

Rassegna

Le cellule staminali nel diabete di tipo 1

**A. Trevisani¹, S. Tezza², R. Di Fenza²,
R. Bassi², A. Farina³, P. Fiorina^{2,4}**

¹Sorgente, Milano; ²Istituto Scientifico San Raffaele, Milano; ³Divisione di Ginecologia e Ostetricia, Università degli Studi di Bologna; ⁴Transplantation Research Center (TRC), Nephrology Division, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Corrispondenza: prof. Paolo Fiorina, Transplantation Research Center (TRC), Division of Nephrology, Children's Hospital/Harvard Medical School, 221 Longwood Avenue, Boston, MA 02115
e-mail: paolo.fiorina@childrens.harvard.edu

G It Diabetol Metab 2011;31:141-149

*Pervenuto in Redazione il 14-02-2011
Accettato per la pubblicazione il 22-07-2011*

Parole chiave: diabete di tipo 1, cellule staminali, rigenerazione insulinare

Key words: type 1 diabetes, stem cells, insulin producing cells

RIASSUNTO

Il diabete di tipo 1 (T1D) è una patologia immunomediata, in cui il sistema immunitario attacca e distrugge le β -cellule. Le attuali terapie per la cura del T1D hanno reso insulino-indipendenti solamente un minimo numero di pazienti. In questa rassegna, rivisiteremo il ruolo delle cellule staminali nella cura del T1D. È importante sottolineare che un approccio terapeutico ideale per il T1D dovrebbe preservare dalla distruzione immunomediata le β -cellule rimanenti, ripristinarne la funzionalità e proteggere da reazioni autoimmunitarie le cellule produttrici di insulina eventualmente trapiantate. Le cellule staminali, grazie alle loro proprietà immunologiche e rigenerative, possono sia ripristinare la tolleranza periferica verso le β -cellule sia generare nuove cellule produttrici di insulina. Le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo, caratterizzate da un fenotipo ip-immunogenico e un'ampia gamma di capacità immunomodulatorie, si sono dimostrate capaci di curare il diabete di nuova insorgenza in topi NOD, e attualmente sono in fase di valutazione in trial clinici. Le cellule staminali del cordone ombelicale possono sia generare aggregati cellulari simil-insulari produttrici di insulina sia facilitare l'induzione di cellule T-regolatorie in grado di correggere la condizione di iperglicemia in topi NOD. Pazienti affetti da T1D, trattati con cellule staminali del cordone ombelicale, hanno mostrato una lieve riduzione nel fabbisogno di insulina e un lieve miglioramento nel controllo glicometabolico. Sebbene le cellule staminali ematopoietiche siano state impiegate senza successo in modelli murini, esse hanno esibito profonde capacità immunomodulatorie nell'uomo. Infine, le cellule staminali embrionali lasciano intravedere importanti prospettive terapeutiche, in quanto capaci di generare *in vitro* cellule simil-insulari responsive al glucosio. Scopo di questa rassegna è di riassumere lo stato dell'arte sulle terapie con cellule staminali nel T1D e mitigare nel contempo i facili entusiasmi generati dai recenti sviluppi di questa disciplina, in quanto permangono diverse problematiche da superare (es. trasformazione oncogenica e formazione di tessuto ectopico).

SUMMARY

*The use of stem cells in type 1 diabetes
Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disorder in which*

immune system attacks and destroys insulin-producing cells (β -cells) of the pancreas. Few patients have been rendered insulin-independent with actual therapies. In this review, we will discuss about the role of stem cells for the cure of T1D. An ideal treatment for T1D should preserve the remaining β -cells from an immuno-mediated destruction, restore their functionality and protect the newly generated insulin-producing cells from autoimmune response. Stem cells have immunological and regenerative properties that can either restore peripheral tolerance towards β -cells or generate new insulin producing cells. Bone marrow mesenchymal stem cells, characterized by having an hypo-immunogenic phenotype and a wide range of immunomodulatory capabilities, have shown the ability to cure new onset diabetes in NOD mice. Cord blood stem cells can give rise to islet-like clusters cells and can also facilitate the generation of regulatory T-cells reverting hyperglycemia in NOD mice. T1D patients, treated with cord blood stem cells, have shown a stabilization of insulin requirement and an improvement of glycometabolic control. Although hematopoietic stem cells have been used without success in mouse models, they exhibited profound immunomodulatory capacities in humans. Finally, embryonic stem cells show exciting therapeutic perspectives, thanks to their plasticity. We will review the field and curb easy enthusiasm by highlighting the problems of the field.

Glossario

Allogenico: si definiscono soggetti o animali immunologicamente diversi

Cellule effettrici: linfociti responsabili della fase effettrice della risposta immunitaria

Cellule T regolatorie (Tregs): linfociti T ad azione immunoregolatoria

Congenico: si definiscono animali (topi per lo più) simili, ma che differiscono per una modifica in un singolo locus genico

HLA: sistema che controlla la risposta immune verso il non-self

Irradiazione subletale: procedura di ablazione midollare basata sull'esposizione del soggetto a radiazioni tali da indurre immunosoppressione, ma non morte del topo

Naiveté: immaturità immunologica

PD1/PD1L: pathway che consente la distruzione delle cellule bersaglio

Singenico: si definiscono soggetti o animali immunologicamente simili

Introduzione

Il diabete di tipo 1 (T1D), noto anche come diabete insulino-dipendente o diabete autoimmune, è una malattia immuno-mediata, in cui il sistema immunitario attacca e distrugge le β -cellule¹. Se è vero che l'insulino-terapia favorisce la sopravvivenza nei pazienti, e contrasta lo sviluppo delle complicanze croniche della malattia, è anche vero che essa non cura, cioè non è in grado di guarire definitivamente il dia-

bete². Storicamente, gli approcci terapeutici per la cura del T1D hanno reso insulino-indipendenti un numero minimo di pazienti³. Un approccio terapeutico efficace dovrebbe preservare dalla distruzione immuno-mediata sia le β -cellule rimanenti sia le cellule produttrici di insulina eventualmente sostituite^{4,5}. Le cellule staminali, grazie alle loro proprietà immunologiche e rigenerative, rappresentano una grande promessa per la cura del diabete di tipo 1^{6,7}.

Le cellule staminali (SCs) sono cellule indifferenziate capaci di autorinnovarsi e di dare virtualmente origine a qualsiasi organo o tessuto⁸. Le SCs sono state classificate come:

- cellule staminali embrionali (ESCs, *embryonic stem cells*);
- cellule staminali del cordone ombelicale (CB-SCs, *cord blood stem cells*);
- cellule staminali adulte (ASCs, *adult stem cells*).

Inoltre, ognuna di queste popolazioni cellulari è stata ulteriormente suddivisa in sottopopolazioni mediante genotipizzazione e valutazione di marker specifici⁹. Le ESCs, le quali vengono raccolte dalla massa cellulare interna (ICM, *inner cell mass*) della blastocisti umana di circa 5-6 giorni, sono considerate delle cellule progenitrici clonogeniche in grado di autorinnovarsi e, differenziandosi in tessuti di origine endodermica, mesodermica ed ectodermica, di generare tutti i tipi di cellule specializzate¹⁰. La ricerca clinica sulle ESCs è vietata per legge in molti Paesi, ma nuove linee guida sono state recentemente rilasciate dal National Institutes of Health (NIH)¹¹. Le CB-SCs vengono raccolte alla nascita dal cordone ombelicale (UCB, *umbilical cord blood*) il quale contiene un'alta percentuale di cellule CD34⁺ e CD105⁺¹². Le CB-SCs comprendono diversi sottotipi di cellule staminali, molti dei quali sono cellule progenitrici multipotenti autorinnovanti, capaci di differenziarsi in cellule di tipo condrocitico, adipocitico, osteocitico e midollare, nonché nelle componenti cellulari del sangue¹²⁻¹⁴. Quando utilizzate in trapianti di midollo allogenici, le CB-SCs provocano, grazie alla loro *naiveté*, una minore insorgenza della "malattia del trapianto contro l'ospite" (GvHD, *graft versus host disease*) se paragonate alle cellule staminali adulte. Le ASCs sono cellule indifferenziate multipotenti virtualmente presenti in ogni tipo di tessuto od organo adulto. Il principale criterio attualmente utilizzato per caratterizzare e identificare queste cellule è la loro capacità di autorinnovamento e di differenziazione all'interno dei tessuti od organi in cui risiedono^{7,15}. Le ASCs maggiormente utilizzate in studi relativi al T1D sono: le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo (MSCs, *mesenchymal stem cells*), le cellule staminali ematopoietiche (HSCs, *hematopoietic stem cells*) e le cellule progenitrici derivate dal pancreas.

L'utilizzo terapeutico delle cellule staminali per la cura del T1D comporta alcune problematiche, in merito sia alla rigenerazione β -cellulare sia immunologica nel caso in cui l'obiettivo sia rivolto a un'immunoterapia. Le maggiori difficoltà correlate all'uso delle staminali per rigenerare le β -cellule sono:

- generazione di un numero sufficiente di β -cellule responsive al glucosio e capaci di secernere insulina;
- massimizzazione della resa, in termini di insulina prodotta, delle β -cellule;

- vitalità, *in vivo*, dell'innesto.

I principali problemi legati all'uso delle staminali a scopo immunomodulatorio sono:

- rischio di insorgenza di tumori;
- rischio legato all'uso di vettori virali⁶;
- necessità di ottenere un rimodellamento stabile e di lunga durata del sistema immunitario in assenza di eventi avversi.

Cellule staminali embrionali (ESCs)

Le ESCs sono ottenute mediante raccolta dalla blastocisti. Tipicamente, esprimono fattori di trascrizione coinvolti nell'autorinnovamento e nel mantenimento dello stato indifferenziato quali Oct-4 e Nanog-1¹⁶ e posseggono un'elevata attività telomerasica¹⁷. Sebbene siano estremamente promettenti, le ESCs sono al momento lontane dall'essere impiegate in sperimentazioni cliniche per il trattamento del T1D⁶.

Effetto sulla risposta immunitaria

Le ESCs hanno mostrato *in vitro* la capacità di prevenire l'attivazione immunitaria in risposta a cellule presentanti l'antigene e hanno esibito, *in vivo*, la capacità di promuovere la sopravvivenza dell'allotrapianto. *In vitro*, ESCs murine riducono la risposta immunitaria, inibiscono la proliferazione delle cellule T mediante contatto cellula-cellula^{18,19} e, quando iniettate nel ratto in un modello di allotrapianto cardiaco, sono in grado di proteggere il trapianto¹⁹. Zavazava et al., studiando le HSCs derivanti da ESCs e il loro attecchimento in animali riceventi un trapianto allogenico, scoprirono che si poteva ottenere un attecchimento del trapianto a lungo termine anche in presenza di incompatibilità per il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC, *major histocompatibility complex*) e senza la necessità di agenti immunosoppressivi²⁰. Questo effetto era mediato attraverso l'induzione intratrapianto di cellule T-regolatorie (Tregs) positive per il marcatore Foxp3⁺²⁰.

Generazione di cellule produttrici insulina

Una delle prime descrizioni di cellule produttrici insulina (IPCs, *insulin-producing cells*) derivanti da ESCs, è stata riportata nel 2000 da Soria et al. in un articolo abbastanza controverso. Le IPCs derivanti da ESCs vennero selezionate geneticamente e successivamente trapiantate sotto la capsula renale di topo, portando a una correzione transitoria della glicemia²¹. Tuttavia, la rimozione chirurgica dell'innesto non causò iperglicemia, sollevando dubbi in merito all'efficacia di queste IPCs²¹. Il differenziamento spontaneo *in vitro* di ESCs murine (mESCs) genera una piccola frazione di IPCs che può essere aumentata mediante la selezione di cellule progenitrici positive al marker nestina. Queste cellule mostrano un rilascio regolare di insulina *in vitro*, ma quando vengono trapiantate nel topo, non inducono un miglioramento nel controllo glicometabolico²². In altri studi, in cui le IPCs derivate da ESCs sono state trapiantate

sotto la capsula renale o nella milza, si è osservata una correzione temporanea della glicemia, ma questa è risultata associata alla comparsa di tumori in entrambi gli organi²³ (Tab. 1). Recentemente, per indurre il differenziamento delle ESCs umane (hESCs) in IPCs, è stato sviluppato un nuovo protocollo a 5 passaggi, durante i quali vengono mimati i processi fisiologici di sviluppo del pancreas. Innanzitutto, le hESCs, tramite alte concentrazioni di attivina-A, vengono indotte a una transizione da mesoderma a endoderma definitivo. Successivamente, queste cellule vengono sottoposte ad analisi FACS (*fluorescence activated cell sorter*) per determinare l'espressione di marker endodermici (es: SOX17 e CXCR4). A questo punto, la rimozione di attivina-A sembra essere essenziale per la transizione verso un fenotipo pancreatico. Questo passaggio è caratterizzato da una riduzione dell'espressione del marker DE CXCR4, dal mantenimento dell'espressione di SOX17 e dalla comparsa dei marker del tubo intestinale HNF1B e HNF4A. L'aggiunta di acido retinoico (RA) e di ciclopamina KAAD alle cellule endodermiche del tubo intestinale induce un rapido incremento nell'espressione di PDX1 e di altri marker necessari per la specificazione della gemma pancreatica. Durante i passaggi quattro e cinque, le cellule esprimenti PDX1 vengono dirette verso germinazioni pancreatiche ed endocrine e, dopo circa 15 giorni di differenziamento, vengono ottenute cellule endocrine con un'identità pancreatica. La sintesi *de novo* di insulina, e il suo rilascio, viene quindi valutata misurando la secrezione di C-peptide a seguito di differenti stimoli²⁴⁻²⁶. Al fine di aumentare la sintesi di insulina, in un protocollo recentemente pubblicato, viene proposta la somministrazione di 10 nmol/L di exendin-4 (molecola omologa del farmaco exenatide impiegato in clinica) e un periodo aggiuntivo di 5 giorni di coltura in terreni a basso contenuto di glucosio, al termine del differenziamento delle mESCs in β -cellule²⁷.

Cellule staminali del cordone ombelicale (CB-SCs)

Mediante il metodo *waterworks*, possono essere raccolti alla nascita 60-100 cc di sangue dal cordone ombelicale (CB, *cord blood*) senza esporre, né il bambino né la madre, ad alcun rischio procedurale. In seguito, il sangue prelevato potrà essere criopreservato per molti anni¹². L'evidenza che la criopreservazione delle CB-SCs non altera la funzionalità cellulare è stata fornita nel 1992 da Broxmeyer et al.²⁸, il quale dimostrò il mantenimento della vitalità in CB-SCs criopreservate per 5 anni. Successivamente, nel 2010, Broxmeyer ha mostrato un efficiente recupero di CB-SCs conservate per più di 24 anni²⁹. L'US National Cord Blood Program, che ha raccolto fino a ora circa 53.000 unità di sangue cordonale, ha affermato che, fino al 2009, sono stati eseguiti nel mondo più di 15.000 trapianti di cellule staminali cordonali. Il CB contiene un elevato numero di cellule CD34⁺ e CD105⁺ con un'elevata *naïveté* immunologica; queste caratteristiche indicano un promettente potenziale rigenerativo del CB³⁰. Il CB è fonte di diversi tipi di SCs, fra cui HSCs,

MSCs e cellule staminali-simil embrionali (VSELs, *very small embryonic-like stem cells*), che si mostrano adatte per studi rigenerativi, in quanto formano facilmente colonie *in vitro*, hanno telomeri stabili ed esibiscono un potenziale oncogenico pressoché nullo^{12,31}. La possibilità di ottenere cluster di cellule simil-insulari da CB-SCs è stata esaminata e rappresenta una prospettiva promettente per la terapia del T1D³².

Effetto sulla risposta immunitaria

In vitro, CB-MSCs inibiscono in maniera dose-dipendente la risposta immunitaria sia in saggi di reazione linfocitaria mista (MLR) sia a seguito di stimolazione mediante anticorpi anti-CD3/-CD28^{33,34}. Inoltre, è stato scoperto che le CB-MSCs sopprimono l'attività delle cellule dendritiche mature, sia mediante contatto cellulare sia tramite il rilascio di fattori

solubili³³. L'esposizione delle CB-MSCs umane (hCB-MSCs) a inibitori della sintesi di prostaglandina (indometacina o NS-398) ne abroga quasi completamente l'attività immunosoppressiva, ponendo la prostaglandina E(2) come un importante mediatore solubile³⁴. Zhao et al. hanno dimostrato che il diabete di nuova insorgenza in topi NOD veniva curato anche grazie alla somministrazione di Tregs ottenute *in vitro* da linfociti coltivati con CB-MSCs³⁵ (Tab. 1).

