i nuovi antagonisti dei recettori mineralcorticoidi non steroidei sono efficaci nel ridurre l'albuminuria a fronte di un minor rischio di iperkaliemia (93), per cui sono stati condotti due ampi trials clinici.

Il trial clinico FIDELIO-DKD (86) è stato condotto su 5734 pazienti con CDK e DMT2 secondo i seguenti criteri:

- uACR compresa tra 30 e 300 mg/g e retinopatia, eGFR compresa tra 25 e 60 ml/min/1.73 m²
- uACR compresa tra 300 e 5000 mg/g e eGFR compresa tra 25-75 ml/min/1.73 m²

Tutti i partecipanti erano trattati con RAAS inibitori. I livelli di [K⁺] dovevano essere <4.8 mmol/l.

Sono stati randomizzati in due bracci, uno in terapia con finerenone e l'altro con placebo.

L'outcome primario composito era l'insufficienza renale, una riduzione del 40% di eGFR rispetto al baseline o la morte per cause renali. L'outcome secondario composito era morte per cause cardiovascolari, infarto miocardico non fatale, stroke non fatale o ospedalizzazione per scompenso cardiaco.

In un tempo di follow up di 2.6 anni, il 17.8% dei pazienti trattati con finerenone ha sviluppato l'outcome primario rispetto al 21.1% dei pazienti sottoposti a placebo (hazard ratio, 0.82; 95% confidence interval [CI], 0.73-0.93; P = 0.001), mentre, per quanto riguarda l'outcome secondario, è stato sviluppato rispettivamente nel 13% e nel 14.8 % (hazard ratio, 0.86; 95% CI, 0.75-0.99; P = 0.03). L'incidenza di effetti collaterali è stata simile nei due gruppi, tuttavia il tasso di pazienti che ha sospeso la terapia per iperkaliemia è stata rispettivamente del 2.2% e dello 0.9%.

Il trial clinico FIGARO-DKD (87) è stato condotto su 7437 pazienti con CKD e DMT2 secondo i seguenti criteri:

- uACR compresa tra 30 e 300 mg/g e eGFR compresa tra 25 e 90 ml/min/1.73 m²
- uACR compresa tra 300 e 5000 mg/g e eGFR >60 ml/min/1.73 m² (CKD di 1° e 2° stadio)

Tutti i partecipanti erano trattati con RAAS inibitori. I livelli di $[K^+]$ dovevano essere <4.8 mmol/l.

Sono stati randomizzati in due bracci, uno in terapia con finerenone e l'altro con placebo.

L'outcome primario composito era la morte cardiovascolare per tutte le cause, l'infarto miocardico non fatale, lo stroke non fatale e l'ospedalizzazione per scompenso cardiaco. L'outcome secondario composito era l'insufficienza renale, una riduzione del 40% di eGFR rispetto al baseline o la morte per cause renali.

In un tempo di follow up di 3.4 anni, il 12.4% dei pazienti trattati con finerenone ha sviluppato l'outcome primario rispetto al 14.2% dei pazienti sottoposti a placebo (HR, 0.87; 95% intervallo di confidenza [CI], 0.76-0.98; $P = 0.03$), con beneficio guidato dalla minore ospedalizzazione per scompenso cardiaco (HR, 0.71; 95% CI, 0.56 to 0.90), mentre, per quanto riguarda l'outcome secondario, è stato sviluppato rispettivamente nel 9.5% e nel 10.8%. Il tasso di pazienti che ha sospeso la terapia per iperkaliemia è stato rispettivamente di 1.2% e dello 0.4%

Lo studio ha quindi concluso benefici cardiovascolari nei pazienti con DMT2 con CKD di stadio 2-4 e macroalbuminuria o stadio 1-2 e proteinuria.

Nei due studi è ben rappresentata la popolazione con CDK in stadi precoci e elevata albuminuria e in particolare nello studio FIGARO-DKD oltre il 60% dei pazienti aveva CKD albuminurica con $eGFR >60$ ml/min/1.73 m², nonostante il trattamento ottimale. L'albuminuria è un fattore di rischio cardiovascolare e di mortalità per tutte le cause indipendente dai livelli di eGFR, che pone questi pazienti ad elevato rischio (29).

Gli outcomes dei due studi sono complementari e le popolazioni in parte si sovrappongono, ma la metanalisi dei due trials, FIDELITY (94), ha aggiunto importanti nuove informazioni.

1. La riduzione del rischio relativo di outcome composito cardiovascolare è stata 14%. Nell'analisi delle componenti dell'outcome composito cardiovascolare, la riduzione maggiore del rischio relativo si è osservata nella riduzione delle ospedalizzazioni per scompenso cardiaco, ridotto del 22%. Lo scompenso cardiaco con frazione di eiezione ridotta NYHA II e III (*New York Heart Association classification, NYHA class*) era un criterio di

esclusione. Questo dato è molto importante noto che lo scompenso cardiaco è la maggiore fonte di morbidità tra i pazienti con DMT2 e DKD. Inoltre il fatto che il finerenone riduca il rischio di scompenso cardiaco tra i pazienti con DKD enfatizza la necessità di screening di tutti pazienti con DMT2 con questo fattore di rischio.

2. La riduzione dell'outcome composito renale è stata 23%. La riduzione del rischio di dialisi è stata del 20%.
3. Si suggerisce un forte effetto dell'over-attivazione dei recettori mineralcorticoidi nella patogenesi di entrambe la malattia cardiovascolare e la progressione del danno renale nei pazienti con CKD e DMT2.
4. 6.7% dei pazienti erano al baseline in terapia con SGLT2 inibitori, 7.2% con GLP1RA: gli effetti cardiovascolari e renali sono sovrapponibili a quelli dei pazienti che non assumono tali farmaci. Sono tuttavia necessari ulteriori trials clinici mirati.
5. 1.7% dei pazienti trattati con finerenone hanno sospeso la terapia per iperkaliemia rispetto allo 0.6% trattato con placebo. Tuttavia l'uso del finerenone è associato a riduzione del rischio di ipokaliemia, noto fattore causativo di outcome avverso nello scompenso cardiaco.

Un limite dei due trials è stato non includere i pazienti con DKD non albuminurica.

Durante questi trials le linee guida hanno approvato per pazienti con DMT2 e DKD l'uso di SGLT2 inibitori e GLP1RA per la riduzione del rischio cardiorenale, motivo per cui il finerenone è stato approvato in seconda linea (95).

L'aldosterone è un ormone steroideo prodotto dalla zona glomerulare della corticale del surrene, che diffonde attraverso la membrana plasmatica e lega il recettore citoplasmatico MR α delle cellule principali del tubulo distale e del dotto collettore. Ha un effetto di ritenzione di sodio e acqua, per stimolazione dell'espressione del trasportatore epiteliale del sodio (*Epithelial Sodium Channel, ENaC*) e di escrezione di K⁺, per stimolazione dell'espressione del canale ATP-dipendente del potassio (*Renal Outer Medullary Potassium channel, ROMK*) (96). Regola quindi il volume extracellulare e la pressione arteriosa. Il blocco di questo meccanismo ha un effetto natriuretico benefico nella malattia cardiovascolare (97).

Il recettore mineralcorticoidi è estesamente espresso in vari organi del nostro organismo (98): rene, miocardio, parete vascolare, cervello, retina, cute, polmoni,

fegato, muscolo scheletrico, tessuto adiposo, ghiandole salivari e sudoripare. Nel rene è stata documentata l'espressione anche nei podociti e nelle cellule mesangiali (99), a livello cardiovascolare nei cardiomiociti, fibroblasti cardiaci, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce (100).

È ipotizzato che l'over-attivazione dei recettori mineralcorticoidi, dipendente da un'aumentata concentrazione di aldosterone e/o un'aumentata espressione dei recettori, conduca a meccanismi pro-infiammatori e pro-fibrotici che contribuiscono alla glomerulosclerosi, alla fibrosi renale, all'ipertrofia del miocardio e al rimodellamento vascolare, quindi alla patologia cardio-renale (101, 102). Nella patogenesi della sindrome cardio-renale contribuiscono differenti cellule del sistema immunitario innato, per esempio le cellule dendritiche, i monociti e i macrofagi e adattativo, come i linfociti T, di cui alcuni studi hanno mostrato l'espressione dei recettori mineralcorticoidi (103, 104).

8. Gli endpoints surrogati dello sviluppo di insufficienza renale nei trials clinici

La malattia renale ha un decorso irreversibile e asintomatico fino alle fasi terminali, in cui esita in ESRD e richiede la terapia sostitutiva. Nella pratica clinica e nella ricerca si è reso quindi necessaria la validazione degli endpoints surrogati degli outcomes renali avversi, da applicare negli stadi precoci di CKD. Tale validazione richiede che i marker rispettino la plausibilità biologica, abbiano una forte correlazione con dati epidemiologici e capacità predittiva degli outcomes clinici (*Tabella VI*, 105).

In particolare la capacità predittiva è ridotta in presenza di fattori confondenti estranei al trattamento o se questo influisce su meccanismi differenti da quelli su cui agisce il surrogato. Nei trials clinici in cui nel tempo gli effetti del trattamento sono nulli sugli outcomes clinici, deve essere analizzato il rischio di giungere a false conclusioni quando invece sono presenti variazioni degli endpoints surrogati (estensione del concetto di errore di tipo 1). È importante sottolineare che un potere statistico limitato dalla dimensione campionaria inficia la possibilità di estendere una relazione, dimostrata nel setting di un trial clinico, in uno studio di popolazione.

Tabella VI: caratteristiche di albuminuria e di eGFR che li rendono validi endpoints surrogati della funzionalità renale.

Albuminuria	GFR
<p style="text-align: center;">Fisiopatologia</p> <p>Misura della permeabilità della parete capillare glomerulare alle macromolecole</p> $AER = GFR * P * \Theta - TR$ <p>L'incremento di albuminuria in CKD riflette l'incremento di Θ (permeabilità del glomerulo alle macromolecole); le macromolecole nel liquido tubulare potrebbero essere dannose; in alcune patologie l'albuminuria avviene prima del declino di GFR (106).</p>	<p style="text-align: center;">Fisiopatologia</p> <p>GFR è determinato dalla pressione di filtrazione, dalla superficie della parete capillare glomerulare e dalla sua permeabilità a piccoli soluti e all'acqua.</p> $GFR = N * SNGFR$ <p>La riduzione di GFR nella CKD generalmente riflette la riduzione del n° di nefroni; SNGFR può aumentare in conseguenza ad alterazioni emodinamiche (107).</p>
<p style="text-align: center;">Misurazioni</p> <p>Le linee guida raccomandano la misurazione del rapporto albumina/creatinina in campioni di urina (spot urine) raccolti la mattina (108). L'orario di raccolta non è standardizzato e l'intervallo di riferimento è indipendente dal sesso, dall'etnia e dalla massa muscolare. uACR è una misura surrogata di AER, di difficile misurazione per la difficoltà di raccolta di campioni di urina nelle 24h.</p>	<p style="text-align: center;">Misurazioni</p> <p>GFR non può essere direttamente misurata.</p> <p>La clearance di un marker esogeno di filtrazione (mGFR) è il gold standard, ma complesso e raramente usato.</p> <p>Le linee guida raccomandano la stima di GFR con equazione CDK-EPI (eGFR_{cr}) (63). I limiti sono l'imprecisione, in particolare per valori elevati di GFR, e l'influenza di fattori non considerati nell'equazione sui valori della creatininemia (per es. la massa muscolare). La precisione è migliorata dalla ripetizione delle misurazioni. I bias di eGFR_{cr} sono in parte superati dalla combinazione con il calcolo di eGFR con la concentrazione sierica di cistatina c (eGFR_{cr-cys})</p>
<p style="text-align: center;">Uso nella pratica clinica</p> <p>L'albuminuria è un criterio di definizione e di classificazione di CKD. È il principale fattore predittivo delle complicanze di CKD</p>	<p style="text-align: center;">Uso nella pratica clinica</p> <p>Il valore di eGFR è un criterio di definizione e di classificazione di CKD. È il principale fattore predittivo delle complicanze di CKD, frequentemente misurato nella pratica clinica.</p>

<p style="text-align: center;">Plausibilità biologica come endpoint per i trials clinici</p> <p>L'albuminuria è un marker di danno renale. In alcune patologie è responsabile della progressione della malattia renale e la sua riduzione potrebbe essere un meccanismo di intervento farmacologico (es. uso di RAAS inibitori). In questi contesti l'albuminuria è un biomarker utilizzabile.</p>	<p style="text-align: center;">Plausibilità biologica come endpoint per i trials clinici</p> <p>La GFR è il miglior parametro di misura della funzionalità renale. L'insufficienza renale è definita da valori di eGFR < 15 ml/min/1.73 m².</p>
<p style="text-align: center;">Uso nei trials clinici come endpoints surrogati</p> <p>Sono stati condotti degli studi di analisi della validità dei cambiamenti dell'albuminuria come end point surrogato per trials clinici, ma il dibattito è ancora in corso (109)</p>	<p style="text-align: center;">Uso nei trials clinici come endpoints surrogati</p> <p>Sono endpoint surrogati basati su eGFR: il declino del 30% o del 57% di eGFR e lo <i>slope</i> di eGFR</p> <p>Declino del 30% o 57% di eGFR: endpoint surrogato valido in alcune circostanze, ma meno attendibile in una coorte di pz con elevata GFR al baseline.</p> <p><i>Slope</i> di eGFR: potere statistico maggiore in certe condizioni, ma risente di trattamenti che hanno effetti emodinamici acuti. È stato quindi proposto di usare per il calcolo i valori di GFRs misurati dopo i primi tre mesi dalla randomizzazione (<i>slope</i> cronico) rispetto ad un calcolo eseguito a partire dall'inizio del trial (<i>slope</i> totale) (110). Tuttavia non ci sono ancora metodi uniformemente accettati.</p>

AER: albumin excretion rate; CKD: chronic kidney disease; eGFR: estimated glomerular filtration rate; GFR: glomerular filtration rate; mGFR: measured GFR; N: number of nephrons; NS: nephrotic syndrome; P, plasma concentration of albumin; PER: protein excretion rate; SNGFR: single nephron GFR; Θ : sieving coefficient for albumin; TR: rate of tubular reabsorption of albumin; UACR: urinary albumin-creatinine ratio; UPCR: urinary protein-creatinine ratio.

La US Food and Drug Administration (FDA) ha approvato l'uso del raddoppio della creatininemia, corrispondente ad un declino di eGFR > 57%, come end point surrogato per lo sviluppo di insufficienza renale in trials clinici di progressione della malattia renale. Tuttavia si tratta di un evento tardivo, per cui la National Kidney Foundation (NKF), in collaborazione con FDA e la European Medicines Agency

(EMA), ha sponsorizzato uno studio per individuare endpoints alternativi per i trials clinici in modo da ridurre la durata, la dimensione campionaria ed estenderne l'impiego in pazienti in stadi più precoci di CKD (Levey, Greene et al. 2019, 111). Questo presuppone una migliore caratterizzazione della capacità predittiva di un minore declino della eGFR del successivo sviluppo di insufficienza renale. Nelle simulazioni sono state determinate le condizioni in cui gli endpoints surrogati basati su eGFR hanno incrementato il potere statistico, permettendo di ridurre la dimensione campionaria o il tempo di follow up, e preservato un basso rischio di errore di tipo 1. È stato assunto un valore soglia minimo di variazione dell'endpoint surrogato tale per cui la probabilità che corrisponda a un beneficio clinico non nullo sia del 97.5% (*Positive Predictive Value*, $PPV_{0.975}$).

Nella tabella si riportano le conclusioni di studi di simulazione condotti dalla NKF *in collaborazione con la Food And Drug Administration e la European Medicines Agency EMA* sulla validità degli endpoints surrogati basati su GFR e su albuminuria (tabella VII).

Tabella VII: risultati degli studi di validazione degli outcomes surrogati della funzionalità renale (113).

Outcome surrogato	Risultato degli studi di validazione
Endpoints <i>time-to-event</i>	In uno studio di simulazione, che ha valutato 3.060 scenari comparando 19 protocolli terapeutici in 13 trials clinici di CKD (112), è stato osservato che il declino di eGFR del 40% rispetto al declino del 57% permette una riduzione della dimensione campionaria >20%, mantenendo un rischio di errore di tipo 1 <10% in presenza di effetti in acuto di piccola entità (<1.25ml/min/1.73 m ²) per: trials di durata di 2-3-5 anni e elevata eGFR media al baseline (67.5mL/min/1.73 m ²) e trials di durata di 2 anni con moderata eGFR al baseline (42.5 ml/min/1.73 m ²). L'uso del declino di eGFR del 30% rispetto al 40% permette la riduzione della dimensione campionaria, ma è un endpoint accettabile solo in assenza di effetti in acuto.
<i>Slope</i> di eGFR	E' stata analizzata la capacità predittiva della riduzione dello <i>slope</i> di eGFR, determinata dal trattamento, nella prevenzione dello sviluppo di ESRD (113). Sono stati analizzati 14 studi di coorte: tutti presentavano come outcomes lo sviluppo di ESRD e la mortalità (n=3.881.215, eventi di ESRD=12.635, eventi di morte=564.196). È stato osservato che una riduzione di 0.75ml/min/1.73 m ² in 2 anni è protettiva per ESRD (per la coorte con eGFR <60 al basale, <i>multivariable-adjusted HRs</i> =0.79 [95% CI, 0.77-0.81]; per la coorte

	<p>con eGFR >60 al basale HR=0.84 [95% CI, 0.82-0.87]). Ipoteticamente, in una popolazione con eGFR media di 75 ml/min/1.73 m² e declino medio di -5 ± 4 ml/min/1.73 m², un intervento terapeutico che rallenti il calo di 0.75 ml/min/1.73 m² all'anno è atteso che riduca il rischio di sviluppare ESRD di 1.6% (da 8.3% a 6.7%). L'associazione era più debole per osservazioni di durata di 1 anno e più forte se di 3 anni.</p> <p>Sono stati analizzati 47 trials clinici (n=60.620, di cui 43.841 presentavano DTM e DKD; eventi compositi di ESRD, eGFR<15 ml/min/1.73 m², raddoppio di Scr=7.115)</p> <p>Nei trials clinici, un effetto di calo di 0.75 ml/min/1.73m² all'anno dello <i>slope</i> totale si associava a un rischio inferiore in media del 27% (95% BCI, 20%-34%) di sviluppo dell'endpoint clinico. Risultati simili sono stati osservati per lo <i>slope</i> cronico. La soglia di efficacia di trattamento sullo <i>slope</i> di GFR totale in 3 anni perché abbia una probabilità di 0.975 di beneficio clinico non nullo è 0.48 e 0.74 ml/min/1.73 m²/anno per trials di dimensione campionaria rispettivamente grande* e modesta*, mentre per lo <i>slope</i> cronico, le soglie sono rispettivamente 0.62 e 0.85 ml/min/1.73 m²/ anno.</p> <p>Nelle simulazioni è emerso che, nei trials con follow up >2 anni, in pazienti con valori al baseline di GFR alti, sottoposti a trattamenti privi di effetti emodinamici acuti, i surrogati basati su eGFR migliorano l'efficienza (riduzione di N necessario). Un periodo <2 anni comporta una riduzione dell'efficienza, una maggiore suscettibilità al bias e una riduzione del potere statistico.</p> <p>Per trattamenti che non hanno effetti emodinamici in acuto, lo <i>slope</i> totale ha mostrato lo stesso potere statistico dell'endpoint clinico. Infatti è stato osservato che l'impiego dell'endpoint surrogato ha ridotto il periodo di follow up da 4-6 anni a 2 anni, migliorando l'efficienza dal 17% al 64%. Il potere statistico è anche il medesimo di quello degli endpoint surrogati di calo di eGFR del 30% o 40% (endpoints <i>time-to-event</i>).</p> <p>Per trattamenti con effetti emodinamici acuti, invece, lo <i>slope</i> cronico ha un potere statistico maggiore rispetto a quello dell'endpoint clinico o altri <i>time-to-event endpoints</i>, ma un maggiore rischio di errore di tipo 1. È indicato anche l'uso di endpoints <i>time-to event</i> basati sul declino di 40-57% di eGFR piuttosto che lo <i>slope</i> totale di GFR.</p>
Riduzione di uACR	<p>È stata approvata, come endpoint surrogato, la riduzione della media geometrica di uACR del 20-30%, in setting clinici appropriati (114).</p> <p>Sono stati analizzati 41 trials clinici (n=29.979 di cui 21.102 presentavano diabete e DKD, 1.325 patologie glomerulari, 7.552 altre patologie).</p>

	<p>È stato osservato che una riduzione della media geometrica di uACR del 27% (BCI, 5%,45%) corrisponde ad una riduzione del rischio di outcome clinico. La relazione è più forte per pazienti con uACR al baseline ≥ 30 g/mg: $R^2 = 0.72$ (BCI, 0.05-0.99). In questi pazienti $PPV_{0.975}=21\%-27\%$ nei nuovi trials. L'adeguatezza di tale impiego varia in funzione del tipo di patologia e di intervento terapeutico: è appropriato per patologie caratterizzate da moderata/severa albuminuria e per interventi in cui la riduzione dell'albuminuria sia un meccanismo di azione principale nella regressione del danno renale (per es. la malattia renale diabetica caratterizzata da elevati livelli di albuminuria al baseline). L'osservazione che gli effetti benefici del trattamento sull'albuminuria debbano essere osservati in un periodo di follow up di 6 mesi suggerisce che il tempo di follow up del trial potrebbe essere accorciato, con beneficio economico. Tuttavia è pur sempre necessaria la conferma dell'efficacia sulla riduzione di GFR, con conseguente necessario allungamento del periodo di follow up. I contesti clinici in cui risulta adeguato come endpoint surrogato sono: pazienti con malattia renale diabetica caratterizzata da elevata albuminuria al baseline, la nefropatia membranosa, la glomerulosclerosi focale e segmentale con sindrome nefrosica e la nefropatia da immunoglobuline IgA (115, 116, 117).</p>
--	---

* È definita grande una numerosità campionaria di circa 1900, tale da avere una sensibilità di stima del trattamento di 0.25, modesta di 720 tale da avere una sensibilità di 0.4.

