

## *Gruppo di Studio SID "Medicina rigenerativa in ambito diabetologico"*

### Cellule staminali e terapia del diabete

Documento stilato da:

V Sordi<sup>1</sup>; M Krampera<sup>2</sup>, P Marchetti<sup>3</sup>, A Pessina<sup>4</sup>, G Ciardelli<sup>5</sup>, G Fadini<sup>6</sup>, C Pintus<sup>7</sup>, G Pantè<sup>8</sup>, L Piemonti<sup>1</sup>

1 Diabetes Research Institute- IRCCS Ospedale San Raffaele

2 Sezione di Ematologia, Laboratorio di Ricerca sulle Cellule Staminali. Dipartimento di Medicina. Università degli Studi di Verona

3 Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale- Università di Pisa

4 CRC-StaMeTec (Staminali Mesenchimali per Terapie Cellulari). Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche Università degli Studi , Milano.

5 DIMEAS -Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Aerospaziale- Politecnico di Torino

6 Dipartimento di Medicina (DIMED)- Università di Padova

7 Centro Nazionale Trapianti

8 AIFA

## PREFAZIONE

L'avanzamento delle conoscenze nel campo della medicina rigenerativa pone sempre più spesso l'attenzione dei pazienti e dei clinici su aspettative terapeutiche basate su approcci di terapia cellulare. All'interno di questi, le terapie con cellule staminali sono spesso evocate come una possibile opzione terapeutica già in atto o perseguibile nell'immediato futuro per il diabete. Lo scopo di questo breve documento è quello di fare un punto della situazione sulle attuali conoscenze e prospettive terapeutiche per il paziente diabetico focalizzandosi su alcuni degli aspetti che più frequentemente sono motivo di curiosità e di discussione nella pratica clinica e nel rapporto con il paziente.

## INTRODUZIONE

Al momento non esistono terapie basate sull'utilizzo delle cellule staminali clinicamente approvate per la terapia del diabete. Esistono però numerosi approcci terapeutici per il diabete basati sull'utilizzo delle cellule staminali già valutati o in corso di valutazione in studi clinici. E' possibile identificare tre grossi campi di potenziale applicazione: 1) la ricostruzione della massa beta cellulare; 2) l'immunomodulazione nel diabete di tipo 1; 3) il trattamento delle complicanze. Nei prossimi paragrafi limiteremo la trattazione agli approcci che hanno già un potenziale di traslazione clinica omettendo volontariamente gli aspetti di biologia di base e preclinica. Inoltre volutamente tralascieremo il trattamento delle complicanze che sarà oggetto di una successiva pubblicazione.

## 1 RICOSTRUZIONE DELLA MASSA BETA CELLULARE A PARTIRE DA CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI

Numerose pubblicazioni hanno riportato la possibilità di differenziare o transdifferenziare cellule produttrici di insulina a partire da cellule staminali di diversa origine o da precursori isolati da pancreas o da altri tessuti. Per molti di questi approcci i risultati non sono stati confermati in altri laboratori o nell'uomo e sono dunque controversi. Al momento gli unici risultati consistenti in termini qualitativi e quantitativi sono quelli ottenuti dall'utilizzo di cellule staminali pluripotenti (cellule staminali embrionali o cellule staminali pluripotenti ottenute da riprogrammazione di cellule somatiche). In termini di prospettive cliniche a breve termine, l'approccio più avanzato (in quanto studio clinico di fase 1-2 già iniziato) fa riferimento alla possibilità di utilizzare cellule produttrici di insulina derivate da cellule staminali pluripotenti impiantate nel sottocute all'interno di un macrodevice (1-4). Il "prodotto" in questione è denominato VC-01™ (5) ed è costituito da cellule progenitrici pancreatiche (denominate PEC-01™, derivate da una linea di cellule staminali embrionali(6)) incapsulate in un macrodevice denominato Encaptra™. La U.S. Food and Drug Administration ("FDA") ha approvato l'Investigational New Drug Application ("IND") per l'utilizzo di VC-01™ nella terapia del diabete mellito tipo 1 nell'agosto del 2014. VC-01™ è stato sviluppato da ViaCyte, una company californiana che ha sede a San Diego e che è stata supportata sia dal California Institute for Regenerative Medicine (CIRM) che dalla Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF). Lo studio clinico (denominato A Safety, Tolerability, and Efficacy Study of VC-01™ Combination Product in Subjects With

Type I Diabetes Mellitus; NCT02239354, ClinicalTrials.gov) è uno studio prospettico multicentrico in aperto che prevede l'impianto di VC-01™ in pazienti diabetici di tipo 1 in assenza di immunosoppressione, poiché il macrodevice dovrebbe essere in grado di proteggere dalla risposta immunitaria. Lo studio prevede il reclutamento di quaranta soggetti e il primo paziente è stato trapiantato il 29/10/2014. Al momento non si hanno informazioni sui primi risultati. Lo studio sarà presto replicato anche in Canada, presso l'Università di Alberta. Nel breve-medio periodo è probabile che approcci simili saranno sviluppati anche da altri gruppi di ricerca poiché negli ultimi mesi sono stati descritti almeno altri due protocolli per differenziare cellule produttrici di insulina con alta efficienza. Infatti, i ricercatori della BetaLogics Venture, una sussidiaria della Johnson & Johnson, in collaborazione con la University of British Columbia hanno sviluppato un altro efficiente protocollo di differenziamento per generare in vitro cellule insulinose secernenti mature partendo da cellule staminali pluripotenti (7-12), ricerca resa possibile grazie al supporto di JDRF, del Canadian Institutes of Health Research, della Stem Cell Network del Canada, della Stem Cell Technologies di Vancouver e, infine dalla Fondazione Michael Smith for Health Research. Analogamente, l'Harvard Stem Cell Institute ha descritto un terzo protocollo per generare in vitro con alta efficienza cellule insulinose secernenti mature da cellule staminali pluripotenti (13). Attualmente quest'approccio è stato conferito a una start-up denominata Semma Therapeutics che ha l'obiettivo di arrivare in clinica in partnership con "big pharma" (come Novartis, Medtronic e AstraZeneca) nei prossimi 5 anni.

## 2 CELLULE STAMINALI DEL MIDOLLO OSSEO E DEL SANGUE CORDONALE PER LA TERAPIA DEL DIABETE

Negli ultimi anni, l'esperienza clinica ampiamente consolidata nel campo dell'ematologia ha incoraggiato l'uso delle cellule staminali derivate dal midollo osseo o dal sangue del cordone in malattie non ematologiche. Sono stati iniziati numerosi studi clinici anche per la terapia del diabete di tipo 1 e di tipo 2, che coinvolgono cellule staminali ematopoietiche e cellule stromali/staminali mesenchimali (MSC) derivate dal midollo osseo e dal sangue cordonale (o dagli annessi extraembrionali), grazie anche alla disponibilità di semplici protocolli per la raccolta, la coltura e la conservazione di queste cellule staminali. Molti gruppi hanno studiato il loro ruolo potenziale di induzione e/o ripristino della tolleranza, nel rimodellamento del tessuto pancreatico come cellule "feeder" e nella differenziazione diretta in cellule produttrici d'insulina, con l'obiettivo finale comune di preservare o sostituire la funzione delle cellule beta.

### **Infusione di midollo osseo autologo intrapancreatico per la terapia del diabete di tipo 1 e 2. (vedi Tabella 1)**

E' stata in passato suggerita la possibilità per le cellule del midollo osseo di differenziarsi in cellule in grado di produrre insulina in risposta alla concentrazione di glucosio (14-16) ma tali dati sono risultati estremamente controversi e non confermati da altri studi (17-19). Più recentemente si è ipotizzato un altro tipo di ruolo per le cellule del midollo osseo grazie all'evidenza che in alcuni modelli le cellule midollari trapiantate possono avviare la rigenerazione del pancreas endocrino attraverso la stimolazione sia della

proliferazione delle cellule beta che della neogenesi insulare (20, 21). Su questi presupposti sono stati condotti alcuni studi clinici per terapia del diabete di tipo 1 o 2 utilizzando cellule mononucleate derivate dal midollo osseo autologo non purificate infuse per via intrarteriosa a livello del pancreas (vedi tabella 1). Tra le esperienze i cui risultati sono riportati in letteratura ci sono quelle del Post Graduate Institute of Medical Education and Research (Chandigarh) in India (22, 23), dello Stem Cell Argentina (Buenos Aires) in Argentina (24), del Central Hospital of Wuhan (Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei) (25) e dello Stem Cell Research Center (Qingdao University, Qingdao) in Cina (26) e di infine dello Hospital Clinic Universitari (Barcellona) in Spagna (27). In relazione al diabete di tipo 1, lo studio clinico condotto allo Hospital Clinic Universitari di Barcellona non ha mostrato effetti in termini di livelli sierici di C-peptide (sia basali che stimolati), di cambiamenti nel fabbisogno d'insulina o di controllo metabolico dopo infusione nei pazienti trattati. A causa della mancanza di efficacia questo studio, inizialmente volto a reclutare dieci soggetti, è stato interrotto dopo il terzo paziente. In relazione al diabete di tipo 2 i risultati pubblicati sono di difficile interpretazione. Venticinque pazienti con diabete di tipo 2 hanno ricevuto un trapianto autologo di cellule mononucleate del midollo iniettate attraverso l'arteria dorsale del pancreas in combinazione con un trattamento con ossigeno iperbarico allo Stem Cells Argentina Medical Center di Buenos Aires (24): tutti i parametri metabolici misurati (glicemia e c-peptide a digiuno, HbA1c, fabbisogno insulinico) sono risultati migliori rispetto al basale nel primo anno di follow-up. Miglioramento del controllo glicemico e diminuzione del fabbisogno insulinico o dell'utilizzo degli ipoglicemizzanti orali sono stati riportati anche in 31 pazienti con diabete di tipo 2 reclutati al Central Hospital of Wuhan in Cina (25) e trattati in modo analogo. Esperienze simili sono in corso anche al Fuzhou General Hospital alla Shandong University sempre in Cina, anche se al momento i risultati non sono ancora stati resi noti. Più recentemente Hu et al (26) della Qingdao University in Cina hanno descritto l'efficacia a 3 anni della somministrazione di cellule autologhe mononucleate di midollo in comparazione con la terapia convenzionale in 118 pazienti con diabete di tipo 2, riportando un miglioramento significativo del controllo glicemico e una diminuzione del fabbisogno insulinico o dell'utilizzo degli ipoglicemizzanti orali nei pazienti trapiantati rispetto ai controlli. Esperienza analoga è stata descritta anche al Postgraduate Institute of Medical Education and Research in India (22, 23). Qui è stato iniziato uno studio che prevedeva l'impiego di cellule staminali ematopoietiche e l'utilizzo come sito d'iniezione non dell'arteria dorsale del pancreas ma dell'arteria pancreaticoduodenale che vascolarizza preferenzialmente la testa del pancreas e parte del corpo. Sei dei dieci pazienti trattati hanno mostrato una riduzione significativa del fabbisogno insulinico rispetto al basale (74%, con un paziente che ha raggiunto e mantenuto l'insulino indipendenza per quindici mesi).