Generazione di cellule producenti insulina

Nel 2004, Pessina et al. hanno identificato nelle CB-SCs l'espressione sia di un insieme di marker, come nestina, CK-8 e CK-18, sia di un gruppo di fattori di trascrizione, quali Isl-1, Pax-4 e Ngn-3, tutti espressi dai precursori delle cellule pancreatiche³⁶. In seguito a questa scoperta,

Tabella 1 Esiti di terapie cellulari basate sull'utilizzo di staminali nel trattamento del T1D in modelli preclinici e clinici.

Applicazione preclinica				
Fonte cellulare	Scopo	Tipologia di indagine	Outcome	Riferimento bibliografico
Staminali embrionali murine	Generazione di cellule producenti insulina	Infusione in modello murino di T1D	Correzione temporanea della glicemia; comparsa di tumori	(23)
Tregs	Controllo della risposta autoimmunitaria	Infusione in modello murino di T1D	Risoluzione dell'iperglicemia, promozione della rigenerazione delle β -cellule, aumento della produzione di insulina	(35)
Cordone ombelicale	Generazione di cellule producenti insulina	Infusione in modello murino di T1D	Aumento dei valori sierici di insulina, nessun mutamento della glicemia	(41)
Midollo osseo	Generazione di cellule producenti insulina	Infusione in modello murino di T1D	Riduzione della glicemia, ricomparsa dello stato iperglicemico a seguito di nefrectomia	(56)
Applicazione clinica				
Fonte cellulare	Scopo	Tipologia di indagine	Outcome	Riferimento bibliografico
Cordone ombelicale	Valutazione dell'efficacia e sicurezza del trapianto	Infusione in 15 giovani pazienti affetti da T1D di nuova insorgenza	Lieve riduzione del fabbisogno di insulina esogena, assenza di reazioni avverse significative correlate al trapianto, lieve aumento per 6 mesi delle Tregs periferiche	(42)
Sangue periferico	Valutazione dell'efficacia e sicurezza del trapianto	Infusione autologa in 23 pazienti affetti da T1D di nuova insorgenza	Raggiungimento temporaneo (30 mesi) dell'insulino-indipendenza in 20 pazienti	(68)

Yoshida et al. hanno studiato la capacità delle CB-SCs di differenziarsi *in vivo* in IPCs³⁷. Alcune settimane dopo il trapianto della frazione di cellule mononucleate (MNCs, *mononuclear cells*) del CB in topi immunodeficienti, attraverso tecniche di immunofluorescenza è stato possibile evidenziare la comparsa di un piccolo numero di IPCs derivanti da hCB-MNCs³⁷. L'evidenza che le CB-SCs umane possono essere ingegnerizzate verso IPCs è stata prodotta per la prima volta da Denner et al.³⁸ attraverso la generazione di IPCs da cellule CD34⁺, CD133⁺ e da cellule di lineage negativo (CD133⁻/CD34⁻), tutte esprimenti SSEA-4. La sintesi *de novo* di insulina da parte delle IPCs neogenerate è stata valutata considerando la produzione di C-peptide³⁸. Successivamente, Sun et al. hanno dato origine, con successo, a IPCs mediante il differenziamento di CB-VSELS coltivate in un mezzo di coltura contenente vari fattori di crescita e di differenziamento³⁹. Dopo sette giorni di coltura, le cellule hanno formato strutture simil-insulari e, mediante immunocolorazione, è stata rilevata la presenza sia di insulina sia di C-peptide³⁹. Sun et al. hanno riportato inoltre che l'esposizione delle cellule a un mezzo di coltura contenente alte concentrazioni di glucosio era essenziale per generare le IPCs³⁹. Gao et al., coltivando CB-MSCs in un medium ad alto contenuto di glucosio, contenente nicotinamide, acido retinoico, exendina-4 e EGF, hanno osservato la comparsa di IPCs esprimenti marker pancreatici quali PDX-1, Pax-4, Glut-2 e Ngn-3⁴⁰. Hu et al. hanno valutato in un modello animale l'efficienza di IPCs ottenute da CB-MSCs umane⁴¹. I ricercatori hanno riscontrato un'immunocolorazione positiva per l'insulina sotto la capsula renale (dove le IPCs erano state trapiantate) e un aumento della concentrazione di insulina solamente nel siero dei topi trapiantati e non nel gruppo di controllo, anche se la glicemia non risultava modificata⁴¹ (Tab. 1). Recentemente, sono stati sviluppati nuovi approcci per migliorare la generazione di IPCs.

Trial clinici in corso

Haller et al. hanno pubblicato i dati relativi a uno studio clinico con follow-up di un anno, condotto in 15 pazienti (di età compresa tra 1 e 18 anni) ai quali era stato diagnosticato T1D di nuova insorgenza e avevano ricevuto una singola infusione intravenosa di CB-SCs autologhe, precedentemente conservate in banche private⁴². Un anno dopo l'infusione, i pazienti trattati con CB-SCs hanno mostrato una lieve riduzione del fabbisogno di insulina accompagnata da stabilità del compenso glicometabolico e assenza di reazioni avverse significative⁴². Dopo 6 mesi dal trattamento, i pazienti hanno esibito e mantenuto, per i successivi 6 mesi, un lieve aumento delle Tregs periferiche (Tab. 1). I dati relativi a un follow-up di 2 anni, condotto in un totale di 23 pazienti trattati con CB, risulteranno indispensabili per una valutazione complessiva dei potenziali, ma al momento non sono dimostrati vantaggi clinici offerti dall'infusione autologa di CB. In Germania è attualmente in corso un trial clinico di fase I, in cui Ziegler et al. (<http://clinicaltrials.gov>) stanno reclutando pazienti ai quali, nei precedenti sei mesi, è stato dia-

gnosticato T1D e che hanno conservato, per la trasfusione autologa, il sangue del cordone ombelicale presso la banca Vita 34.