La scelta ottimale dell'endpoint basato su GFR dipende dalla velocità di declino di GFR, dalla natura degli effetti del trattamento nel breve e nel lungo termine e dal disegno dello studio.

Lo *slope* di eGFR è un endpoint surrogato più utile rispetto agli endpoints *time-to event* per gli studi di popolazioni caratterizzate da valori di eGFR al baseline superiori, periodi di follow up più brevi e per trattamenti con effetti più uniformi e senza effetti emodinamici acuti. In presenza di effetti emodinamici acuti, è da preferire l'endpoint surrogato *slope* cronico. Questi endpoints sono meglio applicabili nelle popolazioni ad elevato rischio di progressione di malattia renale perché la probabilità di raggiungere un effetto del trattamento di 0.5-1.0 ml/min/1.73 m²/ anno ($PPV_{0.975}$ di beneficio clinico in un nuovo trial) è maggiore se il declino di GFR è più veloce (113).

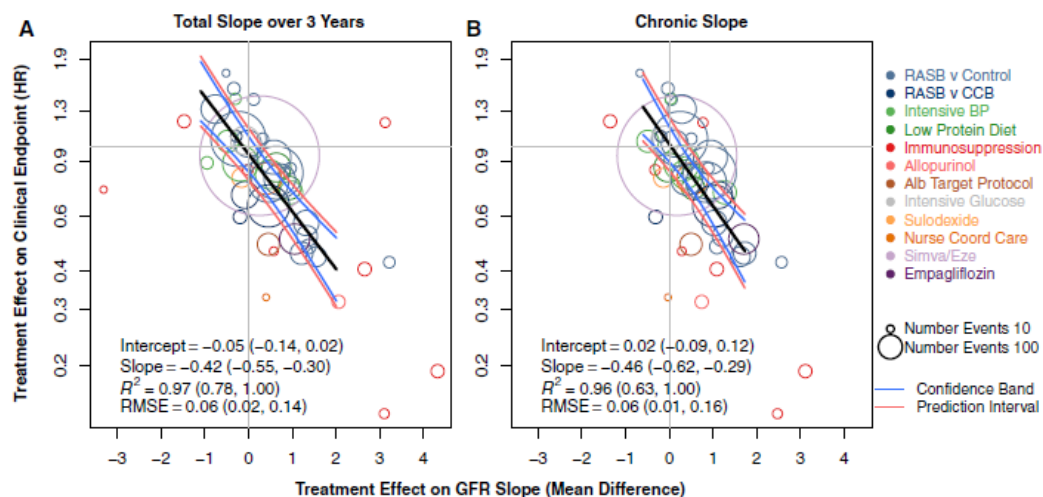


Figura 8: è mostrata la correlazione tra gli effetti del trattamento sullo slope di GFR (slope totale e slope cronico) e sugli endpoints di sviluppo di ESRD, di GFR 15ml/min/1.73 m² e di raddoppio della creatininemia. Gli effetti del trattamento sullo slope di GFR sono espressi come differenza media dei valori della eGFR al baseline e dopo trattamento meno il controllo, ed è espressa in ml/min/1.73 m²/anno. Gli effetti del trattamento sull'endpoint clinico sono espressi come hazard ratio (HR). I colori rappresentano il tipo di intervento. Ogni cerchio rappresenta un differente trattamento e le dimensioni sono proporzionali al n° di eventi. La linea nera è la linea di regressione, la linea blu rappresenta l'intervallo di confidenza, le linee rosa l'intervallo di predittività secondo i modelli usati. Alb, albuminuria; BP, blood pressure; CCB, calcium channel blocker; RASB, renin-angiotensin system blocker; RMSE, root mean squared error (113).

Si conclude riportando gli endpoints surrogati approvati dalle linee guida per la valutazione della malattia renale cronica nella ricerca (KDIGO 2018, 118).

Tabella VIII: endpoints surrogati approvati dalle linee guida per la valutazione della malattia renale cronica nella ricerca (118).

	Progressione lenta della CKD	Progressione rapida della CKD
Stadi precoci: CKD G1-G3a (eGFR _≥ 45 ml/min/1.73m ²)	Slope di mGFR o di eGFR o outcome surrogato o combinazione degli outcomes	Declino del 30-40% di eGFR usando misurazioni ripetute per escludere effetti acuti
Stadi tardivi: CKD G3b-G5 (eGFR < 45 ml/min/1.73m ²)	Sviluppo di ESRD o declino del 30-40% di eGFR	Sviluppo di ESRD o raddoppio della creatininemia (o declino 40-57% di eGFR)

9. Cellule staminali circolanti

9.1 Cosa sono le cellule staminali circolanti e quale significato possono avere nel diabete

Le manifestazioni cliniche del paziente diabetico sono quindi l'epifenomeno di uno squilibrio omeostatico che avviene prima a livello cellulare e quindi sistemico, determinato da fattori ambientali che agiscono in un background genetico predeterminato. Sottende eventi molecolari che convergono nella disfunzione endoteliale, incrementando il rischio cardiovascolare.

Nel 1997 il gruppo di Asahara et al. (119) ha identificato nel sangue periferico progenitori endoteliali circolanti (*Endothelial progenitor cells, EPCs*), come cellule $CD34^+KDR^+$ (*KDR* anche noto come *type 2 vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-2*) con tecniche di citofluorimetria. Tali cellule sono dotate della capacità di differenziare in cellule endoteliali. In modelli animali di ischemia questi progenitori endoteliali eterologhi, omologhi e autologhi venivano riscontrati nei siti di attiva angiogenesi, per cui è stato ipotizzato che la vasculogenesi postnatale potesse essere un meccanismo di angiogenesi che interviene nella riparazione vascolare (120).

Nello sviluppo embrionale le cellule ematopoietiche e le cellule endoteliali originano da un progenitore mesodermico comune del sacco vitellino, noto come emangioblasto. L'emangioblasto genera le cellule ematopoietiche attraverso l'endotelio emogenico intermedio (121). Le cellule staminali ematopoietiche (*hematopoietic stem/progenitor cells, HSPCs*) migrano dal mesoderma extraembionale nel fegato fetale prima di stabilire l'ematopoiesi nel midollo osseo.

È attualmente molto controversa l'ipotesi che gli emangioblasti persistano in età adulta o se le cellule endoteliali mature mantengano attività ematopoietica; tuttavia è noto che i progenitori ematopoietici, dopo differenziamento dall'endotelio emogenico, non possono differenziare in cellule endoteliali, neanche nell'embrione (122).

Lo studio della funzione biologica delle cellule staminali circolanti richiede una loro definizione rigorosa e condivisa. A questo scopo, le tecniche attualmente utilizzate sono la citofluorimetria a flusso di campioni di sangue fresco e l'isolamento *in vitro* di colture cellulari (123).

In citofluorimetria, è stato confermato che la combinazione di antigeni CD34⁺KDR⁺ usata nel lavoro di Asahara et al. identifica le cellule capaci di stimolare l'angiogenesi *in vivo*, ossia le EPCs (124). CD34 è un marker di staminalità, mentre KDR è un marker endoteliale. Alcuni gruppi hanno incluso CD133 come marker di staminalità aggiuntivo, tuttavia è ancora discusso se le cellule progenitrici ematopoietiche CD34⁺CD133⁺KDR⁺ abbiano un fenotipo endoteliale (125). Nell'adulto, le HSPCs sono definite come cellule CD34⁺ e le EPCs sono considerate un sottotipo. La citofluorimetria quantifica le cellule staminali circolanti (*circulating stem cells, CSCs*) come percentuale di cellule mononucleari CD34⁺/CD34⁺KDR⁺. Nella popolazione generale, le HSPCs rappresentano lo 0.05% dei globuli bianchi nel sangue periferico, che corrispondono a circa 3 cellule per μL di sangue (126).

In coltura, le cellule mononucleate del sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs*) possono differenziare in due sottotipi cellulari: le cellule mieloidi angiogeniche (*Myeloid Angiogenic Cells, MACs*) e un sottotipo di cellule endoteliali (*Endothelial Colony Forming Cells ECFCs*).

Le MACs sono cellule della linea ematopoietica CD45⁺CD14⁺CD31⁺ che non differenziano in cellule endoteliali, ma capaci di promuovere l'angiogenesi con attività paracrina (127). Le ECFCs sono cellule CD31⁺CD10⁺CD146⁺ dotate di capacità angiogenica intrinseca, di riparazione vascolare e di vasculogenesi (128).

L'idea che i progenitori cellulari circolanti contribuiscono all'omeostasi endoteliale crea i presupposti per una nuova ipotesi fisiopatologica della patologia cardiovascolare, ossia che la riduzione della capacità riparativa delle HSPCs sia causa o concausa della disfunzione endoteliale.

9.2 La disfunzione endoteliale come patologia del midollo osseo: studi preclinici

Le cellule staminali ematopoietiche HSPCs esplicano gran parte della loro funzione nel midollo osseo (*bone marrow BM*), un microambiente altamente specializzato che garantisce la quiescenza delle cellule immature e il differenziamento delle HSPCs in cellule delle linee mieloidi e linfoidi (129).

Il significato della loro mobilitazione dal midollo osseo al sangue periferico, forse una reminiscenza embrionale, è ancora largamente sconosciuto. Per esempio, oltre

a contribuire all'omeostasi vascolare, le cellule staminali circolanti mantengano una funzione immunitaria contro i patogeni esterni: migrano in tessuti extramidollari dove originano cellule mieloidi residenti, preferenzialmente dendritiche, sotto stimolo di agonisti degli agonisti dei Toll-like receptors (130).

Il processo di mobilizzazione è un processo attivo mediato dalla modifica del gradiente delle chemochine tra midollo osseo e circolo periferico, in particolare di CXCL12 (*stromal cell-derived factor, SDF-1*) che agisce sul recettore CXCR4 (131). In risposta ad alti livelli di CXCL12 nel BM, le HSPCs rimangono aderenti allo stroma midollare, in un processo mediato da integrine, caderine, selectine e varie proteine di matrice. In seguito a una riduzione dei livelli di CXCL12 oppure in caso di internalizzazione del recettore CXCR4 o in risposta ad altri eventi, come la produzione di NO e l'attivazione delle metalloproteinasi (*Matrix metalloproteinases, MMPs*), si ha una ridotta adesione delle HSPCs allo stroma. La minore adesione permette alle HSPCs di rispondere al gradiente di CXCL12 verso il sangue periferico, che porta alla loro mobilizzazione.

È un processo coordinato da fenomeni locali del microambiente midollare, ma che risente anche di fenomeni sistemici, per esempio il danno ischemico o l'iperglicemia. Inoltre il rilascio di HSPCs segue un'oscillazione circadiana governata da stimoli noradrenergici e colinergici (126)

La riduzione dei livelli di HSPCs nel sangue periferico, in un modello tri-compartimentale, potrebbe risultare in:

1. Ridotto numero di HSPCs nel BM
2. Ridotta sopravvivenza nel sangue periferico
3. Ridotta stimolazione della migrazione dal sangue periferico ai tessuti target

Nei soggetti diabetici, in vivo, non è stato confermato un aumento dell'apoptosi delle HSPCs indotto dall'iperglicemia (132), ma in modelli sperimentali diabetici, è stata dimostrata una ridotta mobilizzazione, in un processo che è stato definito "mobilopatia diabetica".

Un primo studio preclinico che ha dimostrato questo fenomeno è stato pubblicato nel 2006 dal gruppo di Fadini (133). Sono stati utilizzati modelli di danno agli arti da ischemia e riperfusione con diabete e senza diabete nel ratto per osservare se il ridotto numero di EPCs nel diabete, nonostante lo stimolo dell'ischemia, fosse

meccanicisticamente attribuibile alla ridotta mobilizzazione dal midollo osseo. In risposta all'ischemia, nei ratti non diabetici si è osservato l'aumento dei livelli di EPCs, che era invece completamente assente nei ratti diabetici. La mobilizzazione difettiva delle EPCs nel ratto diabetico si associava all'alterato rilascio di CXCL12/SDF-1 e di VEGF e all'inabilità di up-regolare il fattore di trascrizione inducibile da ipossia HIF1 α (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*, HIF1 α) a livello muscolare, con conseguente mancato aumento compensatorio della densità capillare muscolare nel sito di danno. Nel ratto diabetico l'azione ipoglicemizzante e una premedicazione con fattori di crescita ematopoietici si è associata ad un aumento parziale dei livelli di EPCs. Per cui nei ratti diabetici la mobilizzazione delle EPCs nei tessuti ischemici è difettiva e impedisce un'angiogenesi compensatoria efficace.

Nelle cellule endoteliali, l'espressione genica di CXCL12 è incrementata da HIF1 α in relazione alla ridotta tensione di ossigeno, favorendo la creazione del gradiente chimico che conduce le cellule circolanti, esprimenti CXCR4, verso il tessuto ischemico. Il blocco nel tessuto ischemico di CXCL12 o di CXCR4 sulle cellule circolanti, previene il reclutamento cellulare e la riparazione nel sito di danno (134). L'iperglicemia in sé altera HIF1 α tramite il metilglicosale, substrato dell'enzima glicosilasi 1 (GLO1): in topi diabetici con over-espressione dell'enzima superossido dismutasi, la riduzione dei livelli di superossido si è associata alla correzione dei difetti di neovascolarizzazione. In EPCs ipossiche coltivate ad elevati livelli di glucosio, la sovra-espressione di GLO1 ha prevenuto la riduzione dei livelli di CXCL12 e di CXCR4, ma anche dell'attività dell'enzima ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS). NO favorisce la mobilizzazione, per cui la deplezione dei suoi livelli per reazione con i ROS e formazione di perossinitriti contribuisce alla "mobilopatia diabetica" (135).

La compromissione della mobilizzazione è stata osservata in entrambe le forme di diabete e prescinde dalla durata della malattia, dal controllo della glicemia, presenza/assenza di complicanze; suggerendo che l'iperglicemia e la cronicità della patologia esercitano effetti peggiorativi sulla funzione del midollo osseo differenti e indipendenti.

Il sistema nervoso simpatico ha un ruolo importante nella funzione midollare e la mobilizzazione delle HPSCs dipende da neurotrasmettitori catecolaminergici. Noto

che la neuropatia autonoma è una complicanza microvascolare del diabete, si è ipotizzata un'interconnessione. In modelli murini di DMT1 e DMT2, in cui è stata dimostrata una denervazione simpatica, è stata osservata, dopo stimolazione con il fattore di crescita granulocitario (*Granulocyte-Colony Stimulating Factors, GCSF*) o l'ischemia, una ridotta risposta nei livelli di EPCs (136). In questi modelli è stata osservata un'aumentata espressione di p66Shc, noto mediatore di danno indotto dall'iperglicemia, e una ridotta espressione di Sirt1. In modelli murini DMT1 e DMT2 knock-out di p66Shc, l'espressione di Sirt1 è mantenuta, il danno nervoso è prevenuto (è stata osservata stimolazione dell'espressione di Sirt1 dopo somministrazione di isoproterenolo) e la risposta di mobilizzazione è stata ripristinata. La somministrazione di despiramina ha ripristinato l'espressione di Sirt1 in modelli con DMT1. In topi knock-out di Sirt1, la mobilizzazione è debole. La correlazione risiede nella sovra-espressione di molecole di adesione per esempio selectina-L, nei topi con neuropatia, che potrebbe favorire l'adesione delle cellule allo stroma midollare. In topi knock-out per la selectina, la mobilizzazione è in parte ripristinata.

Questo studio ha suggerito un'ipotesi patogenetica del segnale adrenergico difettivo nella ridotta mobilizzazione delle HSPCs e quindi un ruolo della disautonomia diabetica nell'incremento del rischio cardiovascolare.

I recettori β -3 adrenergici giocano un ruolo essenziale nel rilascio secondo ritmi circadiani di HSPCs e entrambi i recettori β -2 e β -3 cooperano nello stimolare la migrazione (137). Altre scenari terapeutici.

Sono stati studiati anche gli effetti della malattia nel lungo termine sul midollo osseo, introducendo il concetto di microangiopatia del midollo osseo (138). In topi con DMT1, comparati con topi senza diabete, dopo 27-30 settimane è stata osservata la rarefazione dei sinusoidi, capillari e arteriole, che crea un ambiente ipossico, e aumentata permeabilità, determinata da un'alterazione delle interazioni cellula-cellula. Lo stress ossidativo attiva la protein-tirosina chinasi 2 che fosforila la proteina di adesione VE-cadherin (*Vascular endothelial cadherin, VE-cadherin*) (effetto ridotto dall'uso di N-acetil-cisteina). Il comparto delle cellule staminali ematopoietiche pluripotenti è ridotto secondo il gradiente di ipossia, a causa del danno ossidativo del DNA e la conseguente apoptosi. L'incremento del tessuto

adiposo contribuisce al rimodellamento con la secrezione paracrina di fattori e citochine proinfiammatorie.

Le cellule endoteliali del midollo osseo creano un microambiente perivascolare dove risiedono la maggior parte delle HSPCs. È stato mostrato che l'esposizione ad elevati livelli di ROS conduca ad una maggiore capacità migratoria, ma anche all'apoptosi e stimola il differenziamento, spiegandone la deplezione (139).

L'alterazione della migrazione delle HSCPs risente quindi anche della compromissione del microambiente midollare, riconducibile meccanicisticamente ad un'alterazione dell'asse CXCL12-CXCR4:

- Espressione di CXCR4 nelle cellule endoteliali del midollo osseo: la delezione si associa ad incremento della permeabilità vascolare e migrazione di HSCPs (138)
- Espressione di CXCL12 negli adipociti del midollo osseo: l'incrementata espressione ha un effetto di ritenzione delle HSCPs (139)
- Alterata attività di dipeptidil-peptidasi-4 DPP4: cliva la porzione amino-terminale dipeptidica di CXCL12 (137)
- Secrezione di oncostatina M (OSM), citochina della famiglia di IL6, da parte dei macrofagi M1 (CD169⁺) che stimola la secrezione di CXCL12 da parte delle cellule stromali. La deplezione specifica dei macrofagi M1 con tossina difterica in modelli sperimentali ha condotto all'aumento dei livelli delle HSCPs (140).

L'iperglicemia amplifica la mielopoiesi nel midollo osseo (141), meccanismo proinfiammatorio associato all'insulino-resistenza e all'aterosclerosi. Infatti nei soggetti diabetici i livelli dei leucociti nel sangue sono superiori (142) e si associano ad una maggiore prevalenza di malattia coronarica (143).

La mielopoiesi indotta dall'iperglicemia è mediata dall'accumulo di AGEs e dall'aumentata produzione di allarmine S100A8/9 da parte dei neutrofili, che agiscono sui recettori RAGEs (*receptor for the AGE ligand, RAGE*). È stato osservato nei modelli murini sperimentali di DMT1 che le allarmine promuovono il differenziamento delle HSPCs del BM in cellule della linea mieloide, incrementando i livelli dei neutrofili e dei monociti che differenziano nei macrofagi M1 (144). L'amplificazione dei progenitori mieloidi risulta in un incremento del segnale di OSM, con conseguente effetto di ritenzione delle HSPCs nelle nicchie

del BM, che vanno incontro a differenziamento mieloide e sostengono l'infiammazione sistemica in un circolo vizioso.

Meccanicisticamente, la correlazione tra incrementata mielopoiesi e ritenzione delle HSPCs nel BM è stata individuata nella via OSM-p66Shc (145). OSM agisce sul recettore eterodimerico OSMR, innesca la via di MAPK e JAK-STAT3/5 e, tramite p66Shc non mitocondriale, induce CXCL12 nelle cellule stromali del BM con effetto ritentivo verso le HSPCs e in parallelo porta un'ulteriore amplificazione della mielopoiesi (figura 9).

In modelli murini, la delezione di OSM o di p66Shc si associa a riduzione del rapporto neutrofililinfociti nel sangue periferico e al ripristino della mobilizzazione di HSPCs (146). Inoltre la delezione selettiva di p66Shc nel sistema ematopoietico, privando dell'effetto di ritenzione delle HSPCs e di amplificazione della mielopoiesi, era sufficiente a ripristinare il traffico di HSPCs al sito di ischemia e a migliorare il flusso nel topo diabetico.

Nell'essere umano, il rapporto neutrofililinfociti nel sangue periferico è un noto marker di rischio cardiovascolare (147).

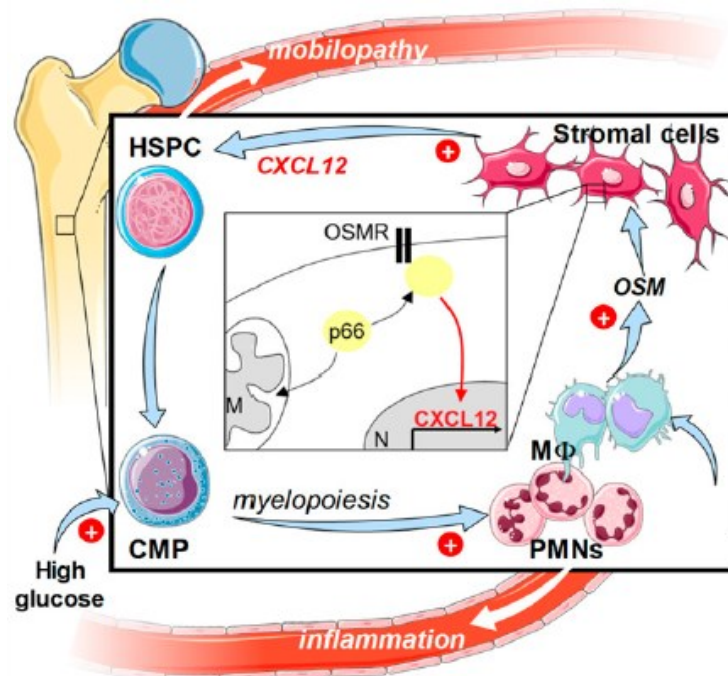


Figura 9: rappresentazione schematica della correlazione tra il fenomeno della “mobilopatia diabetica” e mielopoiesi individuata nella via molecolare di OSM-p66Shc. PMNs, polymorphonuclear cells, M, macrophages; M, mitochondrion; N, nucleo, +, effetto stimolatorio (146).

9.3 Cellule staminali circolanti e fattori di rischio cardiovascolare

La correlazione tra HSPCs circolanti e fattori di rischio cardiovascolare è complessa.

L'età avanzata correla inversamente con i livelli e la funzione delle HSPCs circolanti, è quindi stato ipotizzato che il loro declino abbia un ruolo nella disfunzione endoteliale età-correlata (148). Tuttavia il declino età-correlato è stato osservato solo nei soggetti con fattori di rischio cardiovascolare quali fumo, diabete, ipertensione o dislipidemia. In giovane età, i fattori di rischio determinano un danno vascolare che stimolerebbe il BM a rilasciare HSPCs in circolo, ma questo processo in cronico esita in età avanzata nell'esaurimento del potenziale riparativo e nel declino dei livelli (149).

È stato osservato che l'ipertensione primaria accelera la senescenza delle HSPCs e la compromissione delle capacità di riparazione endoteliale (150), che nei pazienti fumatori si ha la compromissione della funzionalità delle HSPCs, che tuttavia aumentano in numero dopo cessazione del fumo (151), che in vitro le LDL ossidate inducono la senescenza delle EPCs umane (152). Nei pazienti in sovrappeso/obesi si osserva invece una correlazione tra aumentati livelli di HSPCs circolanti e peggioramento della resistenza insulinica (153). Quest'ultima correlazione, apparentemente paradossale, è in linea con l'ipotesi che, nei pazienti più giovani, la precoce stimolazione del BM mediata dai fattori di rischio cardiovascolare si associ alla futura pauperizzazione qualitativa e quantitativa delle HSPCs.

L'eterogeneità di metodi e di popolazione degli studi condotti rende difficile stabilire una gerarchia dei fattori di rischio in termini di impatto negativo sulle HSPCs. Tuttavia è stato studiato l'impatto della loro combinazione nel setting di pazienti con sindrome metabolica (154): l'incremento del numero delle componenti della sindrome metabolica era linearmente correlata con il progressivo declino delle HSPCs circolanti (*figura 10 e figura 12*). Il medesimo studio ha cercato di stabilire la relazione tra i differenti profili antigenici (combinazione dei markers CD34, CD133 e KDR) delle cellule progenitrici, identificati con tecnica di citofluorimetria a flusso, e il rischio cardiovascolare. È emerso che l'espressione di CD34 individua le cellule progenitrici che meglio correlano con il rischio cardiovascolare (*figura 10*).

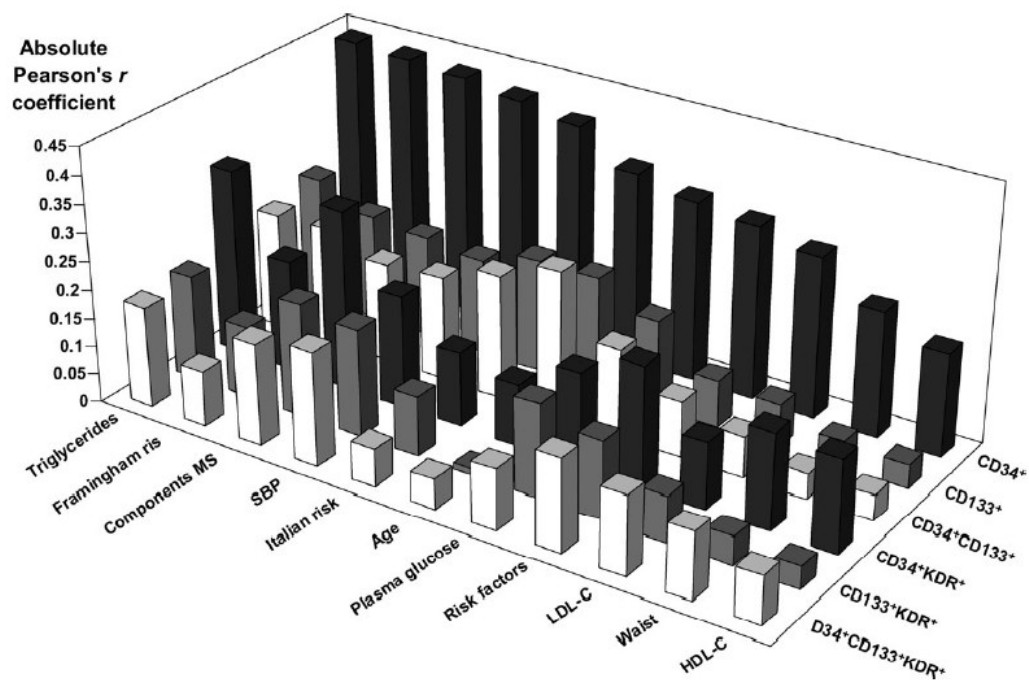


Figura 10: indice di correlazione lineare r di Pearson tra i livelli delle cellule staminali circolanti (definite da sei possibili profili antigenici) e alcuni parametri cardiovascolari. Il coefficiente di correlazione tra i livelli delle cellule $CD34^+$ e i parametri cardiovascolari è il maggiore, con valore di p inferiore. È stata individuata una correlazione significativa tra le cellule $CD34^+$ e la stima surrogata del rischio cardiovascolare cumulativo, definita da n° di fattori di rischio ($r=-0.36$), criteri della sindrome metabolica ($r=-0.37$) e il rischio CV a 10 anni (Framingham risk: $r=-0.44$ e Italian risk $r=-0.42$) (154).

I criteri di definizione di sindrome metabolica usati sono i criteri NCEP-ATPIII: elevata circonferenza del giro vita (≥ 102 cm negli uomini, ≥ 88 cm nelle donne), elevati livelli di trigliceridi (≥ 150 mg/dl), ridotti livelli di HDL (< 40 mg/dl negli uomini, < 50 mg/dl nelle donne), elevata pressione arteriosa (pressione sistolica ≥ 130 mmHg, pressione diastolica ≥ 85 mmHg), elevata glicemia a digiuno (≥ 100 mg/dl)

Da un'analisi di regressione lineare multipla, la conta $CD34^+$ è un fattore predittivo, indipendente dagli altri fattori di rischio, di elevato rischio cardiovascolare (Framingham risk a 10 anni $> 20\%$) ($\beta = -0.100$, $p = 0.04$)

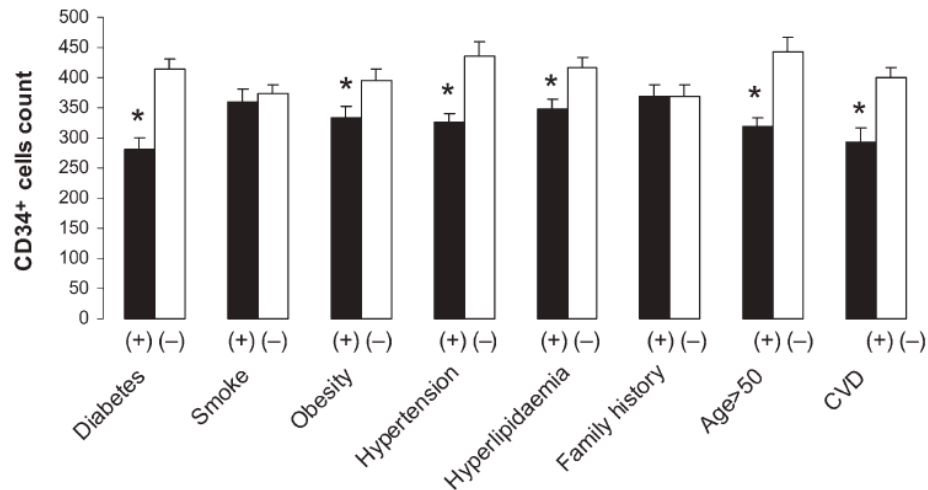


Figura 11: analisi univariata della conta di CD34⁺ (espressa come numero di cellule/10⁶ eventi) in presenza o assenza dei fattori di rischio CV e malattia CV ($p<0.05$) (154).

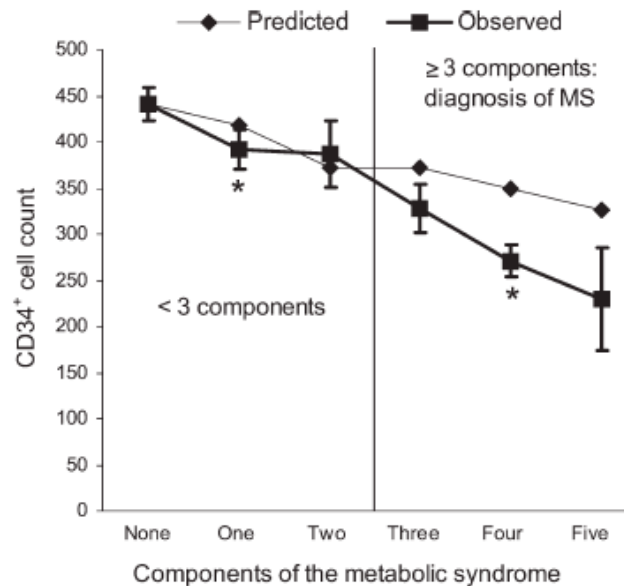


Figura 12: conta di CD34⁺ (espressa come numero di cellule/10⁶ eventi) in relazione al numero dei criteri della definizione di sindrome metabolica presenti nei pazienti ($p<0.05$). Mostra l'effetto sinergico delle componenti della sindrome metabolica nella riduzione dei livelli di CD34⁺ (154).

9.4 Cellule staminali circolanti e outcomes cardiovascolari

I fattori di rischio cardiovascolare convergono nella formazione della placca aterosclerotica, substrato patogenetico di eventi cardiovascolari (angina stabile e sindromi coronariche acute), cerebrovascolari e dell'arteriopatia periferica. Non è chiaro il ruolo di HSPCs/EPCs nella stabilità di placca, in quanto è stato ipotizzato sia un ruolo protettivo per promozione dell'integrità endoteliale, sia dannoso per promozione della neoangiogenesi intrapacca (155).

Sono stati analizzati in una recente metanalisi (156) 21 studi (n=4155) che hanno valutato il significato prognostico dei livelli delle HSPCs circolanti in pazienti con fattori di rischio cardiovascolare, coronaropatia, altre patologie cardiovascolari, di cui erano noti i livelli di HSPCs/EPCs al baseline. Nonostante l'eterogeneità degli studi condotti, essi hanno uniformemente riportato che la deplezione delle HSPCs circolanti è fattore di rischio indipendente per outcomes sfavorevoli nei pazienti con elevati fattori di rischio o coronaropatia.

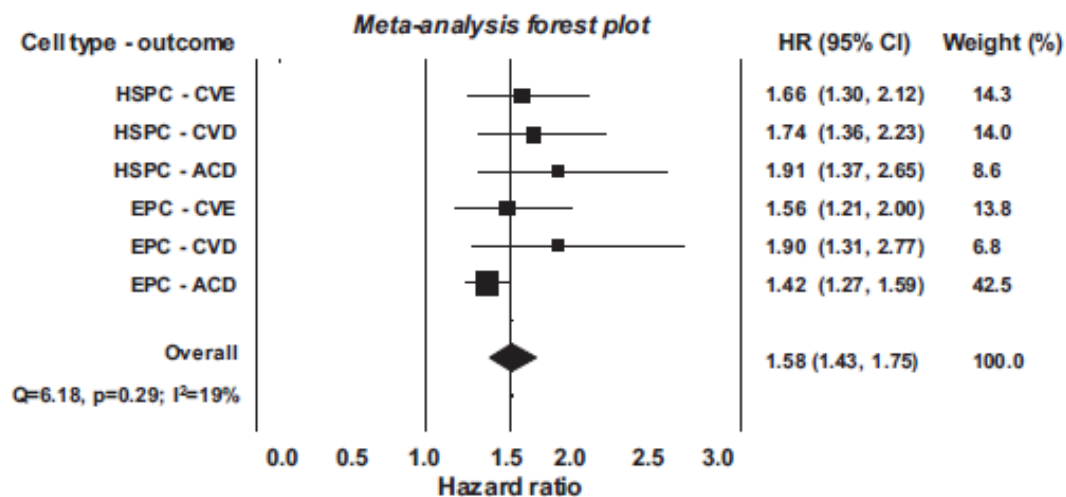


Figura 13: forest plot che mostra HR, con intervallo di confidenza 95%, tratti da studi individuali che hanno investigato l'associazione tra ridotti livelli di HSPC/EPCs e outcomes di evento CV, morte CV, morte per ogni causa. I test di eterogeneità (Q e I^2) non sono statisticamente significativi (156).

È quindi stato suggerito l'uso delle HSPCs/EPCs nel setting clinico per la stratificazione del rischio cardiovascolare.

Il modello di calcolo del rischio cardiovascolare standard è basato su dati clinici: età, sesso, fattori di rischio cardiovascolare, precedente malattia cardiovascolare, insufficienza renale e terapia farmacologica.

Dall'analisi dei dati raccolti da cinque studi longitudinali condotti su pazienti classificati come ad alto rischio cardiovascolare (n=1057) è emerso che l'aggiunta al modello standard di valutazione del rischio della conta delle HSPCs circolanti abbia migliorato la capacità di discriminare i pazienti che svilupperanno un futuro evento cardiovascolare (157). L'aggiunta dell'informazione bassa/alta conta di HSPCs circolanti ha avuto effetti marginali e non significativi su C-statistica (nota tuttavia la bassa sensibilità per piccoli cambiamenti nell'accuratezza predittiva), ma ha migliorato significativamente IDI (*integrated discrimination improvement*

index) per lo sviluppo di un evento cardiovascolare maggiore MACE (morte cardiovascolare, infarto miocardico acuto non fatale, ospedalizzazione per angina instabile o scompenso cardiaco congestizio, stroke o TIA, evidenza angiografica di re-stenosi dopo rivascolarizzazione coronarica, amputazione maggiore dopo ischemia periferica) e NRI (*net reclassification improvement*) per morte cardiovascolare, IM non fatale e altri fattori di rischio cardiovascolari, ma non per MACE.

L'aggiunta anche dei livelli di PCR (*high sensitivity C-reactive protein, hsRCP*) nel modello di rischio, sulla base di NRI, ha permesso di meglio classificare oltre 20% dei pazienti in una categoria di rischio appropriata. È stato inoltre osservato un effetto di modulazione dei livelli di hsCRP nel miglioramento della capacità predittiva (*figura 14*), suggerendo che ridotta capacità di riparazione vascolare e infiammazione sistemica siano due pathways distinte di malattia cardiovascolare che sinergizzano nel predire outcomes avversi.

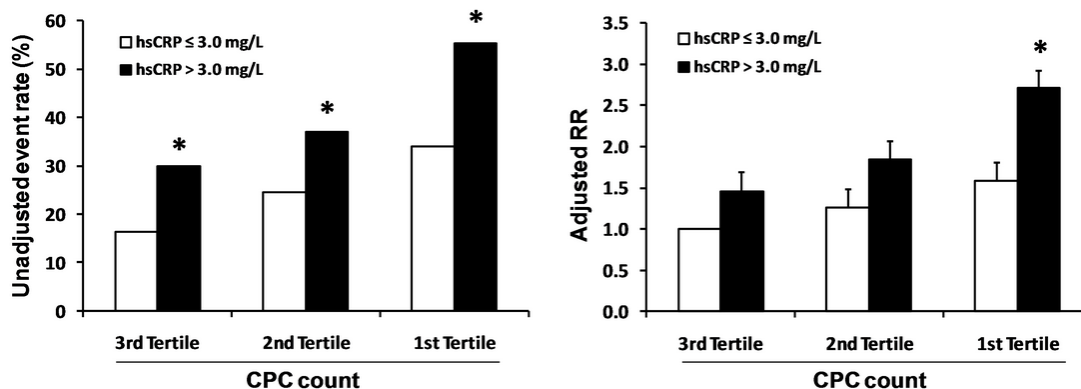


Figura 14: interazione tra conta di CPCs (Circulating Progenitor Cells, CPCs o HSPCs circolanti) (suddivisione in terzili) e livelli di hsCRP. I pazienti sono stati divisi in 6 gruppi in base alla combinazione tra terzile di CSCs e livelli di hsCRP (< > 3.0 mg/dl). Sono riportati i grafici di sviluppo degli eventi non aggiustati in base ai confondenti (la differenza in χ^2 pazienti tra i due gruppi con $hsCRP \leq 3.0$ mg/dl e $hsCRP \geq 3.0$ mg/dl è significativa) e con rischio relativo RR aggiustato secondo Bars (si osserva differenza statisticamente significativa in base a hsCRP per i pazienti con conta di CSCs nel primo terzile) (157).

9.5 Significato clinico della riduzione delle cellule staminali circolanti nei pazienti con diabete di tipo 2

La relazione tra HSPCs e stato di malattia del DMT2 è quindi complessa, in quanto i livelli in circolo sono influenzati non solo dal DMT2 in sé, ma anche dai concomitanti fattori di rischio.

Uno studio trasversale condotto nel 2010 dal gruppo di Fadini (158) su 425 soggetti, di cui erano noti al basale lo stato del metabolismo glucidico e i parametri cardiovascolari, era finalizzato a delineare un andamento ideale dei livelli di HSPCs CD34+ nella storia naturale della malattia.

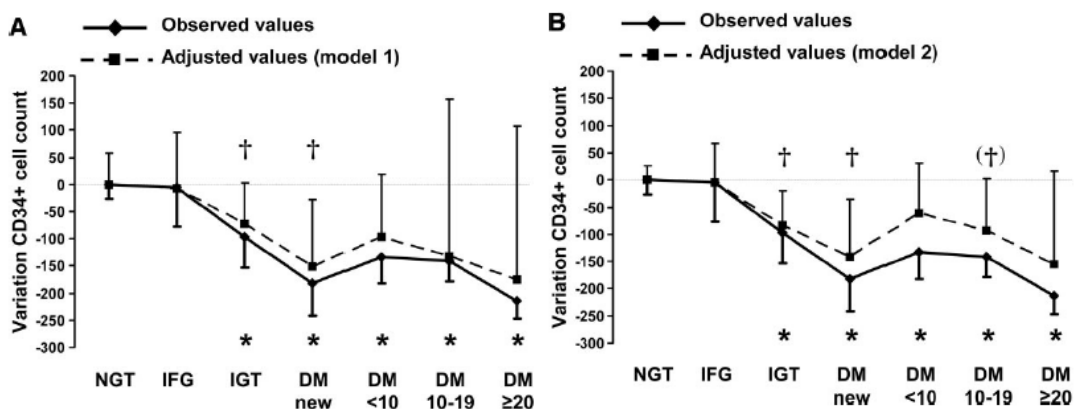


Figura 15: variazioni della conta delle cellule CD34⁺ nel sangue periferico (n° cellule/ 10^6 eventi) nella storia naturale del diabete di tipo 2. È stato assunto come punto zero il valore medio osservato nei pazienti con normale tolleranza al glucosio (Normal glucose tolerance, NGT). Le barre indicano gli IC al 95%. Sono stati applicati due modelli di regressione lineare multipla, rappresentati rispettivamente nelle figure A e B, per correggere la variazione di CD34⁺ rispetto a possibili confondenti (età, sesso, glicemia, A1C, BMI, fumo, pressione sistolica e diastolica, colesterolo totale, HDL, LDL, trigliceridi, retinopatia diabetica, CKD, CVD, farmaci) (158). * Indica i valori osservati che differiscono significativamente dai valori NGT. † Indica i valori aggiustati che differiscono significativamente dai valori NGT.

È stato osservato un declino precoce nei soggetti con alterata glicemia a digiuno (Impaired fasting glucose, IFG) e un declino maggiore nei soggetti con alterata tolleranza al glucosio IGT (Impaired glucose tolerance, IGT) (-21.9%; $P=0.016$ dopo correzione di Bonferroni). In pazienti con nuova diagnosi di DMT2 si ha un primo nadir dei livelli di HSPCs (-40.8%; $P = 0.001$). I livelli inferiori riflettono probabilmente uno stato di aumentata suscettibilità al danno negli stadi precoci di DMT2 e decorre parallelamente all'osservazione che >50% dei pazienti con nuova diagnosi di DMT2 ha manifestazioni precliniche e cliniche di complicanze microvascolari e/o macrovascolari. Quindi, dopo l'introduzione della terapia, è

stato osservato un ripristino dei livelli di HSPCs in pazienti controllati con interventi sullo stile di vita e trattamento farmacologico, ma successiva discesa dopo >20 anni di malattia (-47.9%; $p = 0.001$ rispetto a NGT; $p = 0.43$ rispetto a nuovo esordio). L'influenza di fattori confondenti in questo ulteriore calo è inferiore, suggerendo l'avvenuto esaurimento della riserva funzionale e della capacità di adattamento del midollo osseo. L'obiettivo del trattamento farmacologico deve quindi essere anche la preservazione a lungo termine del midollo osseo, all'interno di un approccio di prevenzione di malattia cardiovascolare e di complicanze microangiopatiche. È stato osservato un trend simile, ma meno consistente, di variazione della conta delle cellule EPCs CD34⁺ KDR⁺.

La possibilità meccanicistica che la disfunzione midollare sia un substrato patogenetico comune di eventi cardiovascolari e di microangiopatia giustificherebbe l'impiego dei livelli di HSPCs come marker prognostico anche per le complicanze microvascolari.

È stata testata questa ipotesi in uno studio pseudoprospectivo condotto su 187 pazienti con diabete di tipo 2 (159) di cui erano noti i livelli di HSPCs/EPCs al baseline, seguiti in un follow up di durata media di 3.9 anni, il cui obiettivo è stato testare se i livelli di CD34⁺/CD133⁺KDR⁺ siano predittivi di esordio/progressione di complicanze microangiopatiche. I dati raccolti al baseline sono: età, sesso, BMI, durata del diabete, HbA1c, uACR, creatinina sierica (calcolo di eGFR secondo CKD-Epidemiology Collaboration formula, 63) concomitanti fattori di rischio, quali ipertensione, dislipidemia, fumo, presenza di complicanze microvascolari (nefropatia, retinopatia, neuropatia somatica periferica e autonoma) e macrovascolari (coronaropatia, arteriopatia periferica, aterosclerosi asintomatica) e terapia farmacologica.

Al baseline 58.8% dei pazienti aveva una complicanza macroangiopatica e 46.5% almeno una complicanza microangiopatica. Durante il follow up, 70 pazienti (37.4%) hanno sviluppato una complicanza microangiopatica, equivalente a un tasso annuale di 9.5%.

Il tasso annuale di progressione dell'escrezione urinaria di albumina (*urinary albumin excretion rate, uAER*), di CKD, retinopatia e neuropatia era rispettivamente di 2.9%, 3.0%, 3.8% e 2.5%.

I pazienti sono stati divisi in due gruppi equivalenti sulla base dei valori di HSPCs e EPCs rispetto al valore mediano della coorte e seguiti nel follow up (*tabella IX*).

Tabella IX: riassunto delle differenze delle caratteristiche al baseline e/o degli outcomes in base all'immunofenotipo cellulare usato per distinguere i due gruppi (159).

Immunofenotipo cellulare	Osservazioni al baseline e outcomes
CD34 ⁺	<p>I livelli baseline di cellule CD34⁺ erano significativamente inferiori nei pazienti con progressione di uAER e qualunque complicanza microvascolare; tuttavia tale significatività scompare dopo controllo FDR (<i>False Discovery Rate, FDR</i>) per CKD, retinopatia e neuropatia.</p> <p>Nei pazienti con bassa conta di CD34⁺ è stata osservata maggiore incidenza di microalbuminuria (uACR>30 mg/g), CKD e progressione di microangiopatia rispetto ai pazienti con conta più alta, tuttavia tale associazione con progressione di retinopatia e di neuropatia scompare dopo controllo FDR.</p> <p>La conta di CD34⁺, in un'analisi di regressione logistica multivariata aggiustata per età, sesso, BMI, HbA1c, durata di diabete, prevalenza di ipertensione, dislipidemia, fumo, presenza di macroangiopatia al baseline, durata del follow up, rimane significativamente associata con progressione di uAER, retinopatia, neuropatia e ogni complicanza microangiopatica.</p> <p>Nei pazienti con elevata conta di CD34⁺, l'uso di inibitori del RAAS era associata a un tasso significativamente inferiore di progressione di microalbuminuria, ma tale effetto protettivo è perso nei pazienti con bassa conta di CD34⁺ (p<0.05). L'interazione tra la conta di CD34⁺ e la terapia con RAAS inibitori rimane significativa nell'analisi multivariata.</p>
CD133 ⁺ KDR ⁺	<p>Nei pazienti con bassa conta di cellule CD133⁺KDR⁺ è stata osservata maggiore incidenza di microalbuminuria, CKD e di ogni complicanza microvascolare, La bassa conta di cellule CD34⁺CD133⁺KDR⁺ è associata esclusivamente con la progressione di CKD dopo controllo FDR.</p> <p>La conta di cellule CD133⁺KDR⁺ rimane significativamente associata con progressione di uAER, neuropatia e ogni complicanza microangiopatica,</p>
CD34 ⁺ CD133 ⁺ KDR ⁺	<p>La conta di cellule CD34⁺CD133⁺KDR⁺ rimane significativamente associata con progressione di uAER e ogni complicanza microangiopatica.</p>

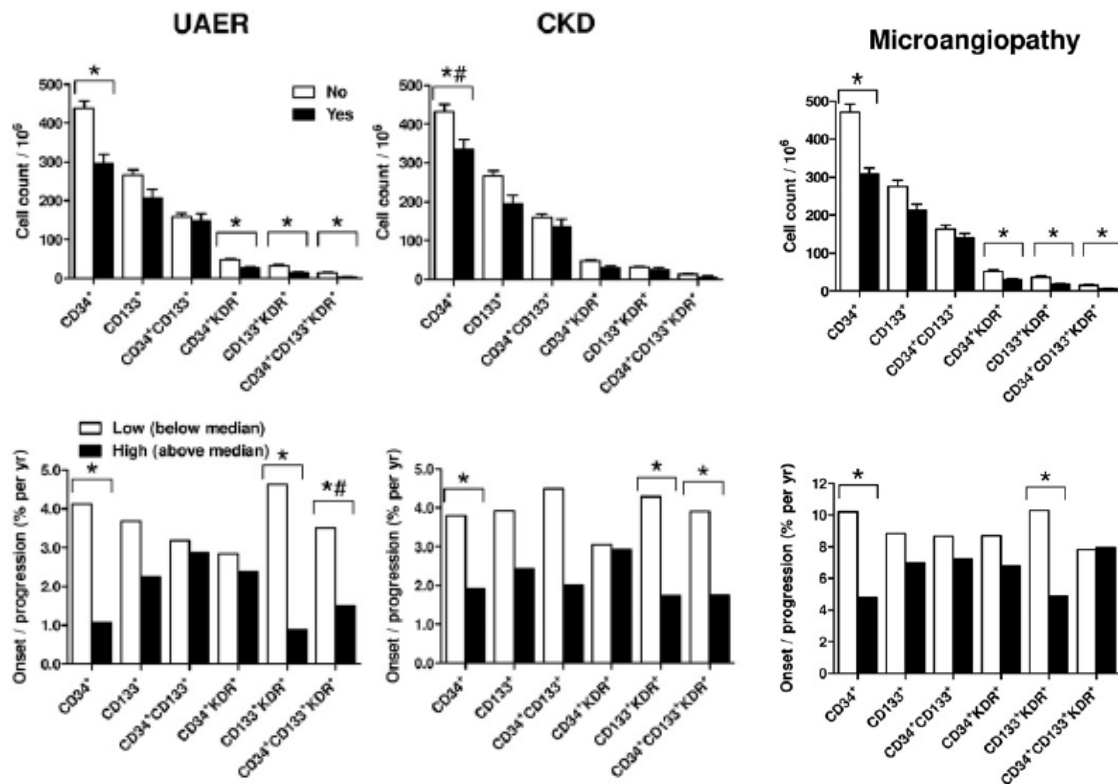


Figura 16: associazione tra conta di HSPCs e progressione di UAER, CKD e delle complicanze microangopatiche. Superiormente sono riportati i grafici che mostrano la conta dei diversi immunofenotipi di HSPCs/EPCs (espressa come media \pm SEM) confrontata tra i soggetti che non hanno e hanno sviluppato durante il follow up la progressione di uAER, CKD e ogni complicanza microangiopatica. Inferiormente è riportata l'incidenza della progressione della complicanza microvascolare nei pazienti categorizzati in base ai livelli di HSPCs/EPCs per ogni immunofenotipo (valori alti e bassi in base alla mediana dei livelli). *, $p < 0.05$; #, non significativo dopo correzione FDR (159).

Focalizzandosi sulle complicanze renali del diabete, dal punto di vista meccanicistico, la correlazione con la ridotta mobilitazione HSPCs è imputabile alla perdita del contributo alla rigenerazione delle cellule endoteliali glomerulari danneggiate. Infatti le cellule del midollo osseo originano sia le cellule mesangiali che i podociti (160), mentre è controversa la capacità di differenziamento nelle cellule endoteliali glomerulari (161). Per osservare tale ruolo del midollo osseo nella riparazione del danno renale, è stato condotto un esperimento su topi resi chimerici dal trapianto di cellule del midollo osseo da topi transgenici per induzione dell'espressione da parte delle cellule del BM della proteina GFP (*green fluorescent protein, GFP*). Su tali modelli è stata indotta una glomerulonefrite con gli anticorpi monoclonali anti-Thy1 e eseguita nefrectomia unilaterale (modello *1-kidney*).

A 2 e 11 settimane sono stati isolati i glomeruli e eseguito l'esame istologico. I topi *1-kidney* presentano lesioni di glomerulosclerosi progressive con riduzione della densità capillare in immunofluorescenza, alterazioni tubulari atrofiche diffuse e infiltrazione cellulare interstiziale, che decorre parallelamente a progressiva insufficienza renale. Diversamente nei topi *2-kidney*, in cui non è stata eseguita nefrectomia, l'architettura glomerulare risulta ripristinata; è quindi suggerito il ruolo dell'iperperfusion glomerulare nella progressione della glomerulosclerosi indotta dall'iniezione di anti-Thy1 (162). È stata osservata l'espressione intraglomerulare dei marcatori delle cellule derivate dal midollo osseo: il marker endoteliale PECAM-1 (*platelet and endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1*) e RECA-1 (*rat endothelial cell antigen 1, RECA-1*), il marker mesangiale OX-7, in co-espressione con GFP delle cellule del BM trapiantato, determinano una colorazione giallo fluorescente visibile in microscopia. Nei modelli *1-kidney* le lesioni glomerulari sono più severe e le capacità rigenerative e di neoangiogenesi inferiori. In questi modelli, con tecniche di analisi di RT-PCR è stata mostrata una significativa soppressione dell'espressione dell'mRNA di PECAM-1 e VEGF; in particolare studi precedenti hanno mostrato il ruolo di VEGF nel modulare il differenziamento delle EPCs in vitro e la cinetica e mobilizzazione in vivo dal BM, suggerendo che VEGF abbia un ruolo nella crescita delle cellule endoteliali, nel differenziamento e nella mobilizzazione. Nel complesso nei modelli di rimodellamento delle strutture glomerulari dopo danno, il processo di rivascolarizzazione è un fattore chiave nel determinare la prognosi dopo lesione glomerulare. Apre scenari terapeutici di riparazione della progressione irreversibile di glomerulosclerosi tramite somministrazione di EPCs e successiva stimolazione dell'angiogenesi con VEGF (162).

9.6 Strategie terapeutiche

Sono state osservate correlazioni tra le strategie terapeutiche adottate nel paziente diabetico e la riduzione dei livelli delle HSPCs circolanti (*tabella X*).

Tabella X: elenco dei principali meccanismi che spiegano l'effetto dell'intervento terapeutico/ farmaco nella riduzione delle HSPCs circolanti.

Strategia terapeutica	Effetti sui livelli di HSPCs circolanti
Cambiamenti dello stile di vita, calo ponderale negli obesi	È stato proposto che la capacità dell'esercizio fisico di migliorare il numero e la funzione delle EPCs dipenda dai mediatori VEGF, G-CSF e CXCL12 (163).
Statine	Effetto indipendente dall'effetto ipolipemizzante. Le statine nelle cellule endoteliali attivano la protein chinasi Akt e quindi all'attivazione post-trascrizionale di eNOS via fosforilazione della Ser1177 (164)
Terapie ipoglicemizzanti	È stata osservata in studi osservazionali una correlazione inversa tra i livelli di HbA1c e i livelli di HSPCs/EPCs (165). Ma alcuni farmaci contribuiscono con meccanismi ulteriori.
Inibitori di DDP-4	Prevengono la degradazione enzimatica di CXCL12 con conseguente aumento dei livelli di HSPCs circolanti, effetto clinicamente dimostrato per sitagliptina, glimepiride, vidalglipitina e linagliptina. L'effetto è stato osservato in acuto in pochi giorni (166, 167).
SGLT2 inibitori	In modelli murini con DMT1 è stato osservato che la dapaglifozina ha ripristinato la mobilizzazione cellulare dal BM nei siti di danno vascolare (168)
Tiazolidinedioni	È stato osservato che l'attivazione di PPAR γ , per effetto del pioglitazone, in vitro, favorisce la ripolarizzazione dei macrofagi M1 in M2, riduce l'espressione di OSM e riduce la concentrazione intramidollare di CXCL12. Nei topi diabetici, il pioglitazone ha un effetto di downregolazione di OSM, p66Shc e CXCL12 nel midollo ematopoietico, ripristino degli effetti di GCS-F nella mobilizzazione delle HSPCs, ma incrementa gli adipociti nel BM. L'espressione di CXCL12 da parte degli adipociti del BM potrebbe limitare gli effetti di ripristino della mobilizzazione delle HSPCs (137).

È stato ipotizzato un possibile beneficio aggiuntivo nell'uso degli inibitori di DPP-4 nei pazienti diabetici con CKD.

In un piccolo studio randomizzato crossover caso-controllo (166), condotto su 46 pazienti, dopo 4 giorni di trattamento con linagliptina rispetto al placebo, non sono stati osservati cambiamenti significativi della glicemia a digiuno, della lipidemia e trigliceridemia. L'attività di DPP4 correla inversamente con la concentrazione di GLP-1 attiva (*glucagon-like peptide 1, GLP1*), CXCL12 e IL12 e direttamente con la concentrazione di CCL22. Dopo 4 giorni di terapia, è stato osservato un incremento significativo dei livelli delle cellule CD34⁺ CD133⁺ e delle cellule CD34⁺ KDR⁺ e della percentuale di monociti CX3CR1 (fenotipo M2: CX3CR1 CD163⁺/CD206⁺). I pazienti con CKD avevano al baseline livelli inferiori delle cellule progenitrici CD34⁺ (p=0.06), CD133⁺ (p<0.001) e CD34⁺CD133⁺ (p=0.002), CD34⁺KDR⁺ (p=0.06) e proinfiammatorie M1 (p=0.035), ma gli effetti della terapia su questi elementi non sono significativamente più rilevanti, se aggiustati per le variabili cliniche. I pazienti con CKD hanno un elevato rischio cardiovascolare (169) e CKD è associata ad un'alterazione nel processo di ripolarizzazione dei macrofagi M1 in M2 (170). In presenza di danno tissutale, il rilascio di fattori induce il differenziamento dei macrofagi nel fenotipo M1 che contribuiscono alla risposta infiammatoria; successivamente, nel giro di giorni o settimane, i macrofagi M1 ripolarizzano nel fenotipo M2, che rilascia fattori anti-infiammatori, fattori di crescita e citochine proangiogeniche che favoriscono il processo di riparazione (170). Questo suggerisce un maggiore beneficio degli effetti pleiotropici degli inibitori di DDP-4 nei pazienti con CKD.

Lo studio *Saxagliptin Assessment of Vascular Outcomes Recorded in Patients With Diabetes Mellitus* (167) ha analizzato la capacità della Saxagliptina di ridurre il tasso di eventi cardiovascolari in una popolazione di pazienti diabetici ad elevato rischio cardiovascolare, dimostrandone la non superiorità in *add-on* therapy rispetto al trattamento standard. Tuttavia è stato osservato che la Saxagliptina era significativamente associata a ridotto sviluppo e progressione di microalbuminuria, nonostante l'effetto ipoglicemizzante modesto (167).

Gli SGLT2 inibitori hanno potenzialità di protezione cardiovascolare ancora in gran parte sconosciute. È stato studiato se la riduzione dei livelli delle HSPCs possa essere uno dei meccanismi che spiegano tali potenzialità. A questo scopo è stato

recentemente studiato nel topo con DMT1 indotto da streptozocina se la dapaglifozina possa migliorare il traffico delle HSPCs al sito di danno vascolare nel diabete e eventuali vie molecolari che possano spiegare questo effetto (168). In modelli di danno endoteliale alle carotidi, indotto sperimentalmente da una corrente a basso voltaggio, valutato in termini di stravasamento di plasma con protocollo Blu di Evans, è stato osservato che nei topi con DMT1 la capacità di guarigione a 3 giorni dal danno era notevolmente ridotta ($5.5 \pm 1.1\%$) rispetto ai topi non diabetici ($40.0 \pm 1.3\%$; $p < 0.001$), ma era superiore nei topi diabetici trattati con dapaglifozina ($16.9 \pm 4.0\%$; $p = 0.02$). In topi chimerici BM-GFP⁺ è stato osservato l'accumulo di cellule derivate da BM-GFP⁺ migrate al sito di danno: nei topi non diabetici le cellule GFP⁺ erano più che raddoppiate a 3 giorni dal danno a livello della carotide, ma questo effetto era completamente assente nei topi resi diabetici da streptozocina. Il trattamento con dapaglifozina ha ripristinato la mobilizzazione delle cellule GFP⁺ al sito di danno carotideo a valori normali. Tale ripristino ha riguardato le cellule mature, granulociti e monociti, in particolare i granulociti CD49d⁺, di cui sono note le proprietà proangiogeniche (4-5% delle cellule GFP⁺ migrate nel topo non diabetico vs <2% nel topo con DMT1 indotto da STZ, $p < 0.001$).

In un piccolo trial clinico randomizzato su 46 pazienti (171) che ha confrontato placebo (n=31) e terapia con empaglifozina (n=15), non è stato osservato dopo 12 settimane una differenza statisticamente significativa nei livelli di CD34⁺ e CD34⁺KDR⁺. Dopo mesi di trattamento i livelli delle HSPCs/EPCs erano significativamente superiori rispetto al baseline, ma non tra i due gruppi, in conseguenza all'effetto ipoglicemizzante della terapia.

È importante tuttavia sottolineare che l'osservazione dell'associazione tra terapia e effetti sulle HSPCs/EPCs in modelli che mimano condizioni patologiche non implichi che l'incremento di HSPCs/EPCs migliori gli outcomes clinici. In un piccolo studio randomizzato in doppio cieco (n=26) è stato studiato se il plerixafor, antagonista di CXCR4, migliori la guarigione dalle ulcere ischemiche, stimolando la mobilizzazione delle HSPCs (172). Tuttavia, nonostante il ripristino nella mobilizzazione delle HSPCs, il tasso di guarigione completa in 6 mesi è stato 38.5% nel gruppo sottoposto a plerixafor vs 69.2% del gruppo placebo, suggerendo che i meccanismi che associano ripristino della mobilizzazione e outcomes vascolari devono essere investigati più in dettaglio.

SCOPO DELLO STUDIO

È stato esaminato in una coorte di pazienti con diabete di tipo 2 se la misurazione dei livelli di cellule staminali/progenitrici circolanti HSPCs possa migliorare la capacità dello score di rischio del CKD Prognosis Consortium (*Morgan et al. 2022, 66*) di predire lo sviluppo degli outcomes renali di lungo termine. Nel paziente diabetico i livelli di HSPCs sono ridotti (158) e associati alla patologia cardiovascolare (157).

MATERIALI E METODI

1. Identificazione e caratterizzazione dei pazienti

Lo studio è stato condotto in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki. Tutti i pazienti hanno fornito il consenso informato per l'analisi delle HSPCs e per l'impiego in futuri studi clinici. Il protocollo è stato approvato dalla Commissione Etica dell'Università di Padova (prot. no. 20507).

I pazienti hanno eseguito prelievo di sangue presso la UOC di Malattie del Metabolismo dell'Azienda Ospedaliera di Padova nel periodo compreso tra gennaio 2004 a aprile 2019. Sono stati raccolti dati di follow-up sulla eGFR e albuminuria fino a dicembre 2022.

I criteri di inclusione sono stati: diabete di tipo 2 e quantificazione al basale dei livelli di HSPCs circolanti nel sangue periferico.

I criteri di esclusione sono stati: neoplasia solida o ematologica; citopenia (WBC <3000/ μ L o RBC <3,000,000/ μ L o PLT <50,000/ μ L); processo infiammatorio acuto in atto; patologia autoimmune attiva o uso di corticosteroidi; demenza attiva; severa patologia epatica (cirrosi Child B o C); ESRD (stadio V di CKD); consenso informato non fornito.

Le informazioni note per ogni paziente sono: demografiche (età, sesso, durata di diabete); antropometriche (altezza, peso, circonferenza addominale); fattori di rischio cardiovascolari (obesità, fumo; valori pressori e diagnosi di ipertensione; lipidemia e diagnosi di dislipidemia); complicanze diabetiche; terapia farmacologica in atto per la cura del diabete e di altre eventuali comorbidità.

Tabella XI: elenco delle definizioni cliniche delle patologie dei pazienti arruolati nello studio.

Complicanza diabetica o comorbidità	Definizione
Retinopatia diabetica	Esame del fundus oculi con retinografia digitale. La retinopatia diabetica viene classificata secondo <i>Early Treatment Diabetic Retinopathy classification (ETDRS)</i> (173): <ul style="list-style-type: none"> - Assenza di retinopatia apparente - Retinopatia diabetica non proliferante modesta: riscontro di almeno un microaneurisma capillare

	<ul style="list-style-type: none"> - Retinopatia diabetica non proliferante moderata: microaneurismi capillari e emorragie retiniche puntiformi o a macchia. Possibile riscontro di essudati duri, noduli cotonosi, dilatazioni venose, anomalie intravascolari retiniche. - Retinopatia diabetica non proliferante severa (<i>International Classification</i>): riscontro di tutti i seguenti reperti in assenza di segni di retinopatia proliferante: <ul style="list-style-type: none"> o ≥ 20 emorragie retiniche in ognuno dei 4 quadranti o Dilatazioni venose ben definite in ≥ 2 quadranti o Anomalie microvascolari intraretiniche in ≥ 1 quadrante - Retinopatia proliferante: presenza di una delle due seguenti caratteristiche: <ul style="list-style-type: none"> o Neovascolarizzazioni visibili sul nervo ottico e/o sulla superficie retinica o Emorragia vitreale o retinica
Nefropatia diabetica	<p>eGFR < 60 ml/min/1.73 m² o UACR \geq 30mg/g di creatinina La eGFR è stata calcolata con equazione CKD-Epidemiology Collaboration formula, riportata di seguito (63).</p> $eGFR = 141 \times \min\left(\frac{Scr}{k}, 1\right)^\alpha \times \max\left(\frac{Scr}{k}, 1\right)^{-1.209} \times 0.993^{age} \times 1.018 \text{ (if female)} \times 1.159 \text{ (if black)}$ <ul style="list-style-type: none"> • Sesso femminile: alpha = -0.329; kappa = 0.7 • Sesso maschile: alpha = -0.411; kappa = 0.9
Neuropatia periferica somatica	<p>Basata su:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Riscontro di sintomi: parestesie/disestesie o dolore della parte distale di mani o piedi, ipotonia dei muscoli di mani o piedi - Esame clinico con test di valutazione della sensibilità neurosensoriale (valutazione della soglia della sensibilità vibratoria con diapason, <i>pinprick test</i> e test di sensibilità con estesiometro monofilamento calibrato a 10g) e dei riflessi della caviglia - Elettromiografia e studio della conduzione nervosa, se necessario
Neuropatia autonoma cardiovascolare	<p>I segni clinici sono: tachicardia a riposo, intolleranza all'esercizio fisico e ipotensione ortostatica. È stata definita in base alla positività ai test di funzionalità autonoma cardiovascolare: <i>deep breathing</i> (serie di espirazioni e inspirazioni forzate), manovra di Valsalva (espirazione forzata contro resistenza), il <i>lyng-to-standing</i> (alzarsi in piedi dopo essere stati sdraiati su un lettino) e riscontro di ipotensione ortostatica.</p>

Aterosclerosi carotidea	Riscontro con ecodoppler carotideo di una stenosi $\geq 30\%$ in uno o più siti.
Arteriopatia periferica	Storia di claudicatio, dolore a riposo o ulcere ischemiche, con conferma all'imaging di stenosi in arterie degli arti inferiori.
Scompenso cardiaco	Definita dalla presenza o dal peggioramento delle tipiche manifestazioni cliniche (dispnea, ortopnea, dispnea parossistica notturna, edema, crepitii polmonari basali, turgore giugulare, terzo tono o ritmo di galoppo, evidenza radiologica di peggioramento dello scompenso), dalla necessità di modificare o di aumentare il dosaggio della terapia farmacologica (diuretici, inotropi, vasodilatatori), alterazioni di esami ematochimici (per es. <i>brain natriuretic peptides BNP</i>). Storia di ospedalizzazione per scompenso cardiaco o riscontro di una frazione di eiezione $< 40\%$ con ecocardiogramma.
Fibrillazione atriale	Reperti ECG diagnostici di fibrillazione atriale: <ul style="list-style-type: none"> - Assenza di onde p - Presenza di onde f (fibrillatorie) tra i complessi QRS, irregolari per frequenza e morfologia; ondulazioni di base a frequenza $>300/\text{min}$ (ben visibili in V1, non sempre in tutte le derivazioni) - Intervalli R-R irregolarmente irregolari
Coronaropatia	<ul style="list-style-type: none"> - Storia di infarto miocardico, definito dalla presenza di almeno due tra i seguenti tre criteri: elevazione di biomarker miocardiocitonecrosi (troponine), alterazioni ECG coerenti con ischemia epicardica/subendocardica/transmurale, evidenza all'imaging di miocardio non vitale o di ipocinesia - Storia di angina instabile, definita da nuovo esordio o da peggioramento di angina in condizioni di riposo, in assenza di un'elevazione dei biomarkers di miocardiocitonecrosi e in presenza alterazioni ECG della ripolarizzazione ventricolare (tratto ST o onda T) - Storia di rivascolarizzazione coronarica
Ipertensione	Pressione sistolica ≥ 140 mmHg e pressione diastolica ≥ 90 mmHg oppure uso di farmaci antipertensivi
Dislipidemia	Colesterolo totale >200 mg/dl o LDL (<i>Low Density Lipoprotein</i>) ≥ 130 mg/dL o trigliceridi ≥ 150 mg/dL o uso di statine/fibrati.

2. Determinazione delle cellule staminali circolanti

L'analisi dei livelli di HSPCs è stata eseguita in campioni di sangue periferico con tecnica di citofluorimetria a flusso. I globuli rossi sono stati lisati con una soluzione contenente 150 mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 e 100 μM Na_2EDTA e le cellule sono

marcate usando i seguenti anticorpi: 15 μ L FITC mouse anti-human CD34 (Becton Dickinson), 5 μ L di APC mouse anti-human CD133 (Miltenyi Biotec) e 15 μ L di PerCP mouse anti-human CD45. Per ogni campione è stato acquisito almeno 1 milione di eventi utilizzando un citofluorimetro FACSCanto (BD Biosciences). Le HSPCs sono state definite come CD34⁺, CD133⁺ e CD34⁺CD133⁺. L'immaturità cellulare è stata confermata dalla ridotta espressione di CD45⁺. La conta cellulare è stata espressa come numero assoluto di cellule/ ml.

3. Definizione degli outcomes e follow up

L'endpoint primario era composito:

- Nuovo esordio di macroalbuminuria, definita come uACR \geq 300mg/g, confermata in almeno due misurazioni (*urine Albumin-Creatinine Ratio, uACR*)
- Declino sostenuto di eGFR $>$ 40% per almeno 6 mesi
- ESRD (*end-stage renal disease, ESRD*) definita come eGFR $<$ 15 ml/min/1.73 m² persistente per almeno 6 mesi di osservazione
- Morte, per causa cardiovascolare, renale, per neoplasia o altro. L'informazione della morte dei pazienti è stata ottenuta accedendo al registro anagrafico.

Le analisi sono state aggiustate per i fattori predittivi noti di patologia renale nella popolazione con DMT2 (*Gerstein HC et al, 174*).

Gli outcomes secondari includevano le singole componenti dell'outcome primario, il declino di eGFR del 30% e del 57%, lo *slope* annuale di eGFR, i cambiamenti nel tempo di eGFR e di uACR. Si tratta di endpoints surrogati di outcomes renali del lungo termine approvati dalla *Food and Drug Administration* (Levey, Greene et al. 2019, 111).

4. Analisi statistica

Le variabili continue, con distribuzione normale, sono espresse come media e deviazione standard (SD), se non altrimenti specificato. Per le variabili che non hanno distribuzione normale, secondo test non parametrico di Kolmogorov-

Smirnov, è stata eseguita trasformazione logaritmica e poi sono state analizzate con test parametrici e presentate come mediana e scarto interquartile. Le variabili categoriali sono presentate in percentuale.

I pazienti sono stati divisi in due gruppi equivalenti sulla base del valore di HSPCs CD34⁺ individuato rispetto al valore mediano della coorte.

Il confronto tra i due gruppi, per variabili continue, è stato eseguito con test t di Student, per variabili categoriali (associazione tra endpoint e conta al basale di HSPCs bassa/alta) con test χ^2 . Gli outcomes categoriali sono stati valutati usando il modello di regressione multipla di Cox.

I cambiamenti nel tempo di eGFR e di uACR sono stati comparati usando il modello misto per le misure ripetute: tempo, gruppo (conta alta di HSPCs rispetto a conta bassa di HSPCs) e l'interazione tempo-gruppo sono stati considerati fattori fissi e il loro effetto è stato stimato. Sono state usate come strutture di covarianza le strutture autoregressivo di primo ordine o simmetria del composto.

Lo *slope* annuale di eGFR è stato comparato tra i gruppi usando analisi di regressione lineare univariata o multivariata.

Tutte le analisi sono state aggiustate per tutti i seguenti fattori predittivi di outcomes renali, identificati dal CKD Prognosis Consortium (66), rilevati al baseline: età, sesso, BMI, pressione sistolica, HbA1c, UACR, fibrillazione atriale, scompenso cardiaco, coronaropatia, terapia con insulina, ipoglicemizzanti orali o antiipertensivi. La significatività statistica è stata considerata per $p < 0.05$. Verificatosi l'endpoint primario, gli endpoints secondari sono stati testati gerarchicamente con procedura di Benjamin-Hochberg.

E' stata comparata la capacità predittiva degli outcomes renali tra modello 1, basato sullo score di rischio proposto dal CKD Prognosis Consortium, e il modello 2, che aggiunge l'informazione livelli bassi/alti di HSPCs.

Le curve ROC (*Receiver-Operating-Characteristic curves, ROC*) sono state costruite per tutti i possibili cut-offs per entrambi i modelli ed è stata stimata l'area sotto la curva ROC (*Area Under The Curve, AUC* o C-statistica). La bontà di adattamento è misurata con test di Hosmer-Lemeshow. Come alternativa di misura del rischio, sono stati calcolati il *relative Integrated Discrimination Index (rIDI)* e il *Net Reclassification Index (NRI)*.

Le analisi di valutazione del miglioramento della performance di predittività sono state eseguite usando modelli di regressione logistica (Kennedy et al. 2010, 175).

Sono stati usati per le analisi statistiche *IBM SPSS Statistics* (versione 28 o successiva) o SAS software (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e GraphPad Prism 5 per disegnare le figure.

RISULTATI

1. Caratteristiche basali dei pazienti

Si tratta di uno studio pseudoprospectivo con valore mediano di follow up di 6.7 anni. Sono stati inclusi nello studio 342 pazienti (67.8% di sesso maschile) di età media di 65.6 anni. È stata determinata al baseline la conta di cellule HSPCs CD34⁺ con tecnica di citofluorimetria a flusso, espresse come n° di cellule/ml.

I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi equivalenti (n=171) bassa conta di HSPCs e alta conta di HSPCs in base al valore dei livelli rispetto al valore mediano della coorte (valore mediano CD34⁺ HSPCs=2428 cell/ml).

La durata media di diabete era 13.4 anni e il valore medio di HbA1c era 8%. Tra i partecipanti, il 36.2% soffriva anche di scompenso cardiaco, coronaropatia o arteriopatia periferica, mentre il 39.5% al baseline soffriva di nefropatia diabetica.

Circa 2/3 (68.4%) dei pazienti era in terapia con metformina e 38.3% con insulina, con o senza altri farmaci ipoglicemizzanti. Al momento di ingresso nello studio, i pazienti seguivano una terapia farmacologica appropriata per la gestione dei fattori di rischio cardiovascolari.

Il valore mediano di HSPCs misurato è stato di 2428 cellule/ml.

Tabella XII: caratteristiche basali dei pazienti arruolati, suddivisi in funzione della conta di HSPCs.

	Pazienti reclutati	Pazienti con bassa conta di HSPCs	Pazienti con alta conta di HSPCs	Valore di p
Numero	342	171	171	
Caratteristiche demografiche e antropometriche				
Età, anni	65.6 (10.6)	67.8 (10.4)	63.4 (10.4)	<0.001
Sesso maschile, %	67.8	63.7	71.9	0.106
Durata del diabete, anni	13.4 (10.0)	13.0 (10.1)	13.8 (10.0)	0.470

Indice di massa corporea (<i>Body mass index, BMI</i>), kg/m ²	29.3 (5.9)	28.7 (5.0)	29.9 (6.6)	0.045
Circonferenza addominale, cm	101.2 (14.5)	99.5 (16.6)	102.9 (11.7)	0.028
Fattori di rischio e esami ematochimici				
Fumatori attuali, %	14.0	12.3	15.8	0.352
Storia di tabagismo, %	7.0	6.4	7.6	0.662
Pressione arteriosa sistolica, mm Hg	141.0 (18.9)	142.5 (19.3)	139.5 (18.5)	0.144
Pressione arteriosa diastolica, mm Hg	72.5 (11.3)	71.3 (11.7)	73.7 (10.9)	0.053
Ipertensione, %	84.5	88.9	80.1	0.025
HbA1c, %	8.0 (1.6)	8.1 (1.8)	7.9 (1.3)	0.173
Colesterolo totale, mg/dl	169.7 (40.9)	168.8 (42.7)	170.7 (39.1)	0.660
Colesterolo HDL, mg/dl	48.5 (14.3)	48.1 (14.5)	48.9 (14.1)	0.567
Colesterolo LDL, mg/dl	94.1 (34.3)	93.8 (35.8)	94.3 (32.8)	0.895
Trigliceridi, mg/dl	139.5 (102.2)	136.9 (90.9)	142.0 (112.6)	0.649
uACR, mg/g	123.8 (405.7)	182.3 (528.9)	65.3 (208.8)	0.008
Creatinina sierica, mg/dl	1.0 (0.4)	1.0 (0.4)	1.0 (0.4)	0.583
eGFR, ml/min/1.73 m ²	77.6 (20.4)	75.0 (21.0)	80.1 (19.4)	0.021
Complicanze				
Retinopatia, %	32.7	32.7	32.7	1.000
Nefropatia, %	39.5	45.0	33.9	0.036
Neuropatia, %	20.8	23.5	18.1	0.221
Fibrillazione atriale, %	0.6	1.2	0.0	0.157
Scompenso cardiaco, %	1.2	2.3	0.0	0.044
Coronaropatia, %	20.5	19.3	21.6	0.593
Arteriopatia periferica, %	24.3	28.1	20.5	0.102

Aterosclerosi carotidea, %	56.1	57.9	54.4	0.515
Farmaci				
Metformina, %	68.4	66.1	70.8	0.353
Sulfaniluree, %	27.2	26.9	27.5	0.904
Glinidi, %	3.8	3.5	4.1	0.778
Tiazolidinedioni, %	3.2	1.2	5.3	0.032
Insulina, %	38.3	38.6	38.0	0.912
Inibitori del RAAS, %	71.3	74.3	68.4	0.233
Altri farmaci anti-ipertensivi, %	59.1	66.1	52.0	0.008
Statine, %	71.1	67.8	74.3	0.191
Antiaggreganti, %	54.7	56.1	53.2	0.588

2. Follow up e outcomes

La mediana di follow up è stata 6.7 anni, con scarto interquartile di 4.1-10.0 anni.

La media dello *slope* annuale di eGFR è stata -1.75 ml/min/1.73 m².

I tassi di incidenza degli endpoints sono espressi in eventi/1000 pazienti per anno.

Il tasso di incidenza dell'endpoint renale composito è stato 81 eventi/1000 persone per anno. L'outcome a maggiore tasso di incidenza è stato il declino sostenuto di eGFR>30%, seguito dal nuovo esordio di macroalbuminuria, mentre lo sviluppo di ESRD è stato un evento raro.

Il rischio stimato medio in 3 anni di declino di eGFR \geq 40% o di sviluppo di ESRD, applicando lo score di rischio di CKD Prognosis Consortium (66), è stata del 26%. Durante il periodo totale di follow up, questo outcome è stato sviluppato da 55 pazienti, che corrisponde ad un'incidenza cumulativa di 16.6% e un tasso di incidenza di 24.3/1000 pazienti per anno. Il rischio stimato sulla base delle caratteristiche al baseline è stato quindi superiore a quello effettivo e ha mostrato una capacità di discriminazione modesta (AUC=0.69; 95% I.C. 0.62-0.76) (*figura 20*).

88 pazienti sono morti e le cause di morte sono state suddivise in: cardiovascolari 58.0%, neoplastica 21.6%, renale 4.5%, altro 15.9%.

3. Livelli di HSPCs circolanti e outcomes renali

I due gruppi di pazienti presentavano caratteristiche cliniche differenti (*tabella XII*): i pazienti con bassa conta di HSPCs erano significativamente più anziani ($p=0.001$), con BMI e circonferenza addominale leggermente inferiori ($p<0.05$), ma con maggiore prevalenza di ipertensione ($p=0.025$), uso di farmaci anti-ipertensivi (anti-ipertensivi non inibitori del RAAS $p=0.008$), scompenso cardiaco ($p=0.044$) e nefropatia (45.0% vs 33.9%; $p=0.036$), evidenziata al baseline da eGFR inferiore (75.0 ml/min/1.73 m² vs 80.1, $p=0.021$) e uACR superiore (182.3 mg/g vs 65.3, $p=0.008$).

La differenza di impiego del pioglitazone tra i due gruppi (1.2% vs 5.3% $p=0.032$, *tabella XII*) è coerente con l'osservazione che il pioglitazone aumenti la conta di HSPCs (137).

I tassi di incidenza degli endpoints sono stati dicotomizzati in funzione del gruppo di appartenenza (bassa/alta conta di HSPCs al baseline).

L'endpoint primario composito è stato osservato meno frequentemente nei pazienti con alta conta di HSPCs rispetto ai pazienti con bassa conta (*figura 18*) (105.4 rispetto a 60.3 eventi su 1000 pazienti per anno, *adjusted HR*=0.69; I.C 0.49-0.97; $p=0.034$, *figura 17*). Questo risultato dipende in gran parte dal tasso minore di declino sostenuto di eGFR>40% (*figura 18*) (36.1 rispetto a 11.5 eventi su 1000 pazienti per anno, *adjusted HR* 0.41; 95% C.I. 0.21-0.79; $p=0.008$, *figura 17*), che è stato confermato anche dall'uso degli endpoints surrogati di riduzione di eGFR >30% e >57% (*figura 17*).

Gli eventi di nuovo esordio di macroalbuminuria, sviluppo di ESRD, morte per ogni causa erano numericamente inferiori nei pazienti con conta alta di HSPCs, ma la differenza di rischio non è risultata significativa tra i due gruppi (*figura 17 e 18*).

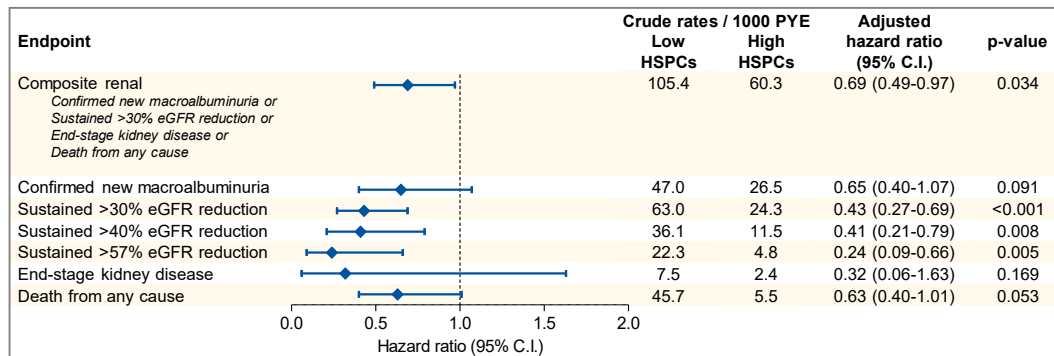


Figura 17: forest plot di confronto degli outcomes renali tra i due gruppi di pazienti, espressi come numero di eventi/1000 pazienti per anno. Sono riportati l'hazard ratio HR con intervallo di confidenza I.C e rispettivi valori di p.