In linea generale i risultati di questi studi sono di difficile interpretazione: il disegno sperimentale non è stato adeguato e gli studi mancano di un braccio di controllo, hanno un'alta percentuale di drop-out, sono state incluse popolazioni eterogenee con diversi trattamenti ipoglicemizzanti al basale e con un pessimo controllo glicemico. Anche quando un gruppo di controllo è stato inserito nel disegno sperimentale (25) lo studio non è stato randomizzato, e anzi è stata lasciata ai pazienti la possibilità di scegliere il braccio di trattamento. In

genere è riportato un beneficio, quasi sempre transitorio, ma non è chiaro se l'effetto è indotto dal miglior trattamento correlato all'ingresso nello studio clinico o al miglior controllo terapeutico conseguente a un reale beneficio determinato dall'infusione del midollo osseo. In accordo con il Reflection paper on classification (25-b) del Comitato per le Terapie Avanzate (CAT) dell' Agenzia Europea dei Medicinali (EMA), un prodotto la cui sostanza attiva è composta da cellule mononucleate di midollo infuse per via arteriosa intrapancreatica con lo scopo di ripristinare o modificare livelli insulinemici, e quindi trattare il diabete, è da classificarsi come prodotto medicinale di terapia avanzata (ATMP). In conclusione, al momento attuale non c'è nessuna chiara evidenza a supporto di un utilizzo del midollo autologo infuso per via arteriosa intrapancreatica. La somministrazione di un simile prodotto medicinale quindi deve prevedersi come sperimentazione clinica di un prodotto medicinale sperimentale e deve essere di conseguenza proposta ai pazienti solo all'interno di studi clinici controllati e adeguatamente valutati dai comitati etici e dalla autorità regolatoria competente.

### **Trapianto di cellule staminali ematopoietiche da midollo osseo per la terapia del diabete di tipo (Vedi tabella 2).**

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche è ormai ampiamente riconosciuto come una terapia curativa per molte malattie ematologiche. Nel corso degli ultimi due decenni, il trapianto di cellule staminali ematopoietiche autologhe è stato anche studiato come una opportunità terapeutica per i pazienti affetti da gravi malattie autoimmuni considerati refrattari alle terapie convenzionali (28-30). Il razionale alla base di questi studi risiede nella convinzione che sia possibile rimpiazzare il sistema immunitario difettoso, in quanto in grado di riconoscere come antigeni le proteine self, con uno sano, rigenerato a partire dalle proprie cellule staminali ematopoietiche in assenza delle presunte circostanze ambientali accidentali che hanno portato allo sviluppo della risposta autoimmune. Nella routine clinica, i riceventi di un trapianto di cellule staminali ematopoietiche sono sottoposti a una potente terapia immunosoppressiva non prima, però, di aver mobilizzato dal midollo al sangue periferico le cellule staminali ematopoietiche utilizzando diversi protocolli in genere basati sull'utilizzo del Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) e/o della Ciclofosfamide (un farmaco mielosoppressivo che conduce alla mobilitazione di queste cellule per un fenomeno di "rebound"). Nonostante il successo clinico ben documentato del trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche nel correggere alcune malattie autoimmuni (31), una spiegazione accurata dei meccanismi di azione di questo trattamento è ancora difficile. Chiaramente, il trapianto è accompagnato da un vasto debulking del sistema immunitario del ricevente grazie ai potenti protocolli di condizionamento immunosoppressivi come l'irradiazione corporea totale (TBI), la ciclofosfamide, l'utilizzo di anticorpi monoclonali depletanti (anti-CD2, anti-CD52), la fludarabina o la globulina anti-timociti (ATG); questi trattamenti comportano una profonda linfopenia di lunga durata associata a livelli ridotti delle plasmacellule in grado di produrre autoanticorpi (32) ed è stato dimostrato che l'uso di tali terapie linfoablative, anche in assenza del trapianto di cellule ematopoietiche, è in grado di per sé di arrestare o rallentare la progressione

delle patologie autoimmuni (33). D'altra parte, accanto all'effetto immunosoppressivo aspecifico associato ai protocolli di induzione, vi sono anche evidenze che l'autotrapianto di cellule staminali ematopoietiche possa ristabilire la tolleranza immunologica modulando le cellule T regolatorie e riattivando la funzione timica (34-36). Purtroppo a causa della persistenza delle cellule immunitarie autoreattive (linfociti T e B memoria, plasmacellule a lunga vita) l'autoimmunità può riproporsi dopo un trapianto di cellule staminali autologhe e ulteriori studi sono necessari per individuare i protocolli d'induzione ottimali per ottenere una remissione stabile e duratura dell'autoimmunità. Potenzialmente più efficace nel prevenire la ricorrenza dell'autoimmunità è il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche. Infatti, un condizionamento moderato che non comporti l'ablazione completa delle cellule staminali ematopoietiche autologhe associato a un trapianto di cellule ematopoietiche allogeniche è in grado di indurre una condizione denominata "mixed hematopoietic chimerism" in cui cellule ematopoietiche del donatore e del ricevente coesistono a costituire un sistema immunitario misto. In questa condizione i linfociti T ad alta affinità per le proteine autologhe possono essere eliminati assicurando lo sviluppo di una nuova tolleranza verso il self (37, 38). Essendo il diabete di tipo 1 una patologia autoimmune si è valutato negli ultimi anni la possibilità di utilizzare il trapianto di cellule staminali ematopoietiche per la sua terapia. L'utilizzo del trapianto allogenico di midollo per prevenire lo sviluppo del diabete di tipo 1 è stato proposto per la prima volta nel 1985 nel modello del topo NOD (39) e più recentemente il trapianto di cellule staminali allogeniche e lo sviluppo del "mixed hematopoietic chimerism" hanno ricevuto una grande attenzione per la terapia del diabete di tipo 1. Numerosi studi preclinici hanno dimostrato l'efficacia del trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche sia nella prevenzione che nella remissione del diabete di tipo 1 (40-42) ma, a dispetto dei risultati preclinici, il trapianto autologo è stato preferito rispetto al trapianto allogenico nei primi trials clinici, visto il minor rischio di tossicità severa. Il primo tentativo di valutare la sicurezza e l'efficacia di un regime immunosoppressivo non mieloablativo seguito dal trapianto di cellule staminali ematopoietiche autologhe nei pazienti con diabete di tipo 1 è stato proposto da Voltarelli et al in Brasile (43, 44) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00315133). In questo studio di fase I/II, 23 pazienti di età compresa tra i 13 e i 31 anni con esordio di diabete di tipo 1 entro le sei settimane precedenti sono stati sottoposti alla mobilizzazione delle cellule staminali ematopoietiche (e successivo recupero e criopreservazione) mediante l'utilizzo di G-CSF e ciclofosfamide. Prima della reinfusione delle cellule staminali ematopoietiche autologhe i pazienti hanno ricevuto una terapia di condizionamento immunosoppressiva con ATG e ciclofosfamide. Nei mesi successivi (follow-up medio 29.8) 20 dei 23 pazienti hanno avuto remissione della malattia e acquisito l'insulina indipendenza. Dodici di questi 20 hanno mantenuto lo stato d'insulina indipendenza all'ultimo follow-up (media 31 mesi, range 15-52 mesi), mentre otto hanno avuto una ricorrenza del diabete con necessità di terapia insulinica, sebbene a basse dosi (0.1-0.3 IU/kg). Non è stata riportata una mortalità associata al trattamento, anche se due pazienti hanno sviluppato una polmonite ospedaliera bilaterale, 3 pazienti disfunzioni endocrine tardive e 9 oligospermia (43, 44). Nel 2009-2011 risultati simili sono stati replicati in 8 pazienti trattati in Polonia utilizzando lo stesso protocollo (45, 46).

Tutti i pazienti hanno raggiunto l'insulino indipendenza con un miglioramento notevole del controllo metabolico (HbA1c da 12.3% a 6.2% a 6 mesi dal trapianto autologo) e con un unico paziente che ha presentato la ricorrenza del diabete a 7 mesi. Li et al (47) hanno riportato i risultati ottenuti in 13 pazienti con lo stesso schema di mobilizzazione e condizionamento, estendendo l'indicazione entro i 12 mesi dall'esordio del diabete invece che entro le 6 settimane: 1) in 11 pazienti su 13 si è riscontrata una significativa riduzione del fabbisogno insulinico, 2) in 3 di 11 pazienti si è ottenuta l'insulino-indipendenza nei tre mesi successivi al trapianto delle staminali e questa è stata mantenuta per 7 mesi, più di 3 e più di 4 anni rispettivamente, 3) livelli normali di HbA1c sono stati mantenuti in 7 degli 8 pazienti che hanno raggiunto un follow-up di 2 anni. Inoltre lo stesso gruppo ha pubblicato un case report (48) in cui si dimostra che l'insulino indipendenza può essere raggiunta anche in pazienti che hanno avuto un esordio di diabete con chetoacidosi, condizione che era stata esclusa dai precedenti trials. A dispetto di questo risultato, Gu et al. hanno dimostrato in uno studio prospettico di fase 2 che il trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche può essere più efficace sul lungo periodo se la popolazione inserita non ha esordito con chetoacidosi (49, 50). Più recentemente però sono stati pubblicati dati meno confortanti sull'efficacia di questo approccio: il gruppo cinese del Beijing Children's Hospital (51) ha riportato i risultati di uno studio disegnato per valutare la sicurezza e l'efficacia del trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche in confronto alla terapia insulinica convenzionale in 42 bambini (età 1.5-12.5 anni) all'esordio di diabete di tipo 1: 14 pazienti sono stati sottoposti a trapianto entro 3 mesi dall'esordio mentre 28 pazienti controllo sono stati trattati con terapia insulinica nello stesso periodo. I risultati riportati di follow-up (a 3-5 anni) descrivono che l'autotrapianto ha determinato: 1) insulino indipendenza in 3 dei 14 pazienti per 2, 3 e 11 mesi rispettivamente, 2) assenza di episodi di chetoacidosi, 3) nessuna differenza significativa nel fabbisogno insulinico e nei valori di C peptide, 4) HbA1c significativamente più alta rispetto ai controlli (51). La conclusione dello studio è che non sussiste un reale beneficio a favore del trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche (51). I dati cumulativi dell'esperienza del centro polacco (45, 46) e di due dei centri cinesi (47-50) che hanno utilizzato questo approccio terapeutico sono stati recentemente analizzati (52): in totale sui sessantacinque pazienti trattati il 59% ha raggiunto l'insulino indipendenza entro 6 mesi dal trapianto e il 32% l'ha mantenuta all'ultimo follow-up. Inoltre in tutti è stata riportata una diminuzione dei valori di HbA1c e un incremento dei valori di peptide C. A dispetto dei risultati apparentemente incoraggianti, il 52% dei pazienti ha avuto eventi avversi ed è stato riportato un decesso, sottolineando la difficoltà a giustificare un trattamento così potenzialmente pericoloso all'esordio del diabete di tipo 1. Alcuni studi clinici basati su quest'approccio sono ancora attivi o in attesa di un più lungo follow-up (NCT01121029, NCT01285934) e, quando pubblicati, aiuteranno a completare il quadro. Al momento è difficile esprimere un giudizio finale. C'è anche in questo caso da sottolineare che, a dispetto delle numerose esperienze cliniche, la maggior parte degli studi non ha incluso un gruppo di controllo randomizzato con terapia insulinica tradizionale o con solo immunosoppressione, e quando è stato fatto, non è risultato evidente un reale beneficio a favore del trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche (51). *Solo il*