Cellule staminali mesenchimali (MSCs)

Le MSCs derivanti dal midollo osseo sono cellule progenitrici multipotenti, capaci di autorinnovarsi e di differenziarsi in adipociti, condrociti e osteociti⁴³, e possono essere isolate dal midollo osseo, in colture cellulari a bassa densità, scaricando le cellule non aderenti⁴⁴.

Effetto sulla risposta immunitaria

Le MSCs esercitano importanti effetti immunomodulatori sulle cellule del sistema immunitario⁴⁵. *In vitro*, le MSCs sono in grado di:

- inibire la proliferazione delle cellule T;
- inibire la maturazione e la migrazione di monociti e cellule mieloidi⁴⁶;
- alterare il profilo secretorio di citochine delle cellule dendritiche (DCs, *dendritic cells*), riducendo, fra queste, la secrezione di TNF- α che è responsabile dell'inibizione della differenziazione dei monociti in DCs, con conseguente sviluppo di un fenotipo maggiormente antinfiammatorio o tollerante^{47,48};
- inibire la proliferazione delle cellule NK (mediata da IL-2) e la produzione di IFN- γ ⁴⁹;
- inibire la proliferazione delle cellule B e l'espressione di chemochine^{46,50}.

In vivo, MSCs autologhe murine migliorano il quadro clinico della encefalopatia autoimmune sperimentale (EAE)⁵¹. MSCs murine allogene riducono la severità di artriti, inducono iporesponsività dei linfociti T (come evidenziato da una riduzione nella proliferazione attiva) e modulano l'espressione di citochine infiammatorie (TNF)⁵². MSCs umane prelevate da donatori sani e somministrate in topi MRL/lpr, hanno ridotto sia la proliferazione di linfociti T sia i livelli sierici di anticorpi anti ds-DNA riducendo la proteinuria⁵³. Infine, la capacità immunomodulatoria delle MSCs è stata ulteriormente confermata grazie a un modello sperimentale in cui topi NOD diabetici sono stati curati tramite l'infusione di MSCs allogene e congeniche^{7,54}.

Generazione di cellule produttrici insulina

Al fine di identificare nuove strategie terapeutiche per la rigenerazione delle isole pancreatiche, è stata studiata la capacità delle MSCs, sia umane sia murine, di differenziarsi in IPCs. Li et al. hanno ottenuto IPCs da hMSCs grazie a trasfezione adenovirale del c-DNA di PDX-1 umano⁵⁵. I ricercatori, dopo avere confermato l'espressione della proteina PDX-1, hanno coltivato le linee hMSCs PDX⁺ in un medium senza siero contenente GLP-1. Le IPCs risultanti hanno mostrato l'espressione di un gruppo di geni pancreatici, quali PDX-1, brain4, Ngn3, insulina, glucagone, e di un insieme di

proteine come il recettore per GLP-1, Glut-2 e glucocinasi, suggerendo una loro sensibilità al glucosio⁵⁶. Queste IPCs hanno mostrato la capacità di produrre insulina e di rilasciarla quando esposte a diverse concentrazioni di glucosio (da 5,6 sino a 23,0 mM)⁵⁶. Inoltre, le IPCs derivate dalle MSCs umane, (hMSCs)-PDX⁺, quando trapiantate sotto la capsula renale di topi BALB/c trattati con streptozotocina, hanno ridotto la glicemia 7-14 giorni dopo il trapianto, mentre a seguito di nefrectomia ricompariva lo stato iperglicemico⁵⁶ (Tab. 1). Sun et al. sono stati in grado di differenziare in IPCs hMSCs raccolte da pazienti diabetici, seguendo un protocollo a tre passaggi che non prevedeva manipolazione genetica, in cui le cellule erano: (1) coltivate in un medium DMEM senza siero e ad alta concentrazione di glucosio addizionato di β -mercaptoetanololo, (2) seminate per 8 giorni in un medium contenente B27, bFGF, EGF, L-glutamina e aminoacidi non essenziali, e (3) trasferite, per ulteriori 8 giorni, in un medium costituito da nicotinamide, β -cellulina e activin-A⁵⁷. Dopo il differenziamento, queste IPCs hanno mostrato un elevato livello di espressione di PDX-1, hanno generato strutture simili alle isole pancreatiche e sono state in grado di rilasciare insulina *in vitro*⁵⁷.

Trial clinici in corso

A oggi, tre trial clinici sono in corso relativamente all'uso di MSCs in pazienti affetti da T1D. Il primo è uno studio americano atto a determinare l'efficacia e la sicurezza dell'impiego di MSCs allogeniche (Prochymal®, una formulazione commerciale, prodotta da Osiris, composta da hMSCs raccolte da donatori volontari sani) in pazienti affetti da T1D (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00690066). In Cina, un secondo trial clinico sta reclutando pazienti al fine di valutare l'efficacia terapeutica del trapianto di MSCs autologhe in pazienti sofferenti di T1D (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01157403). Infine, un altro trial clinico basato sulla somministrazione autologa di MSCs è pianificato in Europa (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01068951).

Cellule staminali ematopoietiche (HSCs)

Nel 2003, presso l'Università di São Paulo (Brasile), è stato effettuato per la prima volta un trapianto di HSCs in un paziente affetto da T1D^{58,59}. Negli ultimi anni, le HSCs autologhe sono divenute una delle terapie più promettenti per la cura delle malattie autoimmuni e in particolar modo per il T1D a causa di una serie di vantaggi significativi e clinicamente rilevanti tra cui la facilità di raccolta e l'assenza di problematiche immunologiche essendo l'uso autologo⁶⁰.

Effetto sulla risposta immunitaria

Crescenti evidenze suggeriscono che le HSCs autologhe possono indurre *per se* tolleranza immunologica centrale e periferica⁶¹. Studi preclinici hanno dimostrato che le cellule staminali CD34⁺ residenti in midollo osseo impoverito di

cellule T superano le barriere MHC in topi irradiati subletalmente⁶² e che le HSCs murine possono eliminare le cellule effettrici mediante interazione Fas/FasL o tramite la via di segnale del TNF- α ⁶³. *In vitro*, le HSCs murine (cellule CD34⁺) inibiscono la risposta alloimmune attraverso la soppressione della proliferazione delle cellule T⁶³ ed eliminano le cellule effettrici mediante interazione Fas/FasL o tramite la via di segnale del TNF- α . Questo effetto può essere abolito mediante l'aggiunta di un inibitore delle caspasi, suggerendo un meccanismo basato sulla soppressione⁶³. Kared et al.⁶⁴ hanno recentemente dimostrato che le HSCs murine possono stimolare l'espansione delle Tregs Foxp3⁺ periferiche sia tramite l'attivazione, mediata da contatto cellula-cellula, del *notch signaling* sia attraverso il rilascio di fattori solubili come GM-CSF⁶⁴. Per quanto riguarda le HSCs umane, Rachamim et al.⁶⁵ hanno dimostrato che le cellule CD34⁺ umane sono dotate di una potente attività di "veto", in riferimento alla loro capacità di neutralizzare i precursori dei linfociti T citotossici⁶⁵. Le HSCs sono state utilizzate anche in altre malattie autoimmuni debilitanti, fra cui la sclerosi multipla¹⁴, la sclerosi sistemica⁶⁶ e il morbo di Crohn⁶⁷, con l'obiettivo di resettare il sistema immunitario del paziente.

Generazione di cellule producenti insulina

Non sono riportati studi in cui venga dimostrata la capacità delle HSCs di generare direttamente IPCs.

Trial clinici in corso

Le HSCs sono, a oggi, le cellule staminali maggiormente utilizzate in clinica come terapia per le malattie autoimmuni⁶⁰. In particolare, sono stati compiuti numerosi studi e trial relativamente al T1D, a partire da una sperimentazione condotta da Voltarelli⁵⁹. Nel 2003, infatti, Voltarelli et al. hanno iniziato uno studio di fase I/II per valutare la sicurezza e la capacità di mobilitazione delle HSCs autologhe in pazienti ai quali era stato diagnosticato diabete di nuova insorgenza. Tale trial prevedeva, per evitare la perdita della funzione delle β -cellule e per controllare la risposta autoimmune, l'applicazione di un regime combinato di ciclofosfamide più GM-CSF e un trapianto, dopo condizionamento con alte dosi di ciclofosfamide e anticorpo policlonale anti-cellule T di coniglio (globulina antitimocita-ATG)⁵⁹. L'ultima analisi relativa a 23 pazienti trattati, con un follow-up medio di 30 mesi, ha mostrato che 20 di questi avevano raggiunto l'insulino-indipendenza per un determinato periodo di tempo e che 12 pazienti erano rimasti insulino-indipendenti fino a 31 mesi dopo il trapianto. Tuttavia, 8 pazienti hanno mostrato una recidiva e hanno dovuto riprendere la terapia insulinica sebbene con un dosaggio inferiore rispetto al periodo pretrapianto⁶⁸ (Tab. 1). Recentemente, Snarski et al. hanno sottoposto 8 pazienti, a cui era stato diagnosticato T1D di nuova insorgenza, a trapianto di HSCs autologhe seguendo un protocollo molto simile a quello precedentemente riportato, conseguendo la sospensione dell'insulina in tutti i pazienti tranne uno, il quale ha ripreso la terapia insulinica, a basso dosaggio, dopo

7 mesi dal trapianto⁶⁹. In un trial condotto presso l'università di Nanjing, in Cina, l'infusione di HSCs autologhe ha indotto uno stato di insulino-indipendenza in 4 pazienti trattati a meno di 3 mesi dalla diagnosi, ma non in 11 pazienti trattati 3-12 mesi dopo la diagnosi (Ouyang J, dati non pubblicati).

Cellule staminali pluripotenti indotte (iPS)

L'induzione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPS, *induced pluripotent stem*) capaci di riprendere le caratteristiche delle cellule staminali embrionali, e quindi in grado di differenziarsi in endoderma, ectoderma e mesoderma, è un tema che genera numerose implicazioni e merita pertanto particolare attenzione^{70,71}. Tuttavia, a causa dell'elevato potenziale di questo campo, possono essere generati facili entusiasmi.

Definizione di iPS

Le iPS sono cellule somatiche riprogrammate in cui la pluripotenza è ripristinata mediante l'induzione dell'espressione di fattori di trascrizione come Oct-4, Sox2, NANOG, c-Myc, LIN28 e klf4^{70,71}. Le iPS sono simili alle cellule staminali embrionali per quel che riguarda morfologia, attività di autorinnovamento e potenziale differenziativo. Inoltre, come le ESCs, le iPS mostrano sia la capacità di dare origine a corpi embrioidi e teratomi sia di differenziarsi in lineaggi endodermici, mesodermici ed ectodermici⁷².

Conclusioni

Le evidenze finora raccolte (Tab. 1) suggeriscono la necessità di ulteriori studi *in vitro* e *in vivo* sulle proprietà delle cellule staminali per poterne determinare la sicurezza in trial clinici basati su un loro impiego. Inoltre, le capacità immunologiche e rigenerative delle cellule staminali devono essere completamente chiarite per una migliore comprensione dei meccanismi alla base dell'azione delle cellule staminali. In futuro, il trattamento del T1D sarà basato, probabilmente, sulle cellule staminali o su loro derivati a causa, in particolare, della cronica mancanza di donatori di organi da cadavere. Pertanto, sono necessari maggiori sforzi per migliorare la nostra capacità di sfruttare le cellule staminali nel trattamento di questa devastante malattia autoimmune.