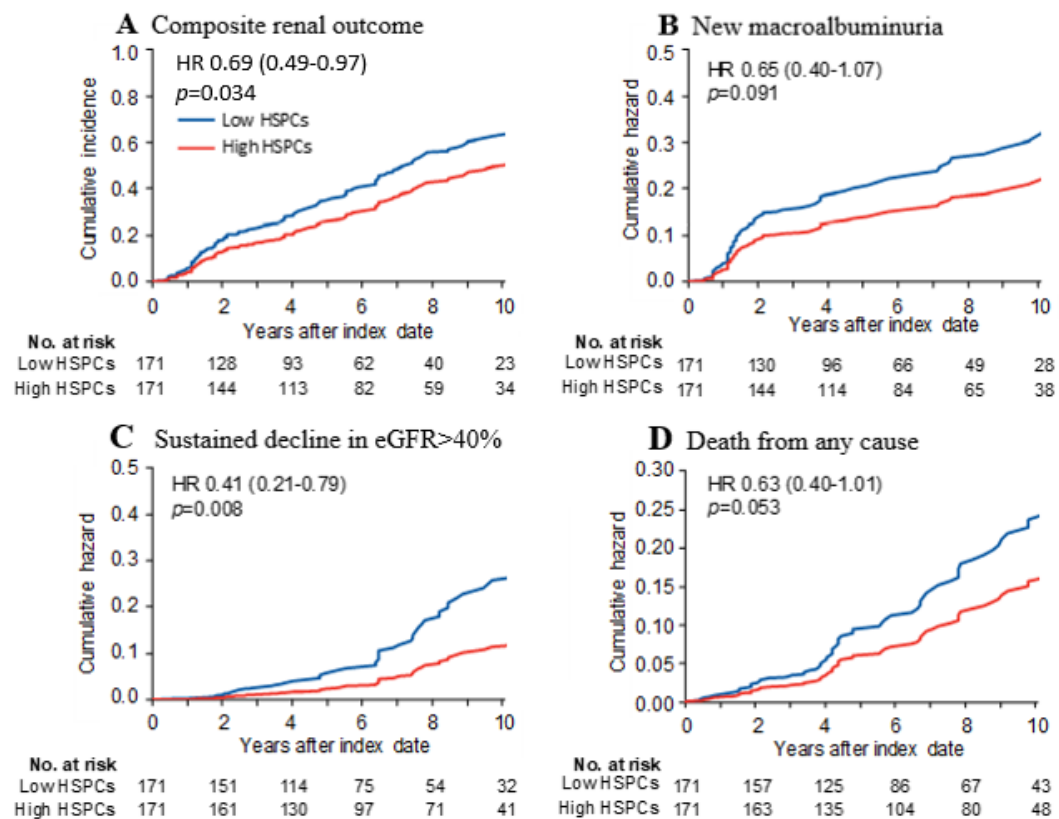


Figura 18: curve di incidenza degli outcomes renali e numero di pazienti a rischio in ogni gruppo (bassa conta di HSPCs e alta conta di HSPCs) per ogni anno di osservazione. Sono riportati gli hazard ratio e gli intervalli di confidenza al 95%, calcolati con modelli di regressione di Cox, con i rispettivi valori di p.

A) Outcome renale composto di nuovo esordio di macroalbuminuria, declino sostenuto del 40% di eGFR, sviluppo di ESRD e morte per ogni causa. B) Nuovo esordio di macroalbuminuria. C) Declino sostenuto di eGFR $\geq 40\%$; D) Morte per ogni causa.

Le curve sono state interrotte a 10 anni, perchè dopo i 10 anni il numero di pazienti a rischio era molto basso. Non è riportata la curva di incidenza di ESRD perchè il numero di eventi è troppo piccolo ($n=12$).

L'endpoint *slope* annuale di eGFR osservato nei gruppi caratterizzati da bassa conta di HSPCs e alta conta di HSPCs è stato rispettivamente -3.4 ml/min/1.73 m² e 0.01 ml/min/1.73 m² (unadjusted $p < 0.001$). Dopo aggiustamento per i fattori predittivi di perdita della funzionalità renale, inclusi nel score di rischio del CKD Prognosis Consortium (66), la media dello *slope* annuale di eGFR è risultata 3.3 ml/min/1.73 m² più negativa nei pazienti con bassa conta di HSPCs ($p < 0.001$).

La *figura 19A* illustra i cambiamenti nel tempo di eGFR nei due gruppi. Dopo aggiustamento, la differenza al baseline di eGFR è stata ridotta (*figura 19B*) e la differenza LSM (*least square mean, LSM*) durante il follow up è risultata 10.2 ml/min/1.73 m² ($p < 0.001$).

Durante tutta l'osservazione, la media geometrica di uACR è risultata significativamente inferiore tra i pazienti con alta conta di HSPCs al baseline (*figura 19C*). Tuttavia, dopo aggiustamento per il valore al baseline (log naturale), il cambiamento nel tempo di uACR è risultato simile tra i gruppi (*figura 19D*).

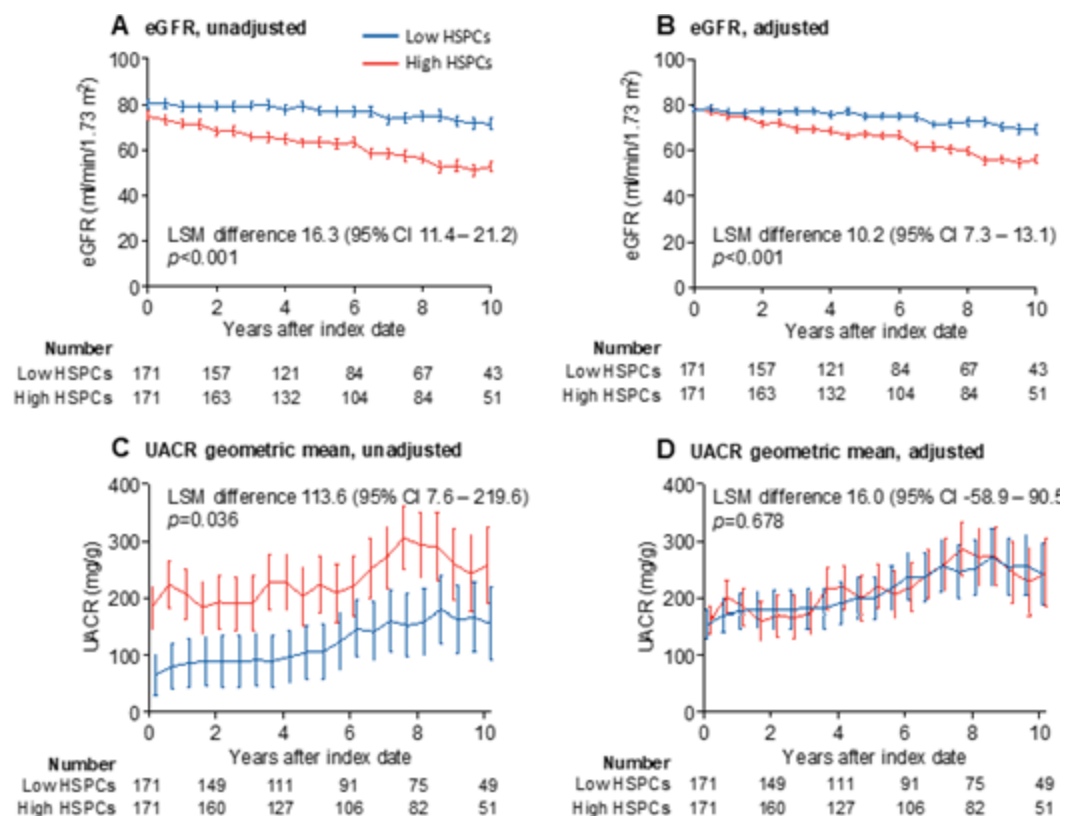


Figura 19: variazioni di eGFR e di uACR negli anni, in funzione dei livelli di HSPCs al baseline. È mostrata la modifica nel tempo di eGFR, calcolata usando un modello misto di misure ripetute, prima (figura 19A) e dopo (figura 19B) aggiustamento per i fattori predittivi di perdita della funzionalità renale secondo il CKD Prognosis Consortium.

Analogamente si illustrano le modifiche nel tempo della media geometrica di uACR prima (figura 19 C) e dopo (figura 19D) aggiustamento. Le curve sono state interrotte a 10 anni. Sono riportati i n° dei pazienti a rischio per ciascun gruppo, la differenza di LSM tra i gruppi insieme ai rispettivi valori di p. Le barre indicano l'errore standard.

4. Conta di HSPCs e capacità predittiva degli outcomes renali avversi

È stato valutato l'effetto dell'implementazione della conta di HSPCs nella capacità predittiva dell'equazione di rischio proposta dal CKD Prognosis Consortium di declino di eGFR \geq 40% o sviluppo di ESRD. Come mostrato nella *figura 20*, l'aggiunta dell'informazione alta/bassa conta di HSPCs allo score di rischio, ha comportato un incremento significativo di AUC da 0.695 a 0.751 (+0.056; 95% CI 0.008 to 0.104, p=0.022). Il modello presentava una buona calibrazione secondo test di Hosmer-Lemeshow (p=0.7).

E' stato osservato un significativo incremento di rIDI (+30.6%; p= 0.018) e di NRI (NRI 0.59; 95% CI 0.33-0.84; p<0.0001) con il 50% degli eventi e 9% dei non eventi correttamente riclassificati con il nuovo modello rispetto a quello precedente.

207 pazienti erano in prevenzione renale primaria, ossia avevano valori di eGFR >60 ml/min/1.73 m² e di uACR <30 mg/g. In questi pazienti, la discriminazione del rischio secondo lo score del CKD Consortium Prognosis non era significativa (AUC 0.564; 95% C.I. 0.415-0.712), ma è diventata significativa dopo l'aggiunta dell'informazione alta/bassa conta di HSPCs (AUC 0.670; 95% C.I. 0.531-0.808).

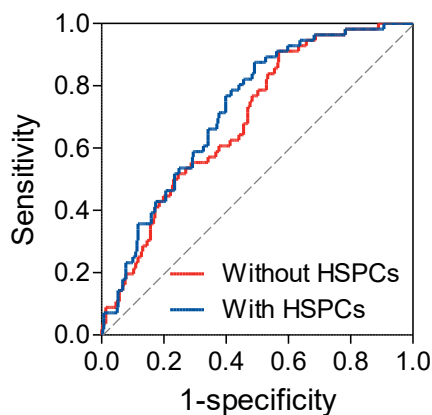


Figura 20. C-statistica di rischio di sviluppo dell'outcome composto di declino di eGFR \geq 40% o sviluppo di ESRD calcolata usando lo score di rischio proposto dal CKD Prognosis Consortium senza (linea rossa) e con (linea blu) implementazione dell'informazione bassa/alta conta di HSPCs.

DISCUSSIONE

1. Riassunto dei risultati principali

Nei pazienti con DMT2, osservati per oltre 10 anni, è emerso che livelli di HSPCs circolanti superiori al valore mediano esercitano un importante effetto protettivo contro la perdita della funzionalità renale e lo sviluppo nel lungo termine di outcomes renali avversi.

Inoltre, l'aggiunta della misura della conta delle HSPCs allo score di rischio proposto dal CKD Prognosis Consortium ha migliorato significativamente la capacità di discriminare i pazienti che svilupperanno successivamente outcomes renali avversi, anche in prevenzione primaria.

2. Contestualizzazione e interpretazione dei risultati

Questo studio clinico si colloca all'interno di una visione più ampia del ruolo della disfunzione midollare nella patogenesi delle complicanze microangiopatiche e degli eventi cardiovascolari (158, 159).

In particolare, dal punto di vista meccanicistico, è stata illustrata l'ipotesi che la cosiddetta "mobilopatia diabetica" rientri all'interno di un processo di stress ossidativo e disfunzione endoteliale, conseguente allo stato di iperglicemia cronica (133). Il midollo osseo è suscettibile al danno ossidativo, cui consegue la compromissione del microambiente midollare (microangiopatia del midollo osseo, 138), che spiega in parte la ridotta mobilizzazione delle HSPCs o la loro riduzione nel circolo periferico.

Questo processo è intrinsecamente interconnesso all'espansione della mielopoiesi e allo stato di infiammazione cronica che caratterizza la patologia (141, 145, 170).

La funzione delle cellule staminali circolanti è ancora dibattuta, ma c'è evidenza di una loro possibile plasticità differenziativa, che ne assegna una funzione nella riparazione tissutale (160, 161, 162). L'esaurimento qualitativo e quantitativo delle HSPCs nel decorso cronico del diabete decorre parallelamente allo sviluppo di complicanze microangiopatiche e macroangiopatiche (158).

A livello renale, in modelli sperimentali, le cellule derivate dal midollo osseo raggiungono il sito di danno vascolare e partecipano al turnover cellulare endoteliale del glomerulo. Questo meccanismo, osservato in modelli animali, potrebbe essere operativo anche negli esseri umani: nei pazienti che hanno subito un trapianto di midollo osseo *sex-mismatched*, le cellule del donatore hanno contribuito al turnover e alla rigenerazione del parenchima renale, incluse le cellule tubulo-interstiziali, come osservato nelle biopsie renali (176).

L'osservazione in uno studio precedente (Fadini, 2015; 159) che la bassa conta di CD34⁺ in una coorte di pazienti diabetici sia significativamente associata a progressione di uAER, retinopatia, neuropatia e ogni complicanza microangiopatica, dopo correzione per i fattori di rischio cardiovascolare, ha fornito il presupposto per applicare il medesimo rationale per outcomes renali nel lungo termine in questa popolazione.

In questo studio, i due gruppi bassa e alta conta di HSPCs differivano in maniera significativa al baseline per presenza di nefropatia, valori di eGFR e di uACR. Elevati livelli di HSPCs si associavano a un declino di eGFR più lento, mentre il cambiamento nel tempo di uACR, dopo aggiustamento, è risultato simile tra i due gruppi. Questa osservazione potrebbe suggerire una correlazione tra ridotti livelli di HSPCs e fenotipo DKD non albuminurico, una condizione caratterizzata da maggiore rischio cardiovascolare e mortalità (47). Quindi, si può ipotizzare che i ridotti livelli di HSPCs possano essere epifenomeno della progressiva disfunzione renale e dei fattori di rischio cardiovascolare. È infatti stato ipotizzato che siano la macroangiopatia e i fattori di rischio CV (per es. obesità 177, ipertensione 178 e iperuricemia 178) a contribuire al fenotipo di DKD non albuminurico (48), piuttosto che le complicanze microangiopatiche.

La microangiopatia del midollo osseo è caratterizzata da rarefazione di sinusoidi, capillari e arteriole, che contribuisce alla creazione di un ambiente ipossico, con conseguente stress ossidativo e compromissione delle interazioni cellula-cellula, che ne aumenta la permeabilità (138). Tale stato del midollo osseo espone le HSPCs ad un ambiente pro-ossidante che ne compromette la funzionalità.

È noto che nelle persone con DMT2, l'albuminuria è un segno di disfunzione vascolare, non limitata alla glomerulopatia (29, 30). È quindi biologicamente plausibile che l'associazione stabile nel tempo tra albuminuria e HSPCs sia dovuta

alla disfunzione vascolare generalizzata, determinata a monte dalla disfunzione endoteliale e dallo stress ossidativo indotti dall'iperglicemia, responsabili del rimodellamento microvascolare e dell'alterazione della permeabilità che coinvolgono similmente glomerulo e midollo osseo. È un meccanismo che spiega in parte l'impatto prognostico dell'albuminuria sugli outcomes microvascolari (es. outcomes renali, 66) e macrovascolari (29) del diabete di tipo 2. Inoltre dal punto di vista terapeutico, questo dato può suggerire l'efficacia degli inibitori di DPP4 nella riduzione dello sviluppo e della progressione della microalbuminuria (Saxagliptina, 167) per ripristino della mobilizzazione delle HSPCs dal midollo osseo.

Dal punto di vista clinico, è stato mostrato come l'aggiunta dell'informazione conta alta/bassa delle HSPCs migliori la capacità predittiva della perdita della funzionalità renale degli scores basati solo su dati clinici. L'importanza del miglioramento della predittività di questi modelli è imposta dalla potenzialità degli SGLT2i e degli antagonisti dei recettori mineralcorticoidi non steroidei, soprattutto nei pazienti con DMT2, di prevenire lo sviluppo di CKD in prevenzione primaria, nei pazienti con normali eGFR e albuminuria (180).

L'osservazione in studi preclinici che la dapaglifozina riduca i livelli dei macrofagi M2 CD169⁺ e migliori la mobilizzazione delle cellule dal midollo osseo in siti di ischemia permette di ipotizzare che questo meccanismo possa essere coinvolto nelle capacità cardioprotettive e nefroprotettive della molecola (168). Tale correlazione è suggerita anche dal punto di vista clinico con canaglifozina (181) e empaglifozina (183).

Il trial clinico del gruppo di Nandula et al. 2021 (181) in pazienti con diabete di tipo 2 ha valutato gli effetti di protezione cardiovascolare della canaglifozina, in aggiunta alla metformina, usando la conta delle cellule CD34⁺ come biomarker cellulare di stima del rischio cardiovascolare (157), in un periodo di osservazione di 16 settimane. L'outcome primario era la variazione della conta delle cellule CD34⁺ (%CD34⁺ del totale della popolazione cellulare mononucleare), della loro funzione migratoria in risposta a CXCL12 e della loro espressione genica (markers antiossidanti, di apoptosi, di funzione endoteliale e di differenziamento endoteliale, di chemiotassi e di infiammazione). Sono stati valutati anche outcomes non cellulari rappresentativi della funzione endoteliale, quali la rigidità della parete arteriosa

(182) e i markers sierici IL6, hsCRP, Leptina, *Serum insulin*, TNF α . Infine è stato valutato l'effetto sulla salute dei podociti tramite misurazione dell'espressione esosomiale delle proteine Nefrina, *Wilm's Tumor* (WT-1) e *podocalaxyn like protein 1* (PODXL) in campioni urinari.

Nel gruppo sottoposto a terapia con canaglifozina, è stata osservata un'aumentata espressione del recettore CXCR4 con concomitante aumento della funzione migratoria delle cellule CD34⁺. L'analisi dell'espressione genica delle cellule CD34⁺ ha mostrato un incremento dell'espressione dei marker antiossidanti superossido dismutasi 2 e *Catalase and Glutathione Peroxidase* e dei marker di differenziamento endoteliale PECAM1, VEGF-A e di funzione endoteliale NOS3. Inoltre sono stati osservati una significativa riduzione dei livelli di Hb1Ac e di glucosio, insieme al miglioramento della pressione sistolica e diastolica, un incremento significativo di adiponectina e la ridotta espressione esosomiale delle proteine podocitarie nei campioni urinari.

Non è stato osservato un incremento significativo della conta delle cellule CD34⁺, ma dell'espressione di CXCR4 e CXCL12 suggerendo un incremento della capacità migratoria con effetti in un periodo di lungo termine (133). La sovra-regolazione dell'espressione e del segnale di VEGF-A suggerisce un ruolo della canaglifozina nella vasculogenesi e nella riparazione tissutale. L'incremento dell'espressione di adiponectina e la riduzione dei livelli sierici di IL-6 indicano un miglioramento della salute endoteliale.

Nel trial EMPA-HEART Cardiolink-6 (Verma et al. 2019, 183) sono stati misurati, in pazienti con DMT2 e patologia coronarica, i livelli di HSPCs al baseline e sei mesi dopo trattamento con empaglifozina. In questo studio è stato studiato l'impatto di empaglifozina sulle cellule esprimenti marker di staminalità, ad elevata espressione dell'enzima con funzione antiossidante aldeide-deidrogenasi (*aldehyde dehydrogenase, ALDH*). L'elevata espressione di ALDH è indicativa della conservata funzionalità dei progenitori cellulari nella modulazione dello stress ossidativo. Questa popolazione è stata distinta in base alla complessità intracellulare (*side scatter complexity, SSC*). Nel gruppo trattato con empaglifozina, è stata osservata una ridotta frequenza delle cellule circolanti ALDH^{hi}SSC^{hi}, che identificano i granulociti proinfiammatori (184), aumentata frequenza delle cellule ALDH^{hi}SSC^{mid} che identificano i monociti (184), mentre è uguale la frequenza

delle cellule ALDH^{hi}SSC^{low} che identificano rare cellule circolanti progenitrici con funzione pro-angiogenetica (185, 186). All'interno della popolazione ALDH^{hi}SSC^{mid} sono stati quantificati i macrofagi con proprietà pro-infiammatorie M1 CD169⁺(170), che sono risultati significativamente ridotti, e M2 CD163⁺, con proprietà pro-angiogenetiche (170), che sono risultati significativamente aumentati. Nel complesso, questi studi mostrano che empaglifozina favorisce il differenziamento dei progenitori cellulari con capacità pro-angiogenetica e riduce le cellule infiammatorie in pazienti con DMT2 e patologia cardiovascolare, contribuendo alla generazione di un microambiente permissivo alla rigenerazione vascolare.

Quindi, le cellule CD34⁺ possono essere un biomarker valido della funzione endoteliale e nel setting del diabete di tipo 2 possono orientare le scelte terapeutiche. Il diabete di tipo 2 è una patologia che grava sulla salute pubblica mondiale e l'introduzione di uno score di rischio di sviluppo di CKD efficace potrebbe migliorare l'allocazione delle risorse permettendo una prescrizione più mirata di SGLT2 inibitori in prevenzione primaria.

In questo studio, i livelli di HSPCs sono stati espressi come conta di CD34⁺, che, rispetto ad altri immunofenotipi, è un marker facilmente misurabile in citofluorimetria e dotato della capacità informativa più diretta dello stato del midollo osseo (154). Inoltre, non per tutti i pazienti era nota la conta di CD133⁺.

3. Limiti dello studio

A fronte di un tempo di follow up lungo, la dimensione campionaria era relativamente piccola, soprattutto per il numero di eventi di outcomes più rari per es. ESRD o mortalità causa-specifica.

In aggiunta la coorte è stata reclutata per un periodo di oltre 15 anni, durante i quali sono cambiati gli standards di cura per la gestione del diabete, dei fattori di rischio cardiovascolare e renale. Infine sono cambiati anche i lotti dei reagenti e la calibrazione degli strumenti. Ne consegue un certo grado di eterogeneità nella conta dei progenitori cellulari che potrebbe inficiare sulla forza delle associazioni individuate.

La performance dello score sviluppato dalla CKD Prognosis Consortium ha un importante margine di miglioramento, che può essere ottenuto implementando anche altri biomarcatori, non misurati in questo studio. Sono esempi i marcatori di infiammazione *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, *kidney injury molecule-1*, *tumor necrosis factor–receptor superfamily members 1A and 1B* (49) o *hsRCP* (157).

Inoltre, non sono state raccolte informazioni sulla funzione delle HSPCs, per es. del profilo differenziativo o sulla loro capacità migratoria.

4. Punti di forza

La malattia renale cronica nel diabete è la manifestazione di una patologia poliedrica, in cui microangiopatia e macroangiopatia sono interconnesse, e l'osservazione che i ridotti livelli di HSPCs siano responsabili del difetto di riparazione vascolare fornisce il substrato fisiopatologico che ne permette la comprensione come marker prognostico.

La complessità del paziente diabetico, e quindi della patologia renale, è crescente, in conseguenza alla diffusione della patologia e alla sovrapposizione di più fattori di rischio. Individuare elementi patogenetici a monte permette di classificare in entità nosologiche uniformi la DKD e quindi i rischi di outcomes avversi renali e cardiovascolari e dell'efficacia degli interventi. In particolare il fenotipo DKD non albuminurica/ non proteinurica è quello a maggiore diffusione (44), in cui la disfunzione renale sembra maggiormente correlata ai fattori di rischio cardiovascolari (47, 48). È quindi auspicabile una ricerca focalizzata sul ruolo delle HSPCs in questo fenotipo, nell'ottica che la riduzione dei livelli sia epifenomeno della correlazione tra i due elementi.

Dal punto di vista terapeutico, l'ipotesi che i meccanismi nefroprotettivi degli SGLT2 inibitori possano dipendere anche da meccanismi implicanti la mobilizzazione delle HSPCs (168, 181, 183), suggerisce che l'impiego di strategie di preservazione della funzione del midollo osseo e dei livelli delle HSPCs possano migliorare gli outcomes dei pazienti affetti da DMT2.

5. Conclusioni e prospettive future

In conclusione, alti livelli di HSPCs circolanti nei pazienti con DMT2 sono protettivi verso la perdita della funzione renale e sono biomarkers efficaci nel migliorare la predittività di sviluppo di outcomes renali nel lungo termine.

È prioritario riuscire a individuare i pazienti ad alto rischio di sviluppo di ESRD, in modo da poter attuare una strategia di prevenzione renale e cardiovascolare con SGLT2 inibitori e antagonisti dei recettori mineralcorticoidi non steroidei; infatti l'esito del declino della funzione renale in ESRD esclude ogni chance terapeutica alternativa alla terapia sostitutiva, riduce drasticamente la qualità e l'aspettativa di vita del paziente e grava pesantemente sul sistema sanitario.

L'impiego clinico della conta delle HSPCs nei modelli di stratificazione del rischio è limitato dall'uso della tecnica di citofluorimetria a flusso. Si tratta di uno strumento molto costoso, non disponibile in tutti i centri clinici e che richiede campioni di sangue fresco. Tuttavia oggi sono disponibili strumenti di citofluorimetria più semplici (187) e nuovi reagenti fissativi che potrebbero permettere analisi dilazionate nel tempo (188). Idealmente, l'introduzione di centri diagnostici *point-of-care* per la misura delle HSPCs CD34⁺ ne agevolerebbe l'impiego in studi multicentrici come biomarker clinico.

Inoltre, sono ancora necessari studi conclusivi su quale immunofenotipo abbia il maggiore potere prognostico e di protocolli di standardizzazione inter-laboratorio per la quantificazione delle HSPCs CD34⁺ negli studi sugli outcomes cardiovascolari di larga scala (189).

Dal punto di vista meccanicistico, lo studio del substrato fisiopatologico comune tra complicanze microvascolari e macrovascolari è ancora un campo aperto. Negli ultimi anni è stato individuato un nuovo fattore di rischio cardiovascolare nell'espansione clonale di HSPCs nel sangue periferico, in un processo definito ematopoiesi clonale a potenziale indeterminato (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP*).

Si tratta di un processo di espansione età-correlato determinato da mutazioni somatiche dei geni DNMT3A, TET2, ASXL1 e JAK2. Nonostante si tratti di un meccanismo pro-tumorale, questi soggetti non sviluppano neoplasie ematologiche, ma presentano un rischio 2-4 volte superiore di sviluppare coronaropatia, stroke e

morte cardiovascolare (190), configurandosi come un fattore di rischio di aterosclerosi (191). È noto che la malattia renale cronica sia associata ad un eccesso di rischio cardiovascolare, non spiegabile dai singoli fattori di rischio di aterosclerosi (169). È stata osservata una correlazione negativa tra l'ematopoiesi clonale e $eGFR_{cys}$ e tra ematopoiesi clonale mieloide e outcomes avversi nei pazienti con CKD (Dawoud et al. 2021, 192). È quindi auspicabile condurre degli studi che analizzino l'interconnessione tra CHIP, eccesso di mielopoiesi e ridotti livelli di HSPCs in circolo in un'unica ipotesi di fisiopatologia cardiovascolare che ne giustifichi la correlazione comune con outcomes cardiovascolari, in particolare nei pazienti con diabete di tipo 2 e con CKD. Inoltre il possibile valore prognostico della presenza di cloni cellulari mieloidi per outcomes avversi in pazienti con CKD ne suggerisce un ruolo potenziale di implementazione nei modelli predittivi.

BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018; 41 (Suppl 1):S13–27
2. International Diabetes Federation Diabetes Atlas 10th edition 2021, pp.35-38. www.diabetesatlas.org
3. Dati Istat 2017, statistiche del diabete in Italia 2000-2016, 20 luglio 2017, pp. 6. id: 202600.
4. Steven E Kahn, Mark E Cooper, Stefano Del Prato. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*. Published online December 4, 2013. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6)
5. Scott RA, Lagou V, Welch RP, et al, and the DIABetes Genetics Replication and Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium. Largescale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nature Genetics* 2012; 44: 991–1005
6. Chen M, Bergman RN, Porte D Jr. Insulin resistance and β -cell dysfunction in aging: the importance of dietary carbohydrate. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1988; 67: 951–57.
7. Guenard F, Deshaies Y, Cianflone K, Kral JG, Marceau P, Vohl M-C. Differential methylation in glucoregulatory genes of offspring born before vs. after maternal gastrointestinal bypass surgery. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2013; 110: 11439–44.
8. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 2013; 498: 99–103.
9. Donath MY, Størling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T. Inflammatory mediators and islet β -cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *The Journal of Molecular Medicine* 2003; 81: 455–70.
10. M. Brownlee et al.: The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. *Diabetes* 2005;54(6):1615–1625.
11. Gabbay KH, Merola LO, Field RA: Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science* 1966, 151:209–210

12. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, Brownlee M: Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* 2003, 112:1049–1057
13. Anastasia Poznyak et al. The Diabetes Mellitus–Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation. *Internal Journal of Molecular Sciences* 2020 Mar; 21(5): 1835. Published online 2020 Mar 6.
14. Paola Fioretto, Micheal Mauer Histopathology of diabetic nephropathy; *Seminars in Nephrology* 2007 Mar; 27(2): 195-207.
15. Brito P, Fioretto P, Drummund K, et al. Proximal tubular basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney International* 1998; 53: 754–761.
16. Harris RD, Steffes MW, Bilous RW, et al. Global glomerular sclerosis and glomerular arteriolar hyalinosis in insulin-dependent diabetes. *Kidney International* 1991; 40: 107–114
17. Fioretto P, Steffes MW, Mauer SM. Glomerular structure in non-proteinuric insulin-dependent diabetic patients with various levels of albuminuria. *Diabetes* 1994; 43: 1358–1364.
18. Y Saito 1 , H Kida, S Takeda, M Yoshimura, H Yokoyama, Y Koshino, N Hattori. Mesangiolytic in diabetic glomeruli: its role in the formation of nodular lesions *Kidney International* 1988, Vol. 34, pp. 389—396
19. Yasuhiro Oda, Masayuki Yamanouchi, Hiroki Mizuno, Rikako Hiramatsu, Tatsuya Suwabe, Junichi Hoshino, Naoki Sawa, Kenichi Ohashi, Takeshi Fujii, Yoshifumi Ubara. Significant polar vasculosis in a patient with a 30-year history of type 2 diabetes. *Endocrinology, Diabetes and Metabolism Case Reports* 2019: 19-0092. Published online 2019 Nov 12
20. Thijs W. Choen Tervaert et al. Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy; *Journal of the American Society of Nephrology* 2010, 21: 556–563
21. M. Luiza Caramori, Michael Mauer et al. Cellular Basis of Diabetic Nephropathy: Study Design and Renal Structural–Functional Relationships in Patients With Long-Standing Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2002 Feb; 51(2) :506-13
22. A.M. Signorini, C. Fondelli, G. Gragnoli: La diagnostica della nefropatia diabetica. *O.P.D. Giornale di Clinica Nefrologica e Dialisi* 1993; 5(3): 1-15
23. Najafian B, Crosson JT, Kim Y, et al. Glomerulotubular junction abnormalities are associated with proteinuria in type 1 diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006;17:S53–S60

24. Coward, R. & Fornoni, A. Insulin signaling: implications for podocyte biology in diabetic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2015, 24: 104–110
25. Kato, H. et al. Wnt/ β -catenin pathway in podocytes integrates cell adhesion, differentiation, and survival. *The Journal of Biological Chemistry* 2011, 286: 26003–26015.
26. Vallon, V. & Thomson, S. C. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *The Annual Review of Physiology* 2012, 74: 351–375.
27. Thomson SC, Vallon V, Blantz RC. Resetting protects efficiency of tubuloglomerular feedback. *Kidney International Supplements* 1998; 67: S65–70.
28. Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW: Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovascular Research* 1997; 34:55-68
29. Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Halle JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S, Yusuf S: Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *The Journal of American Medical Association* 2001; 286 :421–426
30. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2022. *Diabetes Care*. 2022 Jan; 45(1 suppl): S1-255.
31. Holly J. Kramer, MD, MPH; Quan Dong Nguyen, MD, MSc; Gary Curhan, MD, ScD; et al. Renal Insufficiency in the Absence of Albuminuria and Retinopathy Among Adults With Type 2 Diabetes Mellitus. *The Journal of American Medical Association* 2003; 289(24): 3273-3277
32. Parving HH, Hommel E, Mathiesen E. et al. Prevalence of microalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and neuropathy in patients with insulin dependent diabetes. *British Medical Journal (Clinical Research Edition)* 1988; 296: 156-160
33. Afkarian, M. et al. Clinical manifestations of kidney disease among US adults with diabetes, 1988-2014. *The Journal of American Medical Association* 2016; 316: 602–610
34. M. Oshima et al. Trajectories of kidney function in diabetes: a clinicopathological update. *Nature Reviews Nephrology* 2021; vol.17, pp. 740–750

35. Looker, H. C. et al. Changes in albuminuria but Not GFR are associated with early changes in kidney structure in type 2 diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology* 2019; 30: 1049–1059.
36. Fioretto, P., Steffes, M. W., Sutherland, D. E., Goetz, F. C. & Mauer, M. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *New England Journal Medicine* 1998; 339: 69–75.
37. No Authors Listed. Chapter 2: Definition, identification, and prediction of CKD progression. *Kidney International* 2013; Suppl. 3, 63–72
38. Yoshida, Y. et al. Conditions, pathogenesis, and progression of diabetic kidney disease and early decliner in Japan. *BMJ Open Diabetes Research & Care* 2020 Mar; 8(1): e000902. [doi: 10.1136/bmjdr-2019-000902](https://doi.org/10.1136/bmjdr-2019-000902)
39. Moriya, T., Yamagishi, T., Yoshida, Y., Matsubara, M. & Ouchi, M. Arteriolar hyalinosis is related to rapid GFR decline and long-standing GFR changes observed on renal biopsies in normo-microalbuminuric type 2 diabetic patients. *Journal of Diabetes and its Complications* 2021; 35: (4):107847.
40. Furuichi, K. et al. Clinicopathological features of fast eGFR decliners among patients with diabetic nephropathy. *BMJ Open Diabetes Research & Care* 2020 Jun; 8(1):e001157
41. Mise, K. et al. Clinical and pathological predictors of estimated GFR decline in patients with type 2 diabetes and overt proteinuric diabetic nephropathy. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2015; 31:572–581.
42. Krolewski, A. S. et al. Early progressive renal decline precedes the onset of microalbuminuria and its progression to macroalbuminuria. *Diabetes Care* 2014; 37: 226–234.
43. Oshima, M. et al. The relationship between eGFR slope and subsequent risk of vascular outcomes and all-cause mortality in type 2 diabetes: the ADVANCE-ON study. *Diabetologia* 2019; 62:1988–1997.
44. Vistisen, D. et al. Progressive decline in estimated glomerular filtration rate in patients with diabetes after moderate loss in kidney function-even without albuminuria. *Diabetes Care* 2019; 42: 1886–1894.
45. Yamanouchi, M., Furuichi, K., Hoshino, J., Ubara, Y. & Wada, T. Nonproteinuric diabetic kidney disease. *Clinical and Experimental Nephrology* 2020; 24: 573–581.
46. Shimizu, M. et al. Kidney lesions in diabetic patients with normoalbuminuric renal insufficiency. *Clinical and Experimental Nephrology* 2014; 18: 305–312.

47. Penno G, Solini A, Orsi E, Bonora E, Fondelli C, Trevisan R, Vedovato M, Cavalot F, Lamacchia O, Scardapane M, Nicolucci A, Pugliese G: Non-albuminuric renal impairment is a strong predictor of mortality in individuals with type 2 diabetes: the Renal Insufficiency And Cardiovascular Events (RIACE) Italian multicentre study. *Diabetologia* 2018; 61:2277-2289
48. Porrini E, Ruggenenti P, Mogensen CE et al. Non-proteinuric pathways in loss of renal function in patients with type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinology* 2015; 3:382–391
49. Merlin C, Thomas, Michael Brownlee et al. Diabetic kidney disease *Nature Reviews Disease Primers* 2015; vol.1, Article number: 15018
50. Pirart, J. Glycaemic control and development of diabetic nephropathy. *Acta Endocrinologica, Supplement* 51, 1981; 242: 41–42.
51. Christensen, P. K., Hansen, H. P. & Parving, H. H. Impaired autoregulation of GFR in hypertensive non-insulin dependent diabetic patients. *Kidney International* 1997; 52: 1369–1374.
52. Tolonen, N. et al. Lipid abnormalities predict progression of renal disease in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2009; 52: 2522–2530.
53. Tsuboi, N., Utsunomiya, Y. & Hosoya, T. Obesity-related glomerulopathy and the nephron complement. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2013; 28 (Suppl. 4): 108–113
54. Parvanova, A. I. et al. Insulin resistance and microalbuminuria: a cross-sectional, case-control study of 158 patients with type 2 diabetes and different degrees of urinary albumin excretion. *Diabetes* 2006; 55: 1456–1462.
55. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiological Reviews* 2003; 83:253–307.
56. Groop, P. H., Forsblom, C. & Thomas, M. C. Mechanisms of disease: pathway-selective insulin resistance and microvascular complications of diabetes. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* 2005; 1: 100–110.
57. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metabolism* 2008; 7: 95–96.
58. Chakkarwar, V. A. Smoking in diabetic nephropathy: sparks in the fuel tank? *World J. Diabetes* 2012; 3: 186–195.
59. TODAY Study Group *et al.* A clinical trial to maintain glycemic control in youth with type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* 2012; 366: 2247–2256.

60. Thomas, M. C., Groop, P. H. & Tryggvason, K. Towards understanding the inherited susceptibility for nephropathy in diabetes. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2012; 21: 195–202.
61. Barrett et al. Does gestational diabetes increase the risk of maternal kidney disease? A Swedish national cohort study. *PLoS One*. 2022; 17(3): e0264992.
62. Navdeep Tangri; Lesley A. Stevens, MD; John Griffith, et al. A Predictive Model for Progression of Chronic Kidney Disease to Kidney Failure. *Journal of the American Medical Association* 2011; 305(15): 1553-1559.
63. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J: A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Annals of Internal Medicine* 2009; 150: 604-612
64. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, et al.; CANVAS Program Collaborative Group. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* 2017; 377: 644–657
65. Wiviott SD, Raz I, Sabatine MS. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* 2019; 380: 1881–1882
66. Morgan E. Grams, Nigel J. Brunskill. Development and Validation of Prediction Models of Adverse Kidney Outcomes in the Population With and Without Diabetes. *Diabetes Care* 2022; 45: 2055–2063
67. Garabed Eknayan MD, Norbert Lameire MD, PhD (KDIGO executive committee), KDIGO 2022 clinical practice guideline for diabetes management in chronic kidney disease. *Kidney International* 2022; 102 (Suppl 5S), S1–S127, pp 3-35
68. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *New England Journal of Medicine* 2001; 345: 861–869.
69. Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, et al. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* 2001; 345: 870–878.
70. Makino H, Haneda M, Babazono T, et al. Prevention of transition from incipient to overt nephropathy with telmisartan in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007; 30: 1577–1578.
71. Keane WF, Brenner BM, de Zeeuw D, et al. The risk of developing endstage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy: the RENAAL study. *Kidney International* 2003; 63: 1499–1507.

72. Bernard Zinman, M.D., Christoph Wanner, M.D., John M. Lachin, Sc.D., David Fitchett, M.D. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 2015; 373: 2117-2128
73. Bruce Neal, M.B., Ch.B., Ph.D., Vlado Perkovic, M.B., B.S., Ph.D., Kenneth W. Mahaffey, M.D. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 2017; 377: 644-657
74. Stephen D. Wiviott, M.D., Itamar Raz, M.D., Marc P. Bonaca, M.D., M.P.H., Ofri Mosenzon, M.D et al. Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 2019; 380: 347-357
75. Christopher P. Cannon, M.D., Richard Pratley, M.D., Samuel Dagogo-Jack, M.D., D.Sc., James Mancuso, Ph.D. et al. Cardiovascular Outcomes with Ertugliflozin in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 2020; 383: 1425-1435
76. Vlado Perkovic, M.B., B.S., Ph.D., Meg J. Jardine, M.B., B.S., Ph.D., Bruce Neal, M.B., Ch.B., Ph.D., Severine Bompont, B.Sc. et al. Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *New England Journal of Medicine* 2019; 380: 2295-2306
77. Hidde J.L. Heerspink, Ph.D., Bergur V. Stefánsson, M.D., Ricardo Correa-Rotter, M.D., Glenn M. Chertow, M.D et al. Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *New England Journal of Medicine* 2020; 383: 1436-1446.
78. William G Herrington et al. Empagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *New England Journal of Medicine* 2023 Jan 12; 388(2): 117-127
79. Deepak L. Bhatt, M.D., M.P.H., Michael Szarek, Ph.D., Bertram Pitt, M.D., Christopher P. Cannon, M.D. et al. Sotagliflozin in Patients with Diabetes and Chronic Kidney Disease. *New England Journal of Medicine* 2021; 384: 129-139
80. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, et al. Dapagliflozin in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *New England Journal of Medicine* 2019; 381: 1995–2008
81. Packer M, Anker SD, Butler J, et al. Cardiovascular and renal outcomes with empagliflozin in heart failure. *New England Journal of Medicine* 2020; 383: 1413–1424.
82. Anker SD, Butler J, Filippatos G, et al. Empagliflozin in heart failure with a preserved ejection fraction. *New England Journal of Medicine* 2021; 385: 1451–1461.

83. Bhatt DL, Szarek M, Steg PG, et al. Sotagliflozin in patients with diabetes and recent worsening heart failure. *New England Journal of Medicine* 2021; 384: 117–128.
84. Vasilakou D, Karagiannis T, Athanasiadou E, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Internal Medicine* 2013; 159: 262–274.
85. Sternlicht H, Bakris GL. Blood pressure lowering and sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2i): more than osmotic diuresis. *Current Hypertension Reports* 2019; 21(2): 12.
86. Bakris GL, Agarwal R, Anker SD, et al. Effect of finerenone on chronic kidney disease outcomes in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* 2020; 383: 2219–2229.
87. Pitt B, Filippatos G, Agarwal R, et al. Cardiovascular events with finerenone in kidney disease and type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* 2021; 385: 2252–2263.
88. Staessen J, Lijnen P, Fagard R, et al. Rise in plasma concentration of aldosterone during long-term angiotensin II suppression. *Journal of Endocrinology* 1981; 91: 457-465.
89. Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, et al. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *New England Journal of Medicine* 2014; 370: 1383-1392.
90. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. *New England Journal of Medicine* 1999; 341: 709-717.
91. Mehdi UF, Adams-Huet B, Raskin P, et al. Addition of angiotensin receptor blockade or mineralocorticoid antagonism to maximal angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2009; 20: 2641-2650.
92. Juurlink DN, Mamdani MM, Lee DS, et al. Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. *New England Journal of Medicine* 2004; 351: 543-551.
93. Ito S, Kashihara N, Shikata K, et al. Esaxerenone (CS-3150) in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria (ESAX-DN): Phase 3 Randomized Controlled Clinical Trial. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2020; 15: 1715-1727.
94. Agarwal R, Filippatos G, Pitt B, et al. Cardiovascular and kidney outcomes with finerenone in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease: the FIDELITY pooled analysis. *European Heart Journal* 2021; 43: 1–12

95. Agarwal R, Anker SD, Bakris G, et al. Investigating new treatment opportunities for patients with chronic kidney disease in type 2 diabetes: the role of finerenone. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2022 May 25; 37(6): 1014-1023.
96. J.P Bonvalet. Regulation of sodium transport by steroid hormones. *Kidney International Supplements* 1998 Apr; 65: S49-56
97. Allan D Struthers. Aldosterone blockade in cardiovascular disease. *Heart*. 2004 Oct; 90(10): 1229–1234.
98. Nonsteroidal Mineralocorticoid Receptor Antagonism by Finerenone. Translational Aspects and Clinical Perspectives across Multiple Organ Systems Peter Kolkhof, Robert Lawatscheck *International Journal of Molecular Sciences* 2022 Aug; 23(16): 9243
99. Barrera-Chimal, J.; Jaisser, F. Vascular mineralocorticoid receptor activation and disease. *Experimental Eye Research* 2019, 188: 107796.
100. Kintscher, U.; Bakris, G.L.; Kolkhof, P. Novel non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonists in cardiorenal disease. *British Journal of Pharmacology* 2022, 179: 3220–3234.
101. The non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone prevents cardiac fibrotic remodeling Daniel Lavall. *Biochemical Pharmacology* 2019; 168: 173–183
102. Bertocchio, J. P., Warnock, D. G., & Jaisser, F. Mineralocorticoidreceptor activation and blockade: An emerging paradigm in chronic kidney disease. *Kidney International* 2011; 79, 1051–1060.
103. Ferreira, N. S., Tostes, R. C., Paradis, P., & Schiffrin, E. L. Aldosterone, inflammation, immune system, and hypertension. *American Journal of Hypertension* 2021; 34: 15–27
104. Barbaro, N. R., Kirabo, A., & Harrison, D. G. A new role of mister (MR) T in hypertension: Mineralocorticoid receptor, immune system, and hypertension. *Circulation Research* 2017, 120: 1527–1529.
105. Desai M, Stockbridge N, Temple R. Blood pressure as an example of a biomarker that functions as a surrogate. *AAPS Journal* 2006; 8(1):E146-E152.
106. Comper WD. The limited role of the glomerular endothelial cell glycocalyx as a barrier to transglomerular albumin transport. *Connective Tissue Research* 2014; 55(1):2-7.

107. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *American Physiological Society* 1981; 241(1):F85-F93.
108. Miller WG, Bruns DE, Hortin GL, et al. Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clinical Chemistry* 2009; 55(1):24-38.
109. Fried LF, Lewis J. Rebuttal of the pro view: albuminuria is an appropriate therapeutic target in patients with CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2015; 10(6):1095-1098.
110. Tom Greene et al. Performance of GFR Slope as a Surrogate End Point for Kidney Disease Progression in Clinical Trials: A Statistical Simulation. *Journal of the American Society of Nephrology* 2019 Sep; 30(9): 1756–1769
111. Levey AS, Inker LA, Matsushita K, et al. GFR decline as an end point for clinical trials in CKD: a scientific workshop sponsored by the National Kidney Foundation and the US Food and Drug Administration. *American Journal of Kidney Diseases* 2014; 64(6): 821-835.
112. Tom Greene, Chia-Chen Teng, Lesley A. Inker, Andrew Redd, Jian Ying, Mark Woodward, Josef Coresh and Andrew S. Levey. Utility and Validity of Estimated GFR–Based Surrogate Time-to-Event End Points in CKD: A Simulation Study. *American Journal of Kidney Diseases* 2014; 64(6): 867-879
113. Andrew S. et al. Change in Albuminuria and GFR as End Points for Clinical Trials in Early Stages of CKD: A Scientific Workshop Sponsored by the National Kidney Foundation in Collaboration With the US Food and Drug Administration and European Medicines Agency. *American Journal of Kidney Diseases* 2019. [doi: 10.1053/j.ajkd.2019.06.009](https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.06.009)
114. Coresh J, Heerspink HJL, Sang Y, et al. Change in albuminuria and subsequent risk of end-stage kidney disease: an individual participant-level consortium meta-analysis of observational studies. *Lancet Diabetes & Endocrinology* 2019;7(2): 115-127
115. Thompson A, Cattran DC, Blank M, Nachman PH. Complete and partial remission as surrogate end points in membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2015; 26(12): 2930-2937.
116. Inker LA, Mondal H, Greene T, et al. Early change in urine protein as a surrogate end point in studies of IgA nephropathy: an individual-patient meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases* 2016; 68(3):392-401.
117. Troost JP, Trachtman H, Nachman PH, et al. An outcomes-based definition of proteinuria remission in focal segmental glomerulosclerosis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2018; 13(3):414-421.

118. Eiichiro Kanda, Naoki Kashihara, Kunihiro Matsushita, Tomoko Usui, Hirokazu Okada, Kunitoshi Iseki, Kenichi Mikami, Tetsuhiro Tanaka, Takashi Wada, Hirotaka Watada, Kohjiro Ueki, Masaomi Nangaku. Guidelines for Clinical Evaluation of Chronic Kidney Disease. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2018; vol.22, pp. 1446–1475
119. Asahara T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* (80). 1997; 275 (5302): 964-7
120. Ashara T, Mausa 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. *Circulation Research* 1999 Aug 6; 85(3):221-8.
121. Lancrin C et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature*. 2009; 457(7231): 892-5
122. Feng T, Gao Z, Kou S, Huang X, Jiang Z, Lu Z, et al. No Evidence for Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Vascular Endothelial Cells in Multiple Organs. *Circulation Research*. 2020; 127:1221–1232.
123. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, Dignat-George F, Melero-Martin JM, Khosrotehrani K, et al. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Translational Medicine* 2017 May; 6(5): 1316-20.
124. Madeddu P, Emanuelli C, Pelosi E, Salis MB, Cerio AM, Bonanno G, et al. Transplantation of low dose CD34⁺KDR⁺ cells promotes vascular and muscular regeneration in ischemic limbs. *FASEB Journal* 2004; 18(14): 1737-9.
125. Case J, Mead LE, Bessler WK et al. Human CD34⁺AC133⁺VEGFR-2⁺ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Experimental Hematology* 2007; 35: 1109–1118.
126. GP Fadini, M. Albiero. Impaired Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Traffic and Multi-organ Damage in Diabetes. *Stem Cells*, 2022; 40: 716–723
127. Medina RJ, O’Neill CL, O’Doherty TM et al. Myeloid angiogenic cells act as alternative M2 macrophages and modulate angiogenesis through interleukin-8. *Molecular Medicine* 2011, 17:1045–1055.
128. Lin RZ, Moreno-Luna R, Li D et al. Human endothelial colony-forming cells serve as trophic mediators for mesenchymal stem cell engraftment via paracrine signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2014; 111:10137–10142.

129. Hanoun M, Frenette PS. This niche is a maze; an amazing niche. *Stem Cells*. 2013;12(4): 391-392
130. S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, et al. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell*. 2007;131(5): 994-1008.
131. Mendez-Ferrer S, Frenette P. Hematopoietic stem cell trafficking: regulated adhesion and attraction to bone marrow microenvironment. *Annals of the New York Academy of Sciences journal* 2007; 1116: 392-413. <https://doi.org/10.1196/annals.1402.086>.
132. Fadini GP, Boscaro E, de Kreutzenberg S, et al. Time course and mechanisms of circulating progenitor cell reduction in the natural history of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2010; 33(5): 1097-1102
133. G P Fadini, S Sartore, M Schiavon, M Albiero, I Baesso, A Cabrelle, C Agostini, A Avogaro, Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia* 2006; Dec 49 12: 3075-84
134. Daniel J Ceradini, Anita R Kulkarni Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine* 2004 Aug; 10(8): 858-64.
135. Daniel J Ceradini, Yao Decreasing Intracellular Superoxide Corrects Defective Ischemia-induced New Vessel Formation in Diabetic Mice. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283(16): 10930–10938.
136. Albiero M, Poncina N, Tjwa M, et al. Diabetes causes bone marrow autonomic neuropathy and impairs stem cell mobilization via dysregulated p66Shc and Sirt1. *Diabetes*. 2014; 63(4):1353-1365
137. Tedesco S, Ciciliot S, Menegazzo L, et al. Pharmacologic PPARgamma activation reprograms bone marrow macrophages and partially rescues HSPC mobilization in human and murine diabetes. *Diabetes*. 2020; 69(7): 1562-1572
138. Atsuhiko Oikawa et al. Diabetes Mellitus Induces Bone Marrow Microangiopathy. *American Heart Association Vol. 30*, 2010; pp. 498-508
139. Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature*. 2016; 532(7599): 323-328.
140. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *Journal of Experimental Medicine* 2011; 208(2): 261-271.

141. Prabhakara R Nagareddy, Ira J Goldberg et al..Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metabolism* 2013 May 7; 17(5): 695-708.
142. Schmidt, M.I., Duncan, B.B., Sharrett, A.R., Lindberg, G., Savage, P.J., Offenbacher, S., Azambuja, M.I., Tracy, R.P., and Heiss, G. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* 1999, 353: 1649–1652
143. Orchard, T.J., Olson, J.C., Erbey, J.R., Williams, K., Forrest, K.Y., Smithline Kinder, L., Ellis, D., and Becker, D.J. Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care*, 2003, 26(5):1374-9.
144. Nagareddy PR, Kraakman M, Masters SL, et al. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metabolism* 2014; 19(5): 821-835.
145. Albiero M, D’Anna M, Bonora BM, et al. Hematopoietic and nonhematopoietic p66Shc differentially regulates stem cell traffic and vascular response to ischemia in diabetes. *Antioxidants & Redox Signaling* 2022; 36(10-12): 593-607
146. Albiero M, Ciciliot S, Tedesco S, et al. Diabetes-associated myelopoiesis drives stem cell mobilopathy through an OSMp66Shc signaling pathway. *Diabetes* 2019; 68(6): 1303-1314.
147. Arbel Y, Finkelstein A, Halkin A, et al. Neutrophil/lymphocyte ratio is related to the severity of coronary artery disease and clinical outcome in patients undergoing angiography. *Atherosclerosis* 2012; 225(2): 456-460.
148. KE, Goossens MH, van Oostrom O, Lilien MR, Verhaar MC. Circulating endothelial progenitor cell levels are higher during childhood than in adult life. *Atherosclerosis* 2009; 202: 345–347.
149. Al Mheid I, Hayek SS, Ko YA, Akbik F, Li Q, Ghasemzadeh N, Martin GS, Long Q, Hammadah M, Maziar Zafari A, Vaccarino V, Waller EK, Quyyumi AA. Age and human regenerative capacity impact of cardiovascular risk factors. *Circulation Research* 2016; 119: 801–809
150. Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, Nishio I. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *American Journal of Hypertension* 2005; 23: 1831–1837.
151. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004;24: 1442–1447.

152. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2004; 31: 407–413.
153. Fadini GP, Bonora BM, Marcuzzo G, Marescotti MC, Cappellari R, Pantano G, Sanzari MC, Duran X, Vendrell J, Plebani M, Avogaro A. Circulating stem cells associate with adiposity and future metabolic deterioration in healthy subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2015; 100: 4570–4578.
154. Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A. Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *European Heart Journal* 2006; 27: 2247–2255
155. Hristov M, Weber C. Ambivalence of progenitor cells in vascular repair and plaque stability. *Current Opinion in Lipidology Impact Factor* 2008; 19: 491–497.
156. 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; 118: 1930–1939.
157. Gian Paolo Fadini , Shoichi Maruyama et al. Circulating Progenitor Cell Count for Cardiovascular Risk Stratification: A Pooled Analysis. *PLoS One*. 2010; 5(7): e11488.
158. Fadini GP, Boscaro E, de Kreutzenberg S, et al. Time course and mechanisms of circulating progenitor cell reduction in the natural history of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2010; 33(5): 1097-1102
159. Mauro Rigato, Cristina Bittante, Mattia Albiero, Angelo Avogaro and Gian Paolo Fadini. Circulating Progenitor Cell Count Predicts Microvascular Outcomes in Type 2 Diabetic Patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, July 2015, 100(7): 2666–2672
160. Poulosom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA: Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *Journal of Pathology* 2001; 195: 229-235
161. Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T et al: The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 2001; 12: 1401–1409.
162. Wada Y, Morioka T, Oyanagi-Tanaka Y et al: Impairment of vascular regeneration precedes progressive glomerulosclerosis in anti-Thy 1 glomerulonephritis. *Kidney International* 2002; 61:432–443

163. Ross MD. Endothelial Regenerative Capacity and Aging: Influence of Diet, Exercise and Obesity. *Current Cardiology Reviews*. 2018; 14(4): 233-44.
164. Dimmeler et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399(6736):601-5.
165. Albiero M, Bonora BM, Fadini GP. Diabetes pharmacotherapy and circulating stem/progenitor cells. State of the art and evidence gaps.. *Current Opinion in pharmacology* 2020 Dec; 55: 151-156.
166. Fadini GP; Bonora BMBM, Cappellari R, Menegazzo, Vedovato M, Iori E et al. Acute effects of linagliptin on progenitor cells, monocyte phenotypers, and soluble mediators in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2016 Feb; 101(2): 748-56.
167. Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, et al. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 2013; 369: 1317–1326
168. Albiero M, Tedesco S, Amendolagine FI, D’anna M, Migliozi L, Zuccolotto G et al. Inhibition of SGLT2 rescues bone marrow cell traffic for vascular repair. Role of glucose control and ketogenesis. *Diabetes* 2021 Aug; 70(8): 1767-1779.
169. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *New England Journal Medicine*. 2004; 351: 1296-1305.
170. J. Engel, A. Chade. Macrophage polarization in chronic kidney disease: a balancing act between renal recovery and decline? *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2019 Dec 1; 317(6): F1409–F1413.
171. Bonora BM, Cappellari R, Albiero M, Avogaro A, Fadini GP. Effects of SGLT2 Inhibitors on Circulating Stem and Progenitor Cells in Patients With Type Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2018 Oct 1; 103(10): 3773-82.
172. Bonora BM, Cappellari R, Mazzucato M, Grasso M, Menegolo M, et al. Stem cell mobilization with plerixafor and healing of diabetic ischemic wounds: A phase IIa, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *STEM CELLS Translational Medicine* 2020; 9(9): 965-73.
173. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs— an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*. 1991; 98: 786–806.
174. Gerstein HC et al: Dulaglutide and renal outcomes in type 2 diabetes: an exploratory analysis of the REWIND randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2019; 394: 131-138

175. Kennedy KF, Pencina M: A SAS® Macro to Compute Added Predictive Ability of New Markers Predicting a Dichotomous Outcome.2010 NCSU, Available From <http://analytics.ncsu.edu/sesug/2010/SDA07.Kennedy.pdf>. 2010
176. Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA: Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *Journal of Pathology* 2001; 195: 229-235
177. Fadini GP, Mehta A, Dhindsa DS, Bonora BM, Sreejit G, Nagareddy P, Quyyumi AA: Circulating stem cells and cardiovascular outcomes: from basic science to the clinic. *European Heart Journal* 2020; 41: 4271-4282
178. Skrzypkowska MW, Gutknecht PG, Ryba-Stanislawowska ME, Slominski B, Siebert J, Mysliwska JM: CD34+ and CD34+VEGFR2+ cells in poorly controlled hypertensive patients. *Journal of Human Hypertension* 2019; 33:863-872
179. Berezin AE, Kremzer AA, Samura TA, Berezina TA, Martovitskaya YV: Serum uric Acid predicts declining of circulating proangiogenic mononuclear Progenitor Cells in Chronic Heart Failure Patients. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research* 2014; 6(3): 153–162.
180. Fioretto P, Pontremoli R: Expanding the therapy options for diabetic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* 2022; 18:78-79
181. Seshagiri Rao Nandula, Nabanita Kundu, Hassan B. Awal, Beda Brichacek, Mona Fakhri, Nikhila Aimalla, Adrian Elzarki, Richard L. Amdur and Sabyasachi Sen. Role of Canagliflozin on function of CD34+ve endothelial progenitor cells (EPC) in patients with type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2021; 20(1):44
182. Stoner L, Young JM, Frye S. Assessments of arterial stiffness and endothelial function using pulse wave analysis. *International Journal of Vascular Medicine* 2012; 2012: 903107.
183. David A. Hess, Daniella C. Terenzi, Justin Z. Trac, Adrian Quan, Tamique Mason, Mohammed Al-Omran, Deepak L. Bhatt, Natasha Dhingra, Ori D. Rotstein, Lawrence A. Leiter, Bernard Zinman, Sandra Sabongui, Andrew T. Yan, Hwee Teoh, C. David Mazer, Kim A. Connelly and Subodh Verma. SGLT2 Inhibition with Empagliflozin Increases Circulating Provascular Progenitor Cells in People with Type 2 Diabetes Mellitus. *Cell Metabolism* 2019 Oct 1; 30(4): 609-613
184. Terenzi D.C., Al-Omran M., Quan A., Teoh H., Verma S., Hess D.A. Circulating pro-vascular progenitor cell depletion during type 2 diabetes: translational insights into the prevention of ischemic complications in diabetes. *JACC: Basic to Translational Science* 2018; 4: 98-112

185. Capoccia B.J., Robson D.L., Levac K.D., Maxwell D.J., Hohm S.A., Neelamkavil M.J., Bell G.I., Xenocostas A., Link D.C, Piwnica-Worms D. et al. Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* 2009; 113: 5340-5351
186. Putman D.M., Liu K.Y., Broughton H.C., Bell G.I., Hess D.A. Umbilical cord blood-derived aldehyde dehydrogenase-expressing progenitor cells promote recovery from acute ischemic injury. *Stem Cells* 2012; 30: 2248-2260
187. Avecilla ST, Goss C, Marionneaux SM, Wright DR, Leiva TD, Tonon JA, Smith KM, Maslak P. Method comparison study of peripheral blood CD34 β count performed on an Abbott cell-DYN sapphire hematology analyzer versus flow cytometry reference procedure (modified ISHAGE). *Advances in Cell and Gene Therapy* 2018 Sep; 1(2):e15.
188. Diks AM, Bonroy C, Teodosio C, Groenland RJ, de Mooij B, de Maertelaere E, Neiryneck J, Philippe J, Orfao A, van Dongen JJM, Berkowska MA. Impact of blood storage and sample handling on quality of high dimensional flow cytometric data in multicenter clinical research. *Journal of Immunological Methods* 2019, 475:112616.
189. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34 β cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Journal of Hematotherapy* 1996;5:213–226.
190. Calvillo-Arguelles O, Jaiswal S, Shlush LI, Moslehi JJ, Schimmer A, Barac A, Thavendiranathan P. Connections between clonal hematopoiesis, cardiovascular disease, and cancer: a review. *JAMA Cardiology* 2019; 4:380–387
191. Siddhartha Jaiswal et al. Clonal hematopoiesis and risk for atherosclerotic cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine* 2017 Jul 13; 377(2): 111–121.
192. Ahmed A Z Dawoud, Rodney D Gilbert, W. J Tapper, N.C P Cross. Clonal myelopoiesis promotes adverse outcomes in chronic kidney disease. *Leukemia* 2022 Feb; 36(2): 507-515.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio l'Università di Padova per avermi dato l'opportunità di un simile percorso di studio, insegnandomi a cercare il meccanismo di ogni epifenomeno con il rigore della metodologia e la consapevolezza dell'intersoggettività.

Ringrazio per aver avuto la possibilità di tradurre la mia passione molecolare in un progetto clinico. Grazie a Mattia per la disponibilità e la semplicità con cui insegna agli studenti e a tutti i ragazzi del VIMM che si dedicano ogni giorno alla Ricerca.

Ringrazio le mie amiche Alice, Giulia, Greta e Martina con cui ho passato sei anni tra chiacchiere a lezione, spritz serali e giornate infinite di studio.

Ringrazio i miei amici del liceo, sparsi per il mondo e distanti nel tempo, cui sarò sempre unita dalla familiarità del ricordo.

Un grazie a Umbe, per avermi assunta quella volta, a Checco, Luca e Barbara che creando l'Osteria 'La Madonnetta' mi hanno insegnato il valore dell'Amicizia.

Ringrazio di essere medico e di poter professare sempre con integrità di coscienza per il Bene dell'altro.

Tutto questo percorso lo dedico a mia mamma, che mi ha sempre guidata, mio papà e la sua grandissima semplicità e mio fratello Mehdi e il suo grande cuore.

Non per ultimi, grazie a zia Tuccia, Alberto, Massimo e Fulvia.