monitoraggio a lungo termine dei pazienti trattati fino ad ora potrà chiarire meglio il rapporto rischio beneficio di questo approccio per la terapia del diabete di tipo 1 che, al momento, sembra difficilmente giustificabile considerando la morbidità e la mortalità associata al trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche nel campo delle malattie autoimmuni (30, 53, 54).

### **Somministrazione di cellule stromali/staminali mesenchimali (MSC) per la terapia del diabete (vedi Tabella 3)**

Le MSC costituiscono un'altra componente cellulare del midollo osseo e sono essenziali per il mantenimento della nicchia delle cellule staminali ematopoietiche. Le MSC sono state oggetto di approfondite ricerche per decenni. Più di trentamila lavori scientifici riguardanti queste cellule sono stati pubblicati su riviste indicizzate descrivendo la loro capacità di differenziarsi in molteplici linee, di sostenere l'emopoiesi, di esercitare immunoregolazione e di secernere fattori di crescita e citochine. Questo campo di studi è cresciuto in modo particolare negli ultimi 20 anni con la scoperta di nuove funzionalità di queste cellule (55-57). Infatti, all'inizio le cellule staminali mesenchimali erano isolate solo dal midollo osseo e classificate come cellule staminali multipotenti per il lineage mesenchimale (ossa, grasso, cartilagine), in un secondo periodo invece queste cellule hanno iniziato a essere isolate praticamente da tutti i tessuti post natali (tessuto adiposo, gelatina di Wharton, polpa dentale, pancreas, liquido amniotico, fegato) ed è stata descritta la loro capacità di differenziarsi *in vitro* anche lungo il lineage ectodermico ed endodermico. In una terza e ultima fase, l'interesse per le cellule staminali mesenchimali si è spostato dalla loro plasticità alla loro capacità di modulare la funzione dei tessuti; un gran numero di studi ha infatti riportato che queste cellule hanno funzioni immunomodulatorie e di cellule "nutrici" che vengono esercitate sia mediante contatto diretto cellula-cellula sia mediante secrezione di citochine e/o altri fattori solubili (58). L'ipotesi che esse possano contribuire alla rigenerazione dei tessuti modulando l'infiammazione ha inaugurato un nuovo interesse per il loro uso come strumento terapeutico per sopprimere l'infiammazione e inibire le risposte immunitarie nella Graft versus host disease (GVHD), nella malattia di Chron e nelle malattie autoimmuni come il diabete, la sclerosi multipla, l'artrite reumatoide e, come recentemente dimostrato, in patologie estremamente severe quale l'Acute Respiratory Distress Syndrome o ARDS (59). Le proprietà immunomodulatorie e anti-infiammatorie non sono costitutivamente espresse dalle MSC, ma sono rapidamente indotte dall'attivazione mediante citochine infiammatorie quali IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , un processo chiamato "licensing" che avviene sia *in vitro* che *in vivo*, costituendo un requisito per la loro efficacia terapeutica(60).

In relazione alle caratteristiche immunomodulatorie e alla possibilità di utilizzo delle cellule staminali mesenchimali in protocolli clinici alcuni elementi chiave sono oramai stati definiti, come ottimamente recensito di recente da Wang e al (58). In breve:

- Le cellule staminali mesenchimali, quando sono iniettate per via endovenosa, rimangono in gran parte intrappolate nei polmoni, un'altra parte rilevante è oggetto di un attacco del sistema



immunitario (instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR) {Moll, 2012 #15343}{Moll, 2014 #15352}, ma alcune, se sussiste un danno tissutale, sono in grado di migrare nella sede del danno e partecipare alla riparazione dello stesso (61)

- La percentuale di cellule staminali mesenchimali che persistono nel sito di localizzazione è bassa e la permanenza è in genere di breve durata, suggerendo un effetto di "hit-and-run" sul tessuto danneggiato (57)
- In risposta a mediatori dell'infiammazione le cellule staminali mesenchimali sono in grado di produrre un gran numero di fattori solubili (citochine, chemochine, fattori di crescita) in grado di regolare l'infiammazione e il rimodellamento del tessuto. Tra i fattori conosciuti sono stati descritti TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , HGF, EGF, IGF, FGF, PDGF, KGF, angiopoietina-1, PGE2, VEGF, SDF-1,IDO, NO e iNOS (62).
- Le cellule staminali mesenchimali hanno la capacità di modulare la risposta immunitaria sia come soppressori che come amplificatori, a seconda del tipo e intensità dei segnali che ricevono dal microambiente (63). Una volta attivate da stimoli infiammatori, sono in grado di esercitare un effetto sulle cellule del sistema immunitario sia innato e sia adattativo e, in particolare, sono in grado di sopprimere la funzione delle cellule T e B, cellule NK, cellule dendritiche, macrofagi e neutrofili. (60).
- Nel processo di riparazione dei tessuti le cellule staminali mesenchimali sono in grado di esercitare un'azione anche sulle cellule endogene del tessuto danneggiato, per esempio proteggendole dall'apoptosi o stimolandone la proliferazione (64).

Resta tuttavia da definire quali siano i test funzionali *in vitro* che meglio possono predire l'efficacia terapeutica delle MSC come agenti immunomodulatori, fungendo così da criteri di rilascio del lotto di cellule da utilizzare nel paziente, oltre a costituire la base per una comparazione dei risultati dei vari protocolli clinici basati su MSC. A tal proposito, da qualche anno è in corso un grosso sforzo all'interno di società scientifiche quali l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) per condividere una piattaforma di test funzionali che possa portare rapidamente a delle linee guida per l'impiego terapeutico delle MSC nell'ambito delle patologie infiammatorie e autoimmunitarie (65, 66)

Analogamente al processo generale delle conoscenze sulle cellule staminali mesenchimali, anche per la loro applicazione nel campo del diabete si è assistito a una prima fase focalizzata sulla differenziazione in cellule che producono insulina, con l'obiettivo di fornire una fonte autologa di tessuto per trapianto, a una seconda fase il cui utilizzo è stato finalizzato alla modulazione della risposta immunitaria e del rimodellamento tissutale.

Molti tentativi sono stati fatti per differenziare le cellule staminali mesenchimali *in vitro* in cellule che producono insulina. Diversi studi hanno riportato la comparsa di mRNA dell'insulina in colture trattate con combinazioni definite di fattori di crescita (67-69). Un esempio per i molti studi compiuti in questo settore è lo studio recentemente pubblicato in cui è stato applicato un protocollo di differenziazione di 18 giorni con

l'utilizzo di FGF- $\beta$ , EGF, activinA e  $\beta$ -cellulin (70). Cellule differenziate hanno formato aggregati di cellule, alcuni dei quali molto simili alle isole pancreatiche in grado di produrre C-peptide (70). I limiti di questo e di molti studi pubblicati precedentemente sono che, a una valutazione più attenta, nessuno di queste cellule differenziate mostra le condizioni necessarie per essere definite come cellule beta, in particolare la secrezione d'insulina in risposta al glucosio e la capacità di normalizzare la glicemia in modelli animali diabetici. Inoltre, in un recente studio sono stati evidenziati alcuni aspetti di safety, in quanto, in contesti in cui le cellule staminali mesenchimali sono state forzatamente convertite in un altro tipo di cellula, le cellule differenziate ottenute erano in grado di migliorare l'iperglicemia nei topi diabetici ma avevano anche un potenziale tumorigenico. (71). Finora, pur consapevoli che il rischio di trasformazione neoplastica può essere anche maggiore, i dati più convincenti sulla riprogrammazione delle cellule staminali mesenchimali in cellule beta funzionali derivano dagli studi che hanno utilizzato un approccio di modificazione genica. Questo approccio si basa principalmente sull'espressione forzata dei fattori di trascrizione correlati con lo sviluppo embrionale del pancreas quali Pdx1 e/o Ngn3 (72-77), ma questa strategia deve essere migliorata al fine di aumentarne l'efficacia prima di poter generare un buon candidato per la sostituzione delle cellule beta in applicazioni cliniche, anche se è evidente in ogni caso che è fortemente limitata dal rischio di tumorigenesi.

Le capacità delle cellule staminali mesenchimali di modulare la risposta immunitaria e di riparare i tessuti sono state testate e validate in diversi modelli preclinici di diabete (78-81). Le esperienze in vitro e nei modelli animali, insieme al crescente numero di dati per quanto riguarda le applicazioni cliniche delle cellule staminali mesenchimali in altre malattie (82), hanno portato allo sviluppo di sperimentazioni cliniche anche nel campo del diabete. Tra questi studi clinici, fino ad oggi solo uno è stato completato e i dati sono stati pubblicati (83). Questo studio (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01068951) è stato eseguito presso l'Università di Uppsala (Svezia) e ha avuto lo scopo di valutare la sicurezza e l'efficacia della somministrazione di cellule staminali mesenchimali autologhe derivate dal midollo osseo in pazienti con recente insorgenza di diabete di tipo 1. L'ipotesi di partenza è che un aumento del numero di cellule staminali mesenchimali circolanti fornirebbero immunomodulazione, e quindi sarebbe in grado di interrompere il processo immunitario che causa la morte delle cellule beta nel diabete di tipo 1. Venti pazienti sono stati randomizzati al trapianto o al gruppo di controllo. La sicurezza del trattamento è stata dimostrata, poiché il trattamento con cellule staminali mesenchimali autologhe è stato ben tollerato e non sono stati osservati effetti collaterali. L'end-point primario di efficacia è stato centrato, in quanto è stato riscontrato un miglioramento della risposta secretoria del C-peptide a un pasto misto durante il primo anno post trattamento nei pazienti trattati con cellule staminali mesenchimali rispetto ai controlli. Questi risultati incoraggianti hanno aperto la strada a un più ampio studio, randomizzato e in doppio cieco, con un follow-up più lungo, per validare i risultati ottenuti. Questo nuovo studio (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02057211) sta reclutando i partecipanti e la data di completamento stimata è maggio 2017. Un altro importante studio clinico è stato effettuato da Mesoblast International Srl, in collaborazione con JDRF.

Questo studio (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00690066) di fase II, multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo è volto a testare la sicurezza e l'efficacia di Prochymal®, una linea di cellule staminali mesenchimali umane derivate da midollo, in pazienti con recente diagnosi di diabete di tipo 1. La valutazione intermedia a un anno ha dimostrato che l'infusione sistemica di Prochymal® è ben tollerata e non vi sono differenze nei tassi di eventi avversi con il gruppo placebo. In termini di efficacia non si sono evidenziati benefici per quanto riguarda la conservazione della funzione secretoria misurata come rilascio di C peptide sotto stimolo, anche se è stata evidenziata una tendenza verso un minor numero di eventi ipoglicemici per i pazienti trattati con Prochymal rispetto ai controlli. Questo studio è ora concluso e un'analisi completa dei dati è attesa per il prossimo anno. Tra gli altri studi iniziati, prevalentemente in Cina, l'unico che apparentemente è attivo e sta reclutando pazienti è in corso presso University of São Paulo, in Brasile (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01322789) in cui si sta testando l'infusione per via endovenosa di cellule staminali mesenchimali autologhe ottenute da midollo osseo di parenti di primo grado in pazienti con T1D recente diagnosi.

Il potenziale delle cellule staminali mesenchimali di migliorare l'iperglicemia in animali diabetici grazie al rilascio di fattori trofici per le cellule beta (in grado di proteggere le cellule  $\beta$  esistenti, stimolare la generazione di cellule  $\beta$  endogene da precursori pancreatici e ridurre la resistenza periferica all'insulina) ha spinto la ricerca sul loro uso nel diabete di tipo 2 e di tipo 1 di lunga durata. (84-86). Molti studi clinici sono stati iniziati, e tra questi sono stati recentemente pubblicati i dati di uno studio condotto da Mesoblast (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01576328), la stessa società che ha testato Prochymal® nel diabete di tipo 1, sull'utilizzo di cellule precursori mesenchimali (MPC, rexlemestrocil-L) nel diabete di tipo 2 (87). Si tratta di uno studio randomizzato, controllato con placebo, di dose-escalation, che ha l'obiettivo di valutare la sicurezza e la tollerabilità di una singola infusione endovenosa di cellule staminali mesenchimali allogene nei pazienti con controllo sub-ottimale con metformina. Lo studio ha dimostrato la sicurezza e la fattibilità dell'infusione di precursori mesenchimali allogenici derivati da midollo osseo adulto (dose massima  $2 \times 10^6/\text{kg}$ ) e ha descritto anche un modesto miglioramento metabolico in termini di HbA1c associato al trattamento, anche se il follow up di 12 settimane e la scarsa numerosità dei soggetti reclutati (61) non consentono di trarre conclusioni definitive. Un'altra esperienza interessante, ancora in corso, è uno studio cinese (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01954147), che sta sperimentando una terapia combinata di cellule staminali mesenchimali allogene da cordone ombelicale e Liraglutide in pazienti con diabete di tipo 2. Altri studi con lo stesso razionale prevedono l'infusione, sistemica o intrapancreatica, di cellule staminali mesenchimali ottenute da diversi distretti tra cui il cordone ombelicale, il sangue mestruale e la placenta (NCT01759823, NCT01453751, NCT02302599, NCT01759823), ma al momento non si hanno pubblicazioni dei risultati. Per cui al momento attuale non c'è nessuna chiara evidenza a supporto di un utilizzo delle cellule staminali mesenchimali come terapia standard per il diabete anche se qualche evidenza clinica è risultata incoraggiante. Tale procedura deve essere quindi proposta solo all'interno di studi clinici controllati e adeguatamente valutati dai comitati etici e dall'autorità regolatoria competente.

## **Cordone ombelicale e annessi extraembrionali come sorgente di cellule staminali per la terapia del diabete. (vedi Tabella 4)**

Il cordone ombelicale rappresenta un'altra possibile fonte di cellule staminali con potenziale di differenziazione e capacità immunoregolatorie simili a quelle ottenute dal midollo osseo. Negli esseri umani, il cordone ombelicale contiene normalmente due arterie ombelicali e una vena, contenute all'interno di un tessuto connettivo circostante chiamato gelatina di Wharton (88). Il sangue cordonale è costituito dal sangue rimasto nel cordone ombelicale e nella placenta dopo il parto. Dopo il primo utilizzo del sangue cordonale nel 1988 per il trattamento dell'anemia di Fanconi (89), si è assistito ad un notevole sviluppo della sua applicazione come fonte di cellule per il trattamento di molte malattie ematologiche e non (90). Infatti, le cellule staminali derivate dal sangue cordonale possono essere facilmente raccolte e crioconservate per anni senza significative perdite di vitalità (91, 92). Il cordone ombelicale contiene 60-200 ml di sangue e la sua raccolta è in grado di permettere l'isolamento di circa  $10 \times 10^6$  cellule per ml (93). Il sangue cordonale è composto da globuli rossi, globuli bianchi, piastrine, plasma ed è anche ricco di cellule staminali multipotenti o pluripotenti in grado di differenziarsi in vari tessuti (94). Tra le cellule staminali isolate ci sono cellule staminali embrionali, precursori endoteliali, cellule staminali ematopoietiche e cellule staminali mesenchimali (95, 96). Le cellule staminali embrionali del cordone ombelicale sono una popolazione di cellule recentemente scoperta, caratterizzata da dimensioni molto ridotte che esprimono i marcatori embrionali Oct4, Nanog e SSEA-4 e sono considerate virtualmente totipotenti (97). I precursori endoteliali sono cellule CD133+ CD34+ VEGFR2+ e sono considerate come la fonte più promettente di cellule staminali per l'integrazione in strutture vascolari con l'obiettivo di rigenerare i vasi sanguigni (98). Le cellule staminali mesenchimali sono identificate come cellule CD44+ CD73+ CD90+ CD105+, con la potenzialità di differenziarsi in vari lineage cellulari quali il condrogenico, l'adipogenico e l'osteogenico. Queste cellule possono essere facilmente raccolte sia dal sangue cordonale che dalla gelatina di Wharton (88). Infine, le cellule staminali ematopoietiche sono le più solidamente conosciute e utilizzate. A differenza delle cellule staminali ematopoietiche ottenute dal midollo osseo dell'adulto, quelle ottenute dal sangue cordonale hanno numerosi vantaggi, tra cui un maggiore potenziale proliferativo, un tasso più alto di ciclo cellulare e una lunghezza dei telomeri maggiore (95). Inoltre, a causa dell'immaturità immunologica di questo tessuto, le cellule ottenute dal cordone ombelicale in caso di trapianto non correlato tollerano meglio la disparità HLA tra il donatore e il ricevente e sono associate ad un minor rischio di GVHD grave acuta (96, 99, 100). Le cellule ematopoietiche del cordone sono oggi considerate le cellule più appropriate per le procedure di trapianto per il trattamento di malattie, ematologiche e non, nei pazienti in cui non è possibile identificare un donatore compatibile (90, 101).

Negli ultimi anni, l'utilizzo di cellule ottenute dal cordone ombelicale per la regolazione del sistema immunitario in varie malattie autoimmuni ha acquisito grande interesse (102-105). In teoria il cordone ombelicale potrebbe avere un ruolo rilevante nel trattamento del diabete a causa della varietà di cellule

staminali disponibili in questo tessuto; infatti, sia il controllo dell'autoimmunità attraverso l'induzione di chimerismo e della tolleranza immunitaria, sia la possibilità di superare la carenza di cellule produttrici d'insulina attraverso processi di differenziazione potrebbero essere ottenuti utilizzando cellule provenienti dal cordone ombelicale. Alcuni dati sperimentali hanno mostrato una potenzialità delle cellule ottenute dal cordone ombelicale ad essere trasformate in simil-beta cellule, come confermato dalla produzione di insulina e C-peptide, ma il loro attecchimento e la sopravvivenza in vivo o non è stata testata (106, 107) o è risultata insoddisfacente per procedere ad ipotesi di utilizzo in clinica nell'uomo (108, 109).

Più vicina alla clinica appare invece la possibilità dell'utilizzo delle cellule del sangue cordonale per il trattamento del diabete di tipo 1 in relazione al loro ruolo potenziale di regolazione immunitaria. Partendo dall'evidenza che il sangue cordonale contenga una grossa popolazione di linfociti T regolatori immaturi (CD4+, CD25+, FoxP3+), si è studiato in un primo trial clinico la possibilità di infondere il sangue cordonale autologo crioconservato all'esordio del diabete di tipo 1 (110, 111). Infatti i linfociti T regolatori hanno la capacità di inibire la risposta infiammatoria e anergizzare i linfociti T effettori che svolgono un ruolo chiave nella distruzione delle cellule beta (112). In un primo studio pilota quindici bambini (età media 5,5 anni) con diabete di tipo 1 di recente diagnosi (media 4.1 mesi dall'esordio) sono stati infusi con sangue di cordone ombelicale autologo e monitorati nel tempo in termini di risposta metabolica e immunologica. A 6 mesi dall'infusione è stato osservato un aumento della popolazione di linfociti T regolatori nel sangue periferico in assenza di eventi avversi significativi associati (110, 111). Tuttavia, ad un anno dal trapianto, non sono stati osservati cambiamenti nel fabbisogno di insulina, nei livelli di peptide C, nei titoli degli autoanticorpi o nel numero di linfociti T regolatori, indicando che la procedura è fattibile e sicura, ma non ha mostrato efficacia (113). Gli stessi risultati negativi sono stati riscontrati alla fine dello studio (2 anni di osservazione), portando alla conclusione che una singola infusione di sangue da cordone ombelicale in bambini con diabete di tipo 1 non è efficace nel revertire e fermare la malattia (114), neanche quando l'infusione è stata seguita da 1 anno di supplementazione con vitamina D e Omega3 (110). Un secondo studio ha ottenuto gli stessi risultati negativi (115). Uno dei motivi per il fallimento di questi studi potrebbe essere che è stato trasferito nei pazienti un numero insufficiente di cellule con capacità rigenerativa o immunoregulatoria. A supporto di questa ipotesi in un altro studio, eseguito in sette bambini con diabete di tipo 1 di nuova diagnosi, a 6 mesi dall'infusione si è evidenziata una correlazione tra il numero di cellule ematopoietiche CD34+ presenti nel sangue cordonale e la funzione residuale delle cellule  $\beta$ , valutata mediante misurazione del peptide C dopo stimolo (115).

Un approccio diverso è stato proposto da Zhao et al., che hanno descritto in vitro e nei modelli preclinici la capacità immunomodulatoria delle cellule staminali di derivazione del cordone ombelicale sui linfociti T allogeici (116, 117). Sulla base dei risultati sperimentali ottenuti questo gruppo ha messo a punto una strategia denominata "Stem Cell Educator therapy", e l'ha applicata in uno studio clinico nell'uomo (118): 15 soggetti (età media di 29 anni, range 15-41) con una storia media di diabete di 8 anni (range 1-21) sono stati ri-infusi con linfociti autologhi derivati dal sangue periferico "rieducati" attraverso il contatto con

cellule staminali di cordone ombelicale allogeniche. Questa terapia ha apparentemente migliorato i livelli di peptide C, ha ridotto i valori di HbA1C e diminuito il fabbisogno giornaliero di insulina sia in pazienti che mostravano una funzione residua pancreatica che in quelli senza funzione residua, portando gli autori dello studio a concludere che l'approccio fosse in grado di controllare la risposta immunitaria in maniera sufficiente a consentire la rigenerazione della popolazione di cellule beta native (119). Lo stesso approccio è stato seguito in un secondo studio in aperto di fase I/II in 36 pazienti con diabete di tipo 2 di lunga durata, mostrando anche in questo caso che i pazienti trattati hanno raggiunto un miglior controllo metabolico (120). L'efficacia e la sicurezza di quest'approccio sono al momento in fase di sperimentazione in una fase I/II trial clinico in bambini con diabete di tipo 1 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01996228, NCT01350219).

In conclusione, l'uso di sangue di cordone autologo come fonte di cellule immunomodulatori per la terapia del diabete di tipo 1 è stato inefficace. Altri approcci che utilizzano cellule cordonali allogeniche sono in corso di sperimentazione e dovranno essere valutati con molta attenzione in termini di efficacia prima di poter essere applicati su un numero maggiore di pazienti.

### 3 CONSERVAZIONE SANGUE CORDONALE E ALTRE COMPONENTI STAMINALI DEGLI ANNESSI EXTRAEMBRIONALI PER LA TERAPIA DEL DIABETE.

Una delle domande ricorrenti nella pratica clinica da parte del paziente con diabete, generalmente di tipo 1, in occasione dell'attesa di un figlio è se la conservazione del sangue cordonale o di altre componenti staminali degli annessi extraembrionali può essere utile per la terapia del proprio diabete o di quella del nascituro qualora dovesse sviluppare nel futuro la malattia. Al momento attuale delle conoscenze non esiste un'applicazione clinica del sangue cordonale per il diabete che giustifichi la sua conservazione per uso privato da parte del paziente affetto da diabete.

L'argomento della conservazione del sangue cordonale merita però un approfondimento più generale al fine di poter meglio comprendere la sua utilità e i suoi limiti.

**A cosa serve conservare il sangue del cordone ombelicale?** L'utilizzo clinico del sangue del cordone ombelicale è legato al suo contenuto di cellule staminali ematopoietiche. Infatti, l'uso delle cellule staminali ematopoietiche contenute nel sangue del cordone ombelicale rappresenta una realtà terapeutica ormai consolidata per il trattamento di pazienti affetti da diverse patologie del sangue, quali malattie tumorali come la leucemia e i linfomi e patologie non tumorali come: la talassemia, l'aplasia midollare e le immunodeficienze congenite in pazienti bambini e adulti. L'elenco completo di tali patologie è riportato nell'allegato al decreto ministeriale 18 novembre 2009 "[Disposizioni in materia di conservazione di cellule staminali da sangue del cordone ombelicale per uso autologo-dedicato](#)", [aggiornato nel 2014](#). **E' possibile conservare il sangue del cordone ombelicale?** In Italia la normativa vigente consente, nell'ambito dei servizi garantiti dal Sistema Sanitario Nazionale (SSN), la raccolta e la conservazione del sangue del cordone ombelicale:

donato per uso allogenico a fini solidaristici;

- dedicato al neonato con patologia in atto al momento della nascita o evidenziata in epoca prenatale, o per uso dedicato a consanguineo con patologia in atto al momento della raccolta o pregressa, che risulti curabile con il trapianto di cellule staminali ematopoietiche;
- dedicato a famiglie a rischio di avere figli affetti da malattie geneticamente determinate per le quali sussistano comprovate evidenze scientifiche d'impiego di cellule staminali del sangue del cordone ombelicale;
- A uso autologo-dedicato nell'ambito di sperimentazioni cliniche, approvate secondo la normativa vigente, finalizzate a raccogliere le evidenze scientifiche di un possibile impiego del sangue cordonale nel caso di particolari patologie;

mentre vieta:

- la conservazione a esclusivo uso autologo, in assenza delle condizioni sopra indicate;
- la istituzione di banche private sul territorio nazionale;
- ogni forma di pubblicità connessa alle banche private.

È tuttavia consentita la raccolta del sangue del cordone ombelicale a scopo personale e la sua esportazione in strutture private al di fuori del territorio italiano secondo le regole definite da uno specifico atto normativo. Per maggiori informazioni consulta il [documento Normativa in tema di conservazione e donazione del sangue cordonale](#).

**Dove è possibile donare il sangue del cordone ombelicale?** Sul territorio nazionale, il sangue del cordone ombelicale è conservato presso strutture pubbliche (Banche del Sangue da Cordone Ombelicale) e resta a disposizione dei centri trapianto che ne avessero necessità. L'elenco delle Banche del Sangue da Cordone Ombelicale è pubblico e disponibile al seguente link: <http://www.centronazionale sangue.it/pagine/rete-banche-sangue-cordonale>. Il Centro Nazionale Sangue insieme al Centro Nazionale Trapianti opera per garantire la sicurezza e l'affidabilità delle unità conservate a tutela della salute di chi dona e di chi riceve (<http://www.centronazionale sangue.it/pagine/sangue-cordonale#sthash.lkRERMt6.dpuf>)

**Perché non è prevista la conservazione del sangue cordonale a esclusivo uso autologo?** La conservazione del sangue cordonale a uso autologo non è consentita in Italia perché, al momento, non esistono evidenze scientifiche riguardo a un suo impiego a scopo personale al di fuori dei casi previsti dalla normativa di riferimento. Per maggiori informazioni, consulta il [Position Paper](#) "Uso appropriato delle cellule staminali" e il [Position Statement](#) "Raccolta e conservazione del sangue cordonale in Italia" del Ministero della Salute. Anche l'ADISCO (Associazione Donatrici Italiane Sangue Cordone Ombelicale) ha prodotto un [Position Statement](#) sulla raccolta e conservazione del sangue cordonale in Italia.

**Esistono banche private per la conservazione del proprio sangue da cordone ombelicale?** In Italia non è possibile l'istituzione di banche private per la conservazione del sangue del cordone ombelicale, ma esiste una rete di "mediatori" che provvedono a fare il servizio di ritiro trasporto e consegna del cordone dall'Italia a una banca all'estero.

### **Banche private per la conservazione del sangue cordonale per la terapia del diabete?**

Una valutazione tramite rete ha individuato 32 siti di banche private che promuovono la conservazione del sangue del cordone ombelicale a uso "personale". Queste aziende hanno sede legale negli Stati Uniti, a San Marino, in UK, Repubblica Slovacca, Belgio, Svizzera, Polonia, Germania e Grecia mentre le sedi in cui fisicamente vengono conservate le cellule staminali sono disseminate in tutto il mondo. Il costo medio per la raccolta e la crioconservazione per circa 20 anni delle cellule del cordone è di 2370 euro (con un range tra 1570 e 3100 euro). Una revisione delle informazioni sui benefici della crioconservazione delle cellule dal sangue cordonale rivela un modello di informazioni confuse e potenzialmente fuorviante. Tutte le banche del cordone private pubblicano elenchi molto simili di malattie che "possono essere trattate" con il trapianto di sangue del cordone ombelicale, tra cui tumori, patologie caratterizzate da deficit midollare e malattie genetiche. La maggior parte di queste sono malattie curabili solo con un trapianto allogenico di cellule che derivano dal cordone ombelicale, ma molte banche commerciali non spiegano la differenza tra trapianto autologo e allogenico con sufficiente chiarezza, lasciando credere al potenziale cliente che le indicazioni per il trapianto allogenico si applichino anche ai trapianti autologhi. La maggior parte delle banche commerciali inoltre elenca anche molte condizioni che potrebbero essere trattate in futuro con terapie cellulari al momento ancora in uno stadio precoce di ricerca. Per quanto riguarda la terapia del diabete, ventotto delle 32 banche considerate riportano nei loro siti web l'utilità della crioconservazione delle cellule staminali del cordone. Nella maggior parte dei casi il diabete compare come una delle patologie che potranno essere curate in futuro e per le quali esistono dei trials clinici volti a determinarne l'efficacia. In alcuni casi l'indicazione di un potenziale utilizzo delle cellule staminali conservate nel campo del diabete è affidata alla descrizione di trials clinici (spesso con riferimento al sito [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), del NIH) o alla pubblicazione di un elenco di articoli scientifici in cui si è testato il potenziale delle cellule staminali ematopoietiche nel diabete o ancora alla testimonianza di un esperto. Alcune banche riportano un'esperienza diretta di trapianto di cellule staminali da loro conservate in soggetti con diabete di tipo 1 e 2, senza riferimenti specifici a sperimentazioni registrate o a pubblicazioni scientifiche.

## **4 CONCLUSIONE**

L'evoluzione della medicina rigenerativa e lo studio della biologia delle cellule staminali sta aprendo scenari innovativi anche nel campo terapeutico. Nonostante questo al momento tutti i trattamenti trattati in questo documento non possono essere considerati uno standard clinico e quindi devono essere effettuati solo



all'interno di studi clinici approvati dai comitati etici e dalle rispettive autorità regolatorie competenti. Al fine di poter meglio informare i pazienti si segnala che la International Society for Stem Cell research ha stilato delle linee guida per i pazienti sulla partecipazione a trial con terapia cellulare tradotti in molte lingue, compreso l'italiano che si possono trovare nel web all'indirizzo: <http://www.closerlookatstemcells.org/docs/default-source/patient-resources/patient-handbook---italian.pdf?sfvrsn=4>

**Tabella 1. Studi su trapianto di cellule mononucleate del midollo osseo autologhe per la terapia del diabete**

<b>ClinicalTrial.gov</b>	<b>Sede</b>	<b>Cellule</b>	<b>Sito infusione</b>	<b>Diabete</b>	<b>Stato</b>	<b>Ref</b>
NCT00821899	Hospital Clinic Universitari, Barcellona, Spagna	Cellule mononucleate midollo osseo	Intrapancreatica, intraarteriosa	Tipo 1	Completato	(27)
NCT00644241 NCT01065298	Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Pgimer, Chandigarh, India	Cellule mononucleate midollo osseo	Intrapancreatica intraarteriosa	Tipo 2	Sconosciuto	(22, 23)
NCT00767260	Fuzhou General Hospital Fuzhou, Fujian, China	Cellule mononucleate midollo osseo + terapia iperbarica	Intrapancreatica intraarteriosa	Tipo 2	Attivo ma non reclutante	-
NCT01677013	Peking University Aerospace Centre Hospital, Beijing, China	Cellule mononucleate midollo osseo+ terapia iperbarica	Intrapancreatica intraarteriosa	Tipo 2	Attivo reclutante	-
NCT00465478	Qilu Hospital of Shandong University, China	Cellule mononucleate midollo osseo	Intrapancreatica intraarteriosa	Tipo 1 e 2	Sconosciuto	-
NCT00971503	Pontificia Universidad Catolica de Chile, Santiago de Chile, Cile	Midollo osseo totale	Intrapancreatica intraarteriosa	Tipo 1	Sospeso	-
NCT01143168 NCT01142050	Armed Police General Hospital, P. R. Beijing, China	Cellule mononucleate midollo osseo + MSC da cordone ombelicale	Intrapancreatica intraarteriosa, intravenosa sistemica	Tipo 1 e 2	Sconosciuto	-
NCT01832441	Chaitanya Hospital, Pune, Maharashtra, India	Cellule mononucleate midollo osseo	Non chiaro	?	Attivo reclutante	-
NCT01786707	University of Miami, USA	Cellule mononucleate midollo osseo + terapia iperbarica	Intrapancreatica intraarteriosa	Tipo 2	Completato	

**Tabella 2. Studi su trapianto di cellule staminali ematopoietiche autologhe per la terapia del diabete di tipo 1**

<b>ClinicalTrial.gov</b>	<b>Sede</b>	<b>Mobilizzazione</b>	<b>Condizionamento</b>	<b>Diabete</b>	<b>Stato</b>	<b>Ref</b>
NCT00315133	University of São Paulo, School of Medicine of Ribeirão Preto, Brasile	cyclophosphamide (2.0 g/m <sup>2</sup> ), G-CSF (10 µg/kg/die)	cyclophosphamide (200 mg/kg), ATG (4.5 mg/kg).	Entro 6 settimane da esordio	Sconosciuto	(43, 44)
NCT01341899	Hospital of Nanjing University, Jiangsu, Cina	cyclophosphamide (2.0 g/m <sup>2</sup> ), G-CSF (10 µg/kg per day)	cyclophosphamide (200 mg/kg), ATG (4.5 mg/kg).	Entro 12 mesi da esordio	Attivo reclutante	(47, 48)
NCT01121029	Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González; Monterrey, Nuevo Leon, Messico	cyclophosphamide (1.5 g/m <sup>2</sup> ), G-CSF (10 µg/kg per day)	cyclophosphamide (500 mg/kg); fluradabina (30mg/m <sup>2</sup> )	Entro 4 settimane da esordio	Completato	-
NCT00807651	Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, Cina	cyclophosphamide (2.0 g/m <sup>2</sup> ), G-CSF (10 µg/kg per day)	cyclophosphamide (200 mg/kg), ATG (4.5 mg/kg).	Entro 6 mesi da esordio	Attivo ma non reclutante	(49, 50)
NCT01285934	Northwestern University, Chicago, Illinois, United States	cyclophosphamide (2.0 g/m <sup>2</sup> ), G-CSF (10 µg/kg per day)	cyclophosphamide (200 mg/kg), ATG (4.5 mg/kg), rituxan (500mg)	Entro 5 mesi da esordio	Attivo reclutante	-

**Tabella 3. Studi su trapianto di cellule stromali/staminali mesenchimali (MSC) per la terapia del diabete**

ClinicalTrial.gov	Sede	meccanismo	cellule	Sito infusione	Diabete	stato	Ref
NCT01068951	Uppsala University Hospital, Sweden	immunomodulazione	Autologhe da midollo osseo	Infusione sistemica	Tipo 1 esordio	Completato	(83)
NCT02057211	Uppsala University Hospital, Sweden	immunomodulazione	Autologhe da midollo osseo	Infusione sistemica	Tipo 1 esordio	Reclutante	(83)
NCT00690066	Mesoblast International Srl in partnership con JDRF	immunomodulazione	linea di cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo (Prochymal)	Infusione sistemica	Tipo 1 esordio	Completato	-
NCT01322789	University of São Paulo, School of Medicine of Ribeirão Preto, Brasile	immunomodulazione	Allogeniche da parente di primo grado da midollo osseo	Infusione sistemica	Tipo 1 esordio	Reclutante	-
NCT01219465	Qingdao University, Qingdao, Cina	immunomodulazione	Allogeniche da cordone ombelicale	Infusione sistemica	Tipo 1 esordio	Sconosciuto	-
NCT01157403	Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing, China	immunomodulazione	Autologhe da midollo osseo	Infusione sistemica	Tipo 1 esordio	Sconosciuto	-
NCT01374854	Fuzhou General Hospital Fuzhou, Fujian, China	riparazione tissutale	Allogeniche da cordone ombelicale	Intrapancreatica intraarteriosa	Tipo 1	Sconosciuto	-
NCT01496339	First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China	Riparazione tissutale	Allogeniche da sangue mestruale	Intrapancreatica intraarteriosa	Tipo 1	Sconosciuto	-
NCT02302599	Chinese PLA General Hospital, Beijing, Beijing, China	Riparazione tissutale	Allogeniche da cordone ombelicale	Infusione sistemica	Tipo 2	Reclutante	-
NCT01759823	Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Pgimer, Chandigarh, India	Riparazione tissutale	Autologhe da midollo osseo	Intrapancreatica intraarteriosa	Tipo 2	Reclutante	-
NCT01576328	Mesoblast International Srl	Riparazione tissutale	linea di cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo (Prochymal)	Infusione sistemica	Tipo 2	Attivo ma non reclutante	-
NCT01954147	Diabetes Care	Riparazione	Allogeniche da	Infusione	Tipo 2	Attivo ma	-

	Center of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian, China	tessutale	cordone ombelicale+ liraglutide	sistemica		non reclutante	
NCT01453751	Ageless Institute, Miami, Florida, United States	Riparazione tessutale	Singeneiche da tessuto adiposo	Intrapancreatica intraarteriosa, intravenosa sistemica	Tipo 2	Reclutante	-
NCT01413035	Department of Hematology of the 2nd Hospital of Shandong University Jinan, Shandong, China	Riparazione tessutale	Allogeneiche da cordone ombelicale e da placenta	Infusione sistemica	Tipo 2	Sconosciuto	-

**Tabella 4. Studi su utilizzo di cellule di derivazione dal cordone ombelicale per la terapia del diabete**

ClinicalTrial.gov	Sede	meccanismo	cellule	Sito infusione	Diabete	stato	Ref
NCT00305344	University of Florida, Gainesville, Florida, United States	immunomodulazione	Sangue cordone ombelicale autologo	Infusione sistemica	Tipo 1 esordio	Completato	(113, 114)
NCT00873925	University of Florida, Gainesville, Florida, United States	immunomodulazione	Sangue cordone ombelicale autologo + vitamin D3 e Omega 3FA	Infusione sistemica	Tipo 1 esordio	Completato	(110)
NCT00989547	Technische Universität München	immunomodulazione	Sangue cordone ombelicale autologo	Infusione sistemica	Tipo 1 esordio	Sconosciuto	(115)
NCT01996228	The Second Xiangya Hospital, Changsha, Hunan, China,	immunomodulazione	Cellule staminali del cordone ombelicale allogeniche (Stem Cell Educator therapy)	Contatto vivo ex con linfociti autologhi	Tipo 1	Reclutante	(119)
NCT01350219	The Second Xiangya Hospital, Changsha, Hunan, China,	immunomodulazione	Cellule staminali del cordone ombelicale allogeniche (Stem Cell Educator therapy)	Contatto vivo ex con linfociti autologhi	Tipo 1	Reclutante	(119)
NCT01415726	General Hospital of Jinan Military Command, Jinan, Shandong, China	immunomodulazione	Cellule staminali del cordone ombelicale allogeniche (Stem Cell Educator therapy)	Contatto vivo ex con linfociti autologhi	Tipo 2	Completato	(120)
NCT01219465	Qingdao University, Qingdao, Cina	immunomodulazione	Cellule staminali mesenchimali allogeniche da cordone ombelicale	Infusione sistemica	Tipo 1 esordio	Sconosciuto	
NCT01954147	Diabetes Care Center of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian, China	Riparazione tessutale	Cellule staminali mesenchimali allogeniche da cordone ombelicale+ liraglutide	Infusione sistemica	Tipo 2	Attivo ma non reclutante	
NCT01143168	Armed Police General Hospital, P. R. Beijing, China	Riparazione tessutale	Cellule staminali mesenchimali allogeniche da cordone ombelicale	Intrapancreatica intraarteriosa,	Tipo 1	Sconosciuto	
NCT02302599	Chinese PLA General	Riparazione tessutale	Cellule staminali	Infusione sistemica	Tipo 2	Reclutante	

	Hospital, Beijing, Beijing, China		mesenchimali allogeniche da cordone ombelicale				
--	---	--	---	--	--	--	--

## **Appendice 1. Riferimenti di società scientifiche per informazione sulla donazione del midollo osseo e del sangue cordonale**

### *Riferimenti Internazionali*

- European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT; <https://www.ebmt.org/Contents/Pages/Default.aspx>)
- International Society for Cell Therapy (ISCT; <http://www.celltherapysociety.org/>)
- International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR; <http://www.cibmtr.org/pages/index.aspx>)
- Joint Accreditation Committee of ISHAGE and EBMT (JACIE; <http://www.jacie.org/>)
- Bone Marrow Donor Worldwide (BMDW; <http://www.bmdw.org/>)
- World Marrow Donor Association (WMDA; <https://www.wmda.info/>)
- International Society of Blood Transfusion (ISBT; <http://www.isbtweb.org/>)
- International NetCord Foundation (NETCORD; <http://www.netcord.org/> )

### *Gruppi clinico-scientifici ed organizzazioni nazionali:*

- Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO; <http://www.gitmo.it/> ),
- Italian Bone Marrow Donor Registry (IBMDR; <http://ibmdr.galliera.it/presentazione>)
- Associazione Donatori Midollo Osseo (ADMO; <http://www.admo.it/>)
- Società Italiana di Ematologia (SIE; <http://www.siematologia.it/>)
- Associazione Italiana di Oncoematologia Pediatrica (AIEOP; <http://www.aieop.org/web/index.php>)
- Società Italiana di Medicina Trasfusionale e di Immunoematologia (SIMTI; <http://www.simti.it/>)
- Società Italiana di Emaferesi (SIDE; <http://www.emaferesi.it/>)



## REFERENZE

1. 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 Biotechnol* 2006;24:1392-401.
2. 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 Biotechnol* 2008;26:443-52.
3. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 2005;23:1534-41.
4. Kelly OG, Chan MY, Martinson LA, Kadoya K, Ostertag TM, Ross KG, et al. Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2011;29:750-6.
5. Schulz TC. Concise Review: Manufacturing of Pancreatic Endoderm Cells for Clinical Trials in Type 1 Diabetes. *Stem Cells Transl Med* 2015;4:927-31.
6. Schulz TC, Young HY, Agulnick AD, Babin MJ, Baetge EE, Bang AG, et al. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One* 2012;7:e37004.
7. Rezania A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2014.
8. Bruin JE, Saber N, Braun N, Fox JK, Mojibian M, Asadi A, et al. Treating diet-induced diabetes and obesity with human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitor cells and antidiabetic drugs. *Stem Cell Reports* 2015;4:605-20.
9. Bruin JE, Rezania A, Xu J, Narayan K, Fox JK, O'Neil JJ, et al. Maturation and function of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors in macroencapsulation devices following transplant into mice. *Diabetologia* 2013;56:1987-98.
10. Rezania A, Bruin JE, Riedel MJ, Mojibian M, Asadi A, Xu J, et al. Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes* 2012;61:2016-29.
11. Hrvatin S, O'Donnell CW, Deng F, Millman JR, Pagliuca FW, Dilorio P, et al. Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:3038-43.
12. Bruin JE, Erener S, Vela J, Hu X, Johnson JD, Kurata HT, et al. Characterization of polyhormonal insulin-producing cells derived in vitro from human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 2014;12:194-208.
13. Pagliuca FW, Millman JR, Gurtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, et al. Generation of Functional Human Pancreatic beta Cells In Vitro. *Cell* 2014;159:428-39.
14. Banerjee M, Kumar A, Bhonde RR. Reversal of experimental diabetes by multiple bone marrow transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:318-25.
15. Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003;111:843-50.
16. Iskovich S, Goldenberg-Cohen N, Stein J, Yaniv I, Fabian I, Askenasy N. Elutriated stem cells derived from the adult bone marrow differentiate into insulin-producing cells in vivo and reverse chemical diabetes. *Stem Cells Dev* 2012;21:86-96.
17. Taneera J, Rosengren A, Renstrom E, Nygren JM, Serup P, Rorsman P, et al. Failure of transplanted bone marrow cells to adopt a pancreatic beta-cell fate. *Diabetes* 2006;55:290-6.
18. Choi JB, Uchino H, Azuma K, Iwashita N, Tanaka Y, Mochizuki H, et al. Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2003;46:1366-74.
19. Lechner A, Yang YG, Blacken RA, Wang L, Nolan AL, Habener JF. No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes* 2004;53:616-23.
20. Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003;21:763-70.

21. Bell GI, Broughton HC, Levac KD, Allan DA, Xenocostas A, Hess DA. Transplanted human bone marrow progenitor subtypes stimulate endogenous islet regeneration and revascularization. *Stem Cells Dev* 2012;21:97-109.
22. Bhansali A, Asokumar P, Walia R, Bhansali S, Gupta V, Jain A, et al. Efficacy and safety of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized placebo-controlled study. *Cell Transplant* 2014;23:1075-85.
23. Bhansali A, Upreti V, Khandelwal N, Marwaha N, Gupta V, Sachdeva N, et al. Efficacy of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Stem Cells Dev* 2009;18:1407-16.
24. Estrada EJ, Valacchi F, Nicora E, Brieva S, Esteve C, Echevarria L, et al. Combined treatment of intrapancreatic autologous bone marrow stem cells and hyperbaric oxygen in type 2 diabetes mellitus. *Cell Transplant* 2008;17:1295-304.
25. Wang L, Zhao S, Mao H, Zhou L, Wang ZJ, Wang HX. Autologous bone marrow stem cell transplantation for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Chin Med J (Engl)* 2011;124:3622-8.
26. Hu J, Li C, Wang L, Zhang X, Zhang M, Gao H, et al. Long term effects of the implantation of autologous bone marrow mononuclear cells for type 2 diabetes mellitus. *Endocr J* 2012;59:1031-9.
27. Esmatjes E, Montana X, Real MI, Blanco J, Conget I, Casamitjana R, et al. Regeneration of insulin production by autologous bone marrow blood autotransplantation in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2010;53:786-9.
28. Daikeler T, Tichelli A, Passweg J. Complications of autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with autoimmune diseases. *Pediatr Res* 2012;71:439-44.
29. Annaloro C, Onida F, Lambertenghi Delilieri G. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in autoimmune diseases. *Expert Rev Hematol* 2009;2:699-715.
30. 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.
31. Sykes M, Nikolic B. Treatment of severe autoimmune disease by stem-cell transplantation. *Nature* 2005;435:620-7.
32. Zand MS, Vo T, Pellegrin T, Felgar R, Liesveld JL, Ifthikharuddin JJ, et al. Apoptosis and complement-mediated lysis of myeloma cells by polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Blood* 2006;107:2895-903.
33. Brodsky RA, Petri M, Smith BD, Seifter EJ, Spivak JL, Styler M, et al. Immunoablative high-dose cyclophosphamide without stem-cell rescue for refractory, severe autoimmune disease. *Ann Intern Med* 1998;129:1031-5.
34. Roord ST, de Jager W, Boon L, Wulffraat N, Martens A, Prakken B, et al. Autologous bone marrow transplantation in autoimmune arthritis restores immune homeostasis through CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* 2008;111:5233-41.
35. Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S, et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood* 2009;113:214-23.
36. Muraro PA, Douek DC, Packer A, Chung K, Guenaga FJ, Cassiani-Ingoni R, et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med* 2005;201:805-16.
37. Kaminitz A, Mizrahi K, Yaniv I, Farkas DL, Stein J, Askenasy N. Low levels of allogeneic but not syngeneic hematopoietic chimerism reverse autoimmune insulinitis in prediabetic NOD mice. *J Autoimmun* 2009;33:83-91.
38. Davies JK. Costimulatory blockade with monoclonal antibodies to induce alloanergy in donor lymphocytes. *Int J Hematol* 2011;93:594-601.

39. Ikehara S, Ohtsuki H, Good RA, Asamoto H, Nakamura T, Sekita K, et al. Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by allogeneic bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7743-7.
40. Kang EM, Zickler PP, Burns S, Langemeijer SM, Brenner S, Phang OA, et al. Hematopoietic stem cell transplantation prevents diabetes in NOD mice but does not contribute to significant islet cell regeneration once disease is established. *Exp Hematol* 2005;33:699-705.
41. Beilhack GF, Landa RR, Masek MA, Shizuru JA. Prevention of type 1 diabetes with major histocompatibility complex-compatible and nonmarrow ablative hematopoietic stem cell transplants. *Diabetes* 2005;54:1770-9.
42. Serreze DV, Osborne MA, Chen YG, Chapman HD, Pearson T, Brehm MA, et al. Partial versus full allogeneic hemopoietic chimerization is a preferential means to inhibit type 1 diabetes as the latter induces generalized immunosuppression. *J Immunol* 2006;177:6675-84.
43. 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.
44. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2007;297:1568-76.
45. Snarski E, Torosian T, Paluszewska M, Urbanowska E, Milczarczyk A, Jedyndasty K, et al. Alleviation of exogenous insulin requirement in type 1 diabetes mellitus after immunoablation and transplantation of autologous hematopoietic stem cells. *Pol Arch Med Wewn* 2009;119:422-6.
46. 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.
47. Li L, Shen S, Ouyang J, Hu Y, Hu L, Cui W, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation modulates immunocompetent cells and improves beta-cell function in Chinese patients with new onset of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:1729-36.
48. Shen S, Li L, Ouyang J, Xu J, Zhu D. Remission induced by autologous hematopoietic stem cell transplantation in one newly diagnosed type 1 diabetes patient with diabetic ketoacidosis: a case report. *J Diabetes* 2012;4:359-61.
49. Gu W, Hu J, Wang W, Li L, Tang W, Sun S, et al. Diabetic ketoacidosis at diagnosis influences complete remission after treatment with hematopoietic stem cell transplantation in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2012;35:1413-9.
50. Zhang X, Ye L, Hu J, Tang W, Liu R, Yang M, et al. Acute response of peripheral blood cell to autologous hematopoietic stem cell transplantation in type 1 diabetic patient. *PLoS One* 2012;7:e31887.
51. Gu Y, Gong C, Peng X, Wei L, Su C, Qin M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation and conventional insulin therapy in the treatment of children with newly diagnosed type 1 diabetes: long term follow-up. *Chin Med J (Engl)* 2014;127:2618-22.
52. D'Addio F, Valderrama Vasquez A, Ben Nasr M, Franek E, Zhu D, Li L, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in new-onset type 1 diabetes: a multicenter analysis. *Diabetes* 2014;63:3041-6.
53. Snowden JA, Pearce RM, Lee J, Kirkland K, Gilleece M, Veys P, et al. Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in severe autoimmune diseases: analysis of UK outcomes from the British Society of Blood and Marrow Transplantation (BSBMT) data registry 1997-2009. *Br J Haematol* 2012;157:742-6.
54. Atkins HL, Muraro PA, van Laar JM, Pavletic SZ. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune disease--is it now ready for prime time? *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:S177-83.
55. Bianco P. "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30:677-704.

56. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007;25:2896-902.
57. Prockop DJ, Kota DJ, Bazhanov N, Reger RL. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). *J Cell Mol Med* 2010;14:2190-9.
58. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* 2014;15:1009-16.
59. Simonson OE, Mouggiakakos D, Heldring N, Bassi G, Johansson HJ, Dalen M, et al. In Vivo Effects of Mesenchymal Stromal Cells in Two Patients With Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *Stem Cells Transl Med* 2015;4:1199-213.
60. Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia* 2011;25:1408-14.
61. Auletta JJ, Lazarus HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:835-57.
62. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemezova K, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014;6:552-70.
63. Glenn JD, Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells* 2014;6:526-39.
64. Sordi V, Piemonti L. Mesenchymal stem cells as feeder cells for pancreatic islet transplants. *Rev Diabet Stud* 2010;7:132-43.
65. Galipeau J, Krampera M. The challenge of defining mesenchymal stromal cell potency assays and their potential use as release criteria. *Cytotherapy* 2015;17:125-7.
66. Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 2013;15:1054-61.
67. Bhandari DR, Seo KW, Sun B, Seo MS, Kim HS, Seo YJ, et al. The simplest method for in vitro beta-cell production from human adult stem cells. *Differentiation* 2011;82:144-52.
68. Dave SD, Vanikar AV, Trivedi HL. In-vitro generation of human adipose tissue derived insulin secreting cells: up-regulation of Pax-6, Ipf-1 and Isl-1. *Cytotechnology* 2014;66:299-307.
69. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:1135-40.
70. Czubak P, Bojarska-Junak A, Tabarkiewicz J, Putowski L. A modified method of insulin producing cells' generation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Diabetes Res* 2014;2014:628591.
71. Tang DQ, Wang Q, Burkhardt BR, Litherland SA, Atkinson MA, Yang LJ. In vitro generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. *Am J Stem Cells* 2012;1:114-27.
72. Van Pham P, Thi-My Nguyen P, Thai-Quynh Nguyen A, Minh Pham V, Nguyen-Tu Bui A, Thi-Tung Dang L, et al. Improved differentiation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells by PDX-1 mRNA transfection. *Differentiation* 2014;87:200-8.
73. Qu H, Liu X, Ni Y, Jiang Y, Feng X, Xiao J, et al. Laminin 411 acts as a potent inducer of umbilical cord mesenchymal stem cell differentiation into insulin-producing cells. *J Transl Med* 2014;12:135.
74. Anzalone R, Lo Iacono M, Loria T, Di Stefano A, Giannuzzi P, Farina F, et al. Wharton's jelly mesenchymal stem cells as candidates for beta cells regeneration: extending the differentiative and immunomodulatory benefits of adult mesenchymal stem cells for the treatment of type 1 diabetes. *Stem Cell Rev* 2011;7:342-63.

75. Wu LF, Wang NN, Liu YS, Wei X. Differentiation of Wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2009;15:2865-73.
76. Yuan H, Li J, Xin N, Zhao Z, Qin G. Expression of Pdx1 mediates differentiation from mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. *Mol Biol Rep* 2010;37:4023-31.
77. Guo QS, Zhu MY, Wang L, Fan XJ, Lu YH, Wang ZW, et al. Combined transfection of the three transcriptional factors, PDX-1, NeuroD1, and MafA, causes differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:672013.
78. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17438-43.
79. Ezquer FE, Ezquer ME, Parrau DB, Carpio D, Yanez AJ, Conget PA. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:631-40.
80. Urban VS, Kiss J, Kovacs J, Gocza E, Vas V, Monostori E, et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 2008;26:244-53.
81. Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia* 2009;52:1391-9.
82. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion* 2014;54:1418-37.
83. Carlsson PO, Schwarcz E, Korsgren O, Le Blanc K. Preserved beta-cell function in type 1 diabetes by mesenchymal stromal cells. *Diabetes* 2015;64:587-92.
84. Hao H, Liu J, Shen J, Zhao Y, Liu H, Hou Q, et al. Multiple intravenous infusions of bone marrow mesenchymal stem cells reverse hyperglycemia in experimental type 2 diabetes rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;436:418-23.
85. Si Y, Zhao Y, Hao H, Liu J, Guo Y, Mu Y, et al. Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats: identification of a novel role in improving insulin sensitivity. *Diabetes* 2012;61:1616-25.
86. Pan XH, Song QQ, Dai JJ, Yao X, Wang JX, Pang RQ, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of type 2 diabetes in a macaque model. *Cells Tissues Organs* 2013;198:414-27.
87. Skyler JS, Fonseca VA, Segal KR, Rosenstock J. Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells in Type 2 Diabetes: A Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Safety and Tolerability Pilot Study. *Diabetes Care* 2015;38:1742-9.
88. Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, Schmidt BT, Askew Y, Nance JJ, et al. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol* 2009;2009:789526.
89. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-8.
90. Liao Y, Geyer MB, Yang AJ, Cairo MS. Cord blood transplantation and stem cell regenerative potential. *Exp Hematol* 2011;39:393-412.
91. Mugishima H, Harada K, Chin M, Suzuki T, Takagi K, Hayakawa S, et al. Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:395-6.
92. Laroche V, McKenna DH, Moroff G, Schierman T, Kadidlo D, McCullough J. Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples. *Transfusion* 2005;45:1909-16.
93. N MR, Diaz A, Castro A, Villaescusa RG. Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:1263-70.

94. Francese R, Fiorina P. Immunological and regenerative properties of cord blood stem cells. *Clin Immunol* 2010;136:309-22.
95. van de Ven C, Collins D, Bradley MB, Morris E, Cairo MS. The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration. *Exp Hematol* 2007;35:1753-65.
96. Cairo MS, Wagner JE. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood* 1997;90:4665-78.
97. Zuba-Surma EK, Klich I, Greco N, Laughlin MJ, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Optimization of isolation and further characterization of umbilical-cord-blood-derived very small embryonic/epiblast-like stem cells (VSELs). *Eur J Haematol* 2010;84:34-46.
98. Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E, et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia* 2007;21:297-303.
99. Lin SJ, Yan DC, Lee YC, Hsiao HS, Lee PT, Liang YW, et al. Umbilical cord blood immunology: relevance to stem cell transplantation. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012;42:45-57.
100. Bradley MB, Cairo MS. Cord blood immunology and stem cell transplantation. *Hum Immunol* 2005;66:431-46.
101. Ljungman P, Bregni M, Brune M, Cornelissen J, de Witte T, Dini G, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:219-34.
102. Tong Q, Duan L, Xu Z, Wang H, Wang X, Li Z, et al. Improved insulin secretion following intrapancreatic UCB transplantation in patients with T2DM. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1501-4.
103. Dejaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2006;117:289-300.
104. Sun L, Wang D, Liang J, Zhang H, Feng X, Wang H, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010;62:2467-75.
105. Carrion F, Nova E, Ruiz C, Diaz F, Inostroza C, Rojo D, et al. Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2010;19:317-22.
106. Denner L, Bodenbunrg 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.
107. 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.
108. 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.
109. Parekh VS, Joglekar MV, Hardikar AA. Differentiation of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells to endocrine pancreatic lineage. *Differentiation* 2009;78:232-40.
110. Haller MJ, Wasserfall CH, Hulme MA, Cintron M, Brusko TM, McGrail KM, et al. Autologous umbilical cord blood infusion followed by oral docosahexaenoic acid and vitamin D supplementation for C-peptide preservation in children with Type 1 diabetes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:1126-9.
111. Haller MJ, Viener HL, Wasserfall C, Brusko T, Atkinson MA, Schatz DA. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp Hematol* 2008;36:710-5.
112. Han P, Hodge G, Story C, Xu X. Phenotypic analysis of functional T-lymphocyte subtypes and natural killer cells in human cord blood: relevance to umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol* 1995;89:733-40.

113. 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.
114. Haller MJ, Wasserfall CH, Hulme MA, Cintron M, Brusko TM, McGrail KM, et al. Autologous umbilical cord blood transfusion in young children with type 1 diabetes fails to preserve C-peptide. *Diabetes Care* 2011;34:2567-9.
115. Giannopoulou EZ, Puff R, Beyerlein A, von Luettichau I, Boerschmann H, Schatz D, et al. Effect of a single autologous cord blood infusion on beta-cell and immune function in children with new onset type 1 diabetes: a non-randomized, controlled trial. *Pediatr Diabetes* 2014;15:100-9.
116. Zhao Y, Huang Z, Qi M, Lazzarini P, Mazzone T. Immune regulation of T lymphocyte by a newly characterized human umbilical cord blood stem cell. *Immunol Lett* 2007;108:78-87.
117. 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.
118. Zhao Y. Stem cell educator therapy and induction of immune balance. *Curr Diab Rep* 2012;12:517-23.
119. Zhao Y, Jiang Z, Zhao T, Ye M, Hu C, Yin Z, et al. Reversal of type 1 diabetes via islet beta cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells. *BMC Med* 2012;10:3.
120. Zhao Y, Jiang Z, Zhao T, Ye M, Hu C, Zhou H, et al. Targeting insulin resistance in type 2 diabetes via immune modulation of cord blood-derived multipotent stem cells (CB-SCs) in stem cell educator therapy: phase I/II clinical trial. *BMC Med* 2013;11:160.