Ringraziamenti

Paolo Fiorina è ricevente del "JDRF-Career Development Award" e del "ASN Career Development Award". Paolo Fiorina è supportato dal MIUR grant: "Staminali" RF-FSR-2008-1213704.

Conflitto di interessi

Alessio Trevisani è dipendente di Sorgente srl; Paolo Fiorina dichiara relazioni economiche con: Sorgente srl, Medestea srl, Novartis e GLC consulting.

Bibliografia

- Colucci F, Cilio CM. *Taming killer cells may halt diabetes progression*. Nat Immunol 2010;11:111-2.
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ et al. *Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes*. N Engl J Med 2005;353:2643-53.
- Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature 2010; 464:1293-300.
- Nir T, Melton DA, Dor Y. *Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration*. J Clin Invest 2007;117:2553-61.
- Zaret KS, Grompe M. *Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas*. Science 2008;322:1490-4.
- Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. *Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus*. Nat Rev Endocrinol 2010;6:139-48.
- Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S et al. *Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes*. J Immunol 2009;183:993-1004.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science 1998;282:1145-7.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science 1999;284:143-7.
- Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. *Can stem cells cross lineage boundaries?* Nat Med 2001;7:393-5.
- Williams DA. *National Institutes of Health releases new guidelines on human stem cell research*. Mol Ther 2009;17:1485-6.
- Francesse R, Fiorina P. *Immunological and regenerative properties of cord blood stem cells*. Clin Immunol 2010;136:309-22.
- Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. *Immunomodulation by mesenchymal stem cells*. Diabetes 2008;57:1759-67.
- Tyndall A, Walker U, Cope A, Dazzi F, De Bari C, Fibbe W et al. *Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005*. Arthritis Research & Therapy 2007;9:301.
- Bruno S, Bussolati B, Grange C, Collino F, di Cantogno LV, Herrera MB et al. *Isolation and characterization of resident mesenchymal stem cells in human glomeruli*. Stem Cells Dev 2009;18:867-80.
- Friel R vdSS, Mee PJ. *Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling*. Advanced Drug Delivery Reviews 2005;57:1894-903.
- Bonde S, Zavazava N. *Immunogenicity and engraftment of mouse embryonic stem cells in allogeneic recipients*. Stem Cells 2006;24:2192-201.
- Drukker M, Katchman H, Katz G, Friedman SE-T, Shezen E, Hornstein E et al. *Human embryonic stem cells and their differ-*

- entiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells* 2006;24:221-9.
19. Fandrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M et al. *Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning*. *Nat Med* 2002;8:171-8.
 20. Bonde S, Chan K-M, Zavazava N. *ES-cell derived hematopoietic cells induce transplantation tolerance*. *PLoS ONE* 2008;3:e3212.
 21. Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. *Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice*. *Diabetes* 2000;49:157-62.
 22. Humphrey RK, Bucay N, Beattie GM, Lopez A, Messam CA, Cirulli V et al. *Characterization and isolation of promoter-defined nestin-positive cells from the human fetal pancreas*. *Diabetes* 2003;52:2519-25.
 23. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L et al. *Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:998-1003.
 24. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S et al. *Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo*. *Nat Biotech* 2008;26:443-52.
 25. D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG et al. *Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells*. *Nat Biotech* 2006;24:1392-401.
 26. Zhang D, Jiang W, Shi Y, Deng H. *Generation of pancreatic islet cells from human embryonic stem cells*. *Sci China C Life Sci* 2009;52:615-21.
 27. Li H, Lam A, Xu AM, Lam KS, Chung SK. *High dosage of Exendin-4 increased early insulin secretion in differentiated beta cells from mouse embryonic stem cells*. *Acta Pharmacol Sin* 2010;31:570-7.
 28. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro RC, Graves V, Yoder M et al. *Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4109-13.
 29. Broxmeyer HE. *Cord blood hematopoietic stem cell transplantation*. In: *StemBook Community TSCR*, Ed., May 26, 2010.
 30. Verneris MR, Miller JS. *The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cells*. *Br J Haematol* 2009;147:185-91.
 31. McGuckin C, Forraz N. *Potential for access to embryonic-like cells from human umbilical cord blood*. *Cell Prolif* 2008;41:31-40.
 32. Parekh VS, Joglekar MV, Hardikar AA. *Differentiation of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells to endocrine pancreatic lineage*. *Differentiation* 2009;78:232-40.
 33. Wang M, Yang Y, Yang D, Luo F, Liang W, Guo S et al. *The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro*. *Immunology* 2009;126:220-32.
 34. Wang D, Chen K, Du WT, Han ZB, Ren H, Chi Y et al. *CD14⁺ monocytes promote the immunosuppressive effect of human umbilical cord matrix stem cells*. *Exp Cell Res* 2010;316:2414-23.
 35. Zhao Y, Lin B, Darflinger R, Zhang Y, Holterman MJ, Skidgel RA. *Human cord blood stem cell-modulated regulatory T lymphocytes reverse the autoimmune-caused type 1 diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice*. *PLoS ONE* 2009;4:e4226.
 36. Pessina A, Eletti B, Croera C, Savalli N, Diodovich C, Gribaldo L. *Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:315-22.
 37. Yoshida S, Ishikawa F, Kawano N, Shimoda K, Nagafuchi S, Shimoda S et al. *Human cord blood-derived cells generate insulin-producing cells in vivo*. *Stem Cells* 2005;23:1409-16.
 38. Denner L, Bodenbun Y, Zhao JG, Howe M, Cappo J, Tilton RG et al. *Directed engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin*. *Cell Prolif* 2007;40:367-80.
 39. Sun B, Roh KH, Lee SR, Lee YS, Kang KS. *Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:919-23.
 40. Gao F, Wu DQ, Hu YH, Jin GX, Li GD, Sun TW et al. *In vitro cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells*. *Transl Res* 2008;151:293-302.
 41. Hu YH, Wu DQ, Gao F, Li GD, Yao L, Zhang XC. *A secretory function of human insulin-producing cells in vivo*. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009;8:255-60.
 42. Haller MJ, Wasserfall CH, McGrail KM, Cintron M, Brusko TM, Wingard JR et al. *Autologous umbilical cord blood transfusion in very young children with type 1 diabetes*. *Diabetes Care* 2009;32:2041-6.
 43. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M et al. *Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro*. *Stem Cells* 2004;22:377-84.
 44. Pittenger MF, Martin BJ. *Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics*. *Circ Res* 2004;95:9-20.
 45. Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X et al. *Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population*. *Blood* 2009;113:46-57.
 46. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. *Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells*. *J Immunol* 2006;177:2080-7.
 47. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD et al. *Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells*. *Blood* 2005;105:4120-6.
 48. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. *MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2*. *Blood* 2009;113:6576-83.
 49. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. *Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2*. *Blood* 2008;111:1327-33.
 50. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F et al. *Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions*. *Blood* 2006;107:367-72.
 51. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E et al. *Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy*. *Blood* 2005;106:1755-61.
 52. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. *Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells*

- prevents tissue damage in collagen-induced arthritis.* Arthritis Rheum 2007;56:1175-86.
53. Zhou K, Zhang H, Jin O, Feng X, Yao G, Hou Y et al. *Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cell ameliorates the autoimmune pathogenesis in MRL/lpr mice.* Cell Mol Immunol 2008;5:417-24.
 54. Jurewicz M, Yang S, Augello A, Godwin JG, Moore RF, Azzi J et al. *Congenit mesenchymal stem cell therapy reverses hyperglycemia in experimental type 1 diabetes.* Diabetes 2010; 59:3139-47.
 55. Marshak S, Benshushan E, Shoshkes M, Havin L, Cerasi E, Melloul D. *Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression.* Mol Cell Biol 2000;20:7583-90.
 56. Li Y, Zhang R, Qiao H, Zhang H, Wang Y, Yuan H et al. *Generation of insulin-producing cells from PDX-1 gene-modified human mesenchymal stem cells.* J Cell Physiol 2007;211: 36-44.
 57. Sun Y, Chen L, Hou XG, Hou WK, Dong JJ, Sun L et al. *Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro.* Chin Med J (Engl) 2007;120:771-6.
 58. Tyndall A, Black C, Finke J, Winkler J, Mertlesmann R, Peter HH et al. *Treatment of systemic sclerosis with autologous haemopoietic stem cell transplantation.* Lancet 1997;349:254.
 59. Voltarelli J, Couri C, Stracieri A, Oliveira M, Moraes D, Pieroni F et al. *Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus.* JAMA 2007;297:1568-76.
 60. Farge D, Labopin M, Tyndall A, Fassas A, Mancardi GL, Van Laar J et al. *Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years' experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases.* Haematologica 2010;95:284-92.
 61. Steptoe RJ, Ritchie JM, Jones LK, Harrison LC. *Autoimmune diabetes is suppressed by transfer of proinsulin-encoding Gr-1+ myeloid progenitor cells that differentiate in vivo into resting dendritic cells.* Diabetes 2005;54:434-42.
 62. Bachar-Lustig E, Rachamim N, Li HW, Lan F, Reisner Y. *Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice.* Nat Med 1995;1:1268-73.
 63. Gur H, Krauthgamer R, Bachar-Lustig E, Katchman H, Arbel-Goren R, Berrebi A et al. *Immune regulatory activity of CD34+ progenitor cells: evidence for a deletion-based mechanism mediated by TNF-alpha.* Blood 2005;105:2585-93.
 64. Kared H, Leforban B, Montandon R, Renand A, Layseca Espinosa E, Chatenoud L et al. *Role of GM-CSF in tolerance induction by mobilized hematopoietic progenitors.* Blood 2008;112:2575-8.
 65. Rachamim N, Gan J, Segall H, Krauthgamer R, Marcus H, Berrebi A et al. *Tolerance induction by "megadose" hematopoietic transplants: donor-type human CD34 stem cells induce potent specific reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte precursors in mixed lymphocyte culture.* Transplantation 1998;65:1386-93.
 66. Bohgaki T, Atsumi T, Bohgaki M, Furusaki A, Kondo M, Sato-Matsumura KC et al. *Immunological reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with systemic sclerosis: relationship between clinical benefits and intensity of immunosuppression.* J Rheumatol 2009;36:1240-8.
 67. Craig RM, Traynor A, Oyama Y, Burt RK. *Hematopoietic stem cell transplantation for severe Crohn's disease.* Bone Marrow Transplant 2003;32(suppl. 1):S57-9.
 68. Couri CE, Oliveira MC, Stracieri AB, Moraes DA, Pieroni F, Barros GM et al. *C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus.* JAMA 2009;301:1573-9.
 69. Snarski E, Milczarczyk A, Torosian T, Paluszewska M, Urbanowska E, Krol M et al. *Independence of exogenous insulin following immunoablation and stem cell reconstitution in newly diagnosed diabetes type I.* Bone Marrow Transplant 2011; 46:562-6.
 70. Kim EY, Jeon K, Park HY, Han YJ, Yang BC, Park SB et al. *Differences between cellular and molecular profiles of induced pluripotent stem cells generated from mouse embryonic fibroblasts.* Cell Reprogram 2010;12:627-39.
 71. Stefanovic S, Abboud N, Desilets S, Nury D, Cowan C, Puceat M. *Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: a molecular switch from stem cell pluripotency to specifying a cardiac fate.* J Cell Biol 2009;186:665-73.
 72. Marchetto MC, Yeo GW, Kainohana O, Marsala M, Gage FH, Muotri AR. *Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells.* PLoS One 2009; 4:e7076.