

TERAPIA CELULAR PARA EL TRATAMIENTO DE LA DIABETES: MAS ALLA DE LAS CELULAS MADRE

MARIA LAURA GIMENO, SUNG HO HYON, PABLO F. ARGIBAY

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires

Resumen La diabetes tipo 1 es una enfermedad de etiología autoinmune que se caracteriza por la destrucción de las células β pancreáticas, produciendo un déficit absoluto de insulina. El tratamiento clínico estándar consiste en la aplicación de insulina. Sin embargo, en un número importante de pacientes y debido a la dificultad en lograr un control metabólico preciso, generalmente se asocia con complicaciones graves a nivel vascular con repercusión renal y ocular entre otras. Por otra parte, un estricto control metabólico, a menudo se asocia con hipoglucemias con riesgo de muerte. Esto motivó la investigación y el desarrollo de alternativas de tratamiento. Una de ellas es el trasplante de células productoras de insulina, las células β , obtenidas por medio del aislamiento y trasplante de islotes de un páncreas cadavérico. Los mejores resultados con esta modalidad de trasplante se obtuvieron con la inyección sucesiva de islotes pancreáticos de diferentes donantes y terapia inmunosupresora exenta de corticoides. Sin embargo, la escasez de órganos por un lado, y el hecho de que cada implante de islotes de otro páncreas aumenta las posibilidades de rechazo inmunológico, hace que este tratamiento se vea limitado a centros de alta experiencia y pacientes muy seleccionados. Asimismo, las drogas inmunosupresoras que deben administrarse de por vida, pueden producir efectos no deseados en el organismo. La medicina regenerativa abre la posibilidad de utilizar células madre con capacidad de diferenciarse en células productoras de insulina, utilizando de manera conjunta factores tróficos que serían capaces de estimular a las propias células madre de cada parénquima.

Palabras clave: células madre, células madre mesenquimales, diabetes tipo 1, inmunomodulación

Abstract *Cell therapy for diabetes mellitus: Beyond stem cells.* Type 1 diabetes is an autoimmune disease of unknown etiology characterized by destruction of pancreatic beta cells, leading to absolute insulin deficiency. Standard therapy includes the use of exogenous insulin. However, due to the difficulty to achieve a tight metabolic control, a number of patients will present severe complications, including vascular, renal and ophthalmologic disease. On the other hand, a more strict metabolic control is often associated with episodes of life threatening hypoglycemia. This motivated the research and development of new alternative treatments, such as the transplantation of insulin producing beta cells, obtained from cadaveric pancreatic islets. Best results with this therapy were observed with consecutive islet injection from more than one donor and immunosuppressive therapy without steroids. However, the scarcity of organs as well as an increased immune reaction derived from the use of pancreas from different donors have limited this therapy to markedly selected patients and highly experienced centers. Furthermore, lifelong administration of immunosuppressive drugs may produce undesired secondary effects. Regenerative medicine opens the possibility of using stem cells capable of differentiating into insulin-producing cells after stimulation by diverse trophic factors that may act over stem cells located within a specific tissue.

Key words: Stem cells, mesenchymals stem cells (MSCs), type 1 diabetes, immunomodulation

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica, de diferentes etiologías, cuya característica principal es la hiperglucemia que resulta de un déficit en la secreción y/o acción de la insulina para incorporar la glucosa plasmática hacia el interior de las células¹. La hiperglucemia

crónica puede condicionar, a largo plazo, el desarrollo de nefropatía, retinopatía, neuropatía y complicaciones cardiovasculares, lo que determina una alta morbilidad y mortalidad de los pacientes diabéticos respecto de la población general².

La diabetes tipo 1 (insulinodependiente) es de etiología autoinmune y se caracteriza por la destrucción de las células β pancreáticas, produciendo un déficit absoluto de insulina. El tratamiento clínico estándar consiste en la aplicación de insulina exógena, pero en un número importante de pacientes y debido a la dificultad en lograr un control metabólico preciso, se asocia con complica-

Recibido: 2-XII-2010

Aceptado: 27-IV-2011

Dirección postal: Dr. Pablo F. Argibay, Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires, Potosí 4240, 1199 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4959-0200 Int. 5355

e-mail: pablo.argibay@hospitalitaliano.org.ar

ciones graves del sistema cardiovascular, renal, la retina y los nervios periféricos. Por otra parte, los esquemas de tratamiento con insulina más estrictos, orientados a prevenir esas complicaciones, a menudo se asocian con hipoglucemias con riesgo de vida⁹. Esto motivó el desarrollo de otras alternativas de tratamiento, como el trasplante de células productoras de insulina. Este procedimiento puede realizarse en dos modalidades: como páncreas entero (órgano vascularizado) o como islotes pancreáticos (obtenidos luego de una digestión enzimática del órgano). La modalidad más extendida y que muestra los mejores resultados funcionales es el trasplante de páncreas entero, con supervivencias para el paciente y el páncreas de 94% y 87% a un año, respectivamente. A cinco años, estos valores llegan a 89% y 76%, respectivamente^{4, 5}.

En relación con el trasplante de islotes pancreáticos, el índice de insulino independencia a un año es menor que el 50%, y a cinco años, alrededor del 10% en los centros de mayor experiencia^{6, 7}.

Los mejores resultados con esta modalidad de trasplante se obtuvieron con la inyección sucesiva de islotes pancreáticos de diferentes donantes y terapia inmunosupresora exenta de corticoides (Protocolo de Edmonton)^{8, 9}. Sin embargo, la escasez de órganos por un lado, y el hecho de que cada implante de islotes de otro páncreas aumenta las posibilidades de rechazo inmunológico, hace que este tratamiento se vea limitado a centros de alta experiencia y pacientes muy seleccionados. Asimismo, las drogas inmunosupresoras que deben administrarse de por vía, pueden producir efectos no deseados en el organismo. De manera que, por el momento, el trasplante no ha dado una solución definitiva para el tratamiento de la diabetes.

Una característica distintiva de la diabetes tipo 1 es la destrucción de un grupo específico de células: las células beta pancreáticas. Por lo tanto, podría ser tratada mediante una terapia celular, utilizando células madre con capacidad de diferenciarse en células productoras de insulina. Esta alternativa se plantea como una estrategia sumamente atractiva.

Por otro lado, se ha observado que un tipo de células madre, las células madre mesenquimales, son capaces de modular la respuesta inmune del huésped luego de ser trasplantadas. Este fenómeno podría contribuir a que, una vez trasplantadas, las células madre puedan sobrevivir y funcionar por un tiempo prolongado.

En la presente revisión, enfocaremos los avances de las investigaciones a partir de células madre y diabetes. La medicina regenerativa no sólo plantea la utilización de células madre, sino que también propone la posibilidad de utilizar factores tróficos que serían capaces de estimular a las propias células madre de cada parénquima.

Plasticidad de las células madre

Las células madre son capaces de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas, no sólo morfológicamente, sino también en forma funcional. Se pueden clasificar según su potencial capacidad de diferenciación en: células madre *totipotenciales*, que son capaces de producir tejidos embrionarios y extraembrionarios, generando células de cualquier tejido del cuerpo. Esta capacidad sólo la presentan el cigoto o las células embrionarias primarias. Las células madre *pluripotenciales* tienen la capacidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias. Se considera que las células madre embrionarias, las cuales se obtienen de la masa celular interna del blastocisto (embrión en el día 5, antes de la implantación) poseen esta capacidad y también las células pluripotentes inducidas (iPS). Por último, las células madre *multipotenciales* son capaces de diferenciarse a distintos estirpes celulares procedentes del mismo tejido o de otro, pero no de todos los tejidos del organismo. Algunas tienen la capacidad de reactivar su programa genético como respuesta a determinadas señales de estimulación y dar lugar a ciertos linajes celulares posibles. Aquí entran en juego las células madre somáticas, aunque se han descubierto que algunas poseen pluripotencialidad. Existen diferentes sitios de donde es posible obtener células madre adultas. Las células pluripotenciales inducidas se obtienen a partir de fibroblastos inducidos con ciertos factores definidos, como el factor de transcripción unido al octámero 4 (OCT4), SOX2 combinado con *Kruppel-like factor 4* (KLF4), proteína Myc proto-oncogen, (c-Myc), NANOG, entre otros¹⁰. La utilización de oncogenes plantea el potencial riesgo de que estas células puedan formar tumores¹¹. Otros investigadores utilizaron retrovirus o lentivirus con la inserción sólo de los genes OCT4 y SOX2, pero aquí se observó en algunos casos la integración del genoma viral provocando un incremento en la tumorigénesis¹². Recientemente se utilizaron plásmidos, sin observarse –hasta el momento no se han comunicado– inconvenientes en la construcción genómica¹³. Estas células podrían ser una nueva alternativa para disponer de células pluripotentes, con la ventaja de no presentar restricciones para su obtención y utilización, comparadas con las células embrionarias, cuyo uso amerita un debate ético aún no concluido (Fig. 1).

Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSCs) pertenecen al grupo de células madre multipotenciales con capacidad de diferenciarse en células de origen mesodérmico (osteocitos, condrocitos y adipocitos). Este es, según la Sociedad Internacional de Terapia Celular, uno de los

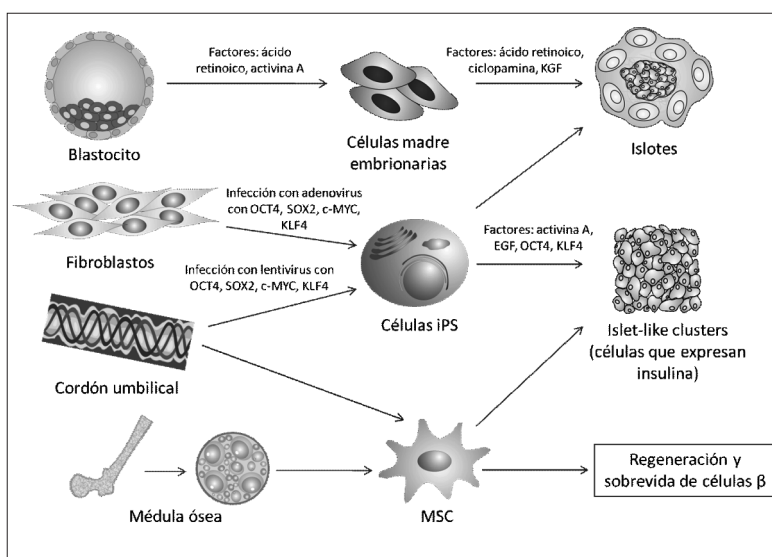


Fig. 1.— Obtención y diferenciación de células madre para terapia en diabetes mellitus. Se ha visto producción de insulina en respuesta a estímulos de glucosa en células embrionarias y células pluripotentes inducidas (iPS) con marcas positivas para insulina. En el caso de las células estromales mesenquimales (MSC), no existe un protocolo definido. Sin embargo, se observó que estas células promueven la supervivencia y regeneración de células β pancreáticas. iPS: células pluripotentes inducidas; MSC: célula estromal mesenquimal; OCT4: factor de transcripción unido al octámero 4; SOX2: factor de transcripción de sexo que determina la región Y caja 2; KLF4: *Kruppel-like factor 4*; c-Myc: proteína Myc proto-oncogen; KGF: factor de crecimiento de queratinocitos; EGF: factor de crecimiento epidérmico.

criterios que definen a las células mesenquimales, junto con la adherencia en cultivo, la expresión de antígenos CD73, CD90 (Thy-1) y CD105, y la ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45 y marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B^{14, 15}.

Se las pueden denominar de diferentes maneras: células de estroma medular, unidades formadoras de colonias fibroblastoides, precursores estromales o células adultas progenitoras multipotentes o MAPCs (*multi-potent adult progenitor cells*)¹⁶.

La médula ósea es la principal fuente para su aislamiento¹⁷. También se han podido obtener de tejido adiposo¹⁸, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular¹⁹, sangre de cordón umbilical^{20, 21}, tejido pulmonar²², pulpa dental y ligamento periodontal²³.

En modelos experimentales se ha observado que son capaces de regenerar tejido deteriorado o lesionado, tales como cartílago²⁴, hueso, tejido hepático o miocárdico²⁵, y también de modular reacciones inmunes en colagenopatías²⁶, esclerosis múltiples y trasplantes de médula ósea²⁷.

Autoinmunidad y células madre

No sólo se pretende utilizar las células madre como alternativa de terapia celular en la enfermedad diabetes tipo 1, obteniendo células capaces de producir insulina frente a estímulos de glucosa, sino también para evitar la respuesta inmune tanto en términos de autoinmuni-

dad como en el rechazo de trasplantes alogénicos. Se encuentran en estudio varias terapias en la modulación inmunológica, como es el caso de anticuerpos contra CD3 (parte del complejo receptor de células T), en las que estudios clínicos previos mostraron que la inmunosupresión continua disminuye temporalmente, la pérdida de producción de insulina. Estos estudios sugieren que el anticuerpo monoclonal CD3 podría mantener controlados los niveles de insulina, evitando hiperglucemias e induciendo tolerancia frente a la enfermedad. También se realizaron estudios con proteínas de choque térmico y globulina policlonal de conejo anti células T. Todos estos estudios dieron como resultado una efectividad en la preservación de la funcionalidad de las células β a corto tiempo, por lo que pocos pacientes pudieron dejar de utilizar insulina subcutánea²⁸.

Las células mesenquimales, en distintos ambientes, producen un gran espectro de factores de crecimiento, induciendo efectos interesantes en ellas. Algunos factores solubles se han definido como mediadores hematopoyéticos²⁹ o neuroprotectores³⁰. Además, en estudios en los que se expuso *in vitro* células MSC a extracto de tejido pancreático de rata, se observó la liberación de factores antiapoptóticos y angiogénicos³¹. Esto no ocurrió en los controles no expuestos al extracto, sugiriendo que las primeras eran sensibles al microambiente regenerativo del páncreas y que eran capaces de responder con un aumento considerable de la producción de citoquinas

angiogénicas y antiapoptóticas, tales como VEGF, IGF-1 y bFGF^{32, 33}.

Por lo tanto, las células madre mesenquimales no sólo poseen capacidad de diferenciarse a distintas estirpes celulares, sino también de suprimir respuestas de células del sistema inmune, como células T, B, dendríticas y células NK (*natural killer*), además de reducir la producción de citoquinas inflamatorias.

De acuerdo con estas observaciones, sería posible que las células madre mesenquimales protejan a los islotes alogénicos trasplantados de dos fenómenos inmunológicos deletéreos: la activación de las células T alorreactivas por un lado, y la recurrencia de daño por autoinmunidad mediante células T persistentes, por el otro.

En un estudio reciente, Ding et al. observaron en un modelo murino de trasplante de islotes alogénicos con implante de MSC en el mismo sitio, fenómenos de protección inmunológica con producción de matriz metaloproteinasas-2 y -9, que impide la activación y expansión de células T alorreactivas. Estos ratones lograron también glucemias normales por tiempo prolongado³⁴.

Las células madre mesenquimales, por lo tanto, no sólo poseen capacidades multipotenciales, sino también inmunomoduladoras^{35, 36}, y de producción de agentes pro-angiogénicos^{37, 38}. Estas capacidades permiten pensar en una nueva era para la medicina regenerativa, donde las células madre se podrían obtener de un paciente, expandirlas *in vitro* y trasplantarlas en el mismo paciente sin correr el riesgo de rechazo inmunológico.

Factores como estimulantes de la diferenciación

Péptido similar al glucagon tipo 1

El péptido similar al glucagon tipo 1 (GLP-1) es una incretina que se une a los receptores GLP-1 en la superficie de las células β . Estos receptores están combinados a una vía de traducción de señal que, cuando está activada, produce un aumento en la biosíntesis y secreción de insulina³⁹. La activación del receptor GLP-1 también da como resultado la expresión de un gen específico y productos proteicos que aumentan la proliferación de células β y reduce la apoptosis de las mismas.

Además de aumentar la producción de insulina, el GLP-1 tiene efectos sobre la secreción de glucagon, disminuyéndolo, y sobre el vaciamiento gástrico, enlenteciéndolo^{40, 41}.

La vida media del GLP-1 es muy corta, ya que existe una proteasa, dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), la cual divide el N-terminal del GLP-1 y el péptido inhibitorio gástrico (GIP) minutos después de su secreción, inactivándolos. Por lo tanto, se han buscado alternativas para obtener incretinas capaces de no ser degradadas por DPP-IV, obteniendo una vida media mayor⁴².

La utilización de este tipo de incretinas sintéticas, se plantea como alternativa para pacientes con diabetes tipo 2, ya que en esta enfermedad existe una disminución o ausencia^{43, 44} de GLP-1. La administración exógena de este péptido ha logrado mejorías del control glucémico y del glucagon, además de una disminución del peso corporal^{45, 46}.

Exenatida

En 1992, Eng et al.⁴⁷ lograron aislar el exendin-4, un péptido de 39 aminoácidos con un 52% de similitud aminoacídica con GLP-1, en la glándula salival del lagarto *Heloderma suspectum* (monstruo de Gila). Se encontró que exendin-4 tenía una gran potencialidad como agonista del receptor de GLP-1 en células β pancreáticas.

A partir de estas observaciones, se sintetizó un péptido de la misma cantidad de aminoácidos, estructuralmente idéntico a exendin-4 natural⁴⁸, y que además posee la propiedad fundamental de ser resistente a la inactivación por la DPP-IV.

Con la utilización del péptido, varios estudios pudieron observar una mejoría de la función de las células β y del control de la glucemia en pacientes con diabetes tipo 2^{49, 50}.

Liraglutida

Es un análogo de GLP-1, con una analogía del 97% en la secuencia lineal aminoacídica con respecto al GLP-1 humano. Posee una vida media entre 10 y 14 horas, la cual es más prolongada que la de GLP-1 y exenatide⁵¹. Esta molécula posee una cadena de ácidos grasos que da resistencia a DPP-IV y permite una unión no covalente a la albúmina.

En un estudio de pacientes con diabetes tipo 2, se observó que una sola dosis de liraglutida resultó en la restauración de la sensibilidad a la glucosa de las células β ⁵². Diferentes estudios posteriores pudieron corroborar que es suficiente la administración de una sola dosis diaria de liraglutida para lograr los mismos resultados^{53, 54}.

A partir de la obtención de estas incretinas sintéticas, distintos grupos de investigadores las han utilizado como factor de estimulación y protección de diferentes tipos celulares, tanto islotes pancreáticos como células madre.

Obtención de células productoras de insulina a partir de células madre

Hasta el momento, varios investigadores han observado la aparición de acúmulos celulares (*clusters*) con el uso de exenatida en cultivos de células madre mesenquimales. Adicionalmente, se ha observado que las células mesenquimales provenientes de médula ósea murina forman estos acúmulos al ser estimuladas por exenatida

y nicotinamida en presencia de altas concentraciones de glucosa (23 mM/l)^{55, 56}. Otros investigadores, utilizando células mesenquimales de sangre de cordón umbilical humano, lograron obtener *clusters* de células productoras de insulina por medio de la estimulación con exenatida y la adición de un gel de matriz extracelular en las placas de cultivo⁵⁷. Es importante destacar que en todos los trabajos anteriores se observó la expresión de los genes PDX-1, INS I, INS II.

PDX-1 está implicado en las primeras fases de formación y desarrollo del páncreas, así como en el control de la expresión del gen de la insulina (INS I e INS II) en células β maduras.

También se realizaron estudios donde se adicionaron, a cultivos de células de médula ósea de ratas, compuestos que incrementan la expresión de factores de transcripción y crecimiento, dando como resultado la formación de acúmulos celulares que respondían a estímulos de glucosa, produciendo insulina. Cuando estos *clusters* fueron trasplantados en ratones y ratas diabéticas se observó que tanto la producción como la secreción de insulina fue restaurada. Se pudo observar que los animales volvieron a ser diabéticos cuando las células diferenciadas fueron retiradas, dando la pauta de que los *clusters* eran los responsables de la mejoría observada⁵⁸. Otro grupo de investigadores⁵⁹, obtuvo los mismos resultados, pero se diferenció en que realizaron el cultivo con extractos de páncreas, el cual fue removido luego de dos días; no se conoce aún cómo funciona el extracto, pero es probable que se hayan liberado factores naturales de diferenciación y estimulación, los cuales podrían ser beneficiosos en la maduración de las células diferenciadas.

Además de las células obtenidas a partir de la médula ósea, también fue posible observar estos resultados con células mesenquimales de cordón umbilical y de tejido adiposo. Estas últimas podrían representar una fuente prometedora de células para la obtención de células productoras de insulina en un trasplante autólogo. En un estudio publicado en 2009, Kang y col.⁶⁰ lograron diferenciar con éxito células mesenquimales aisladas de la grasa de ojo humano, en células secretoras de insulina. Estas células fueron trasplantadas en ratones diabetizados con streptozotocina, obteniendo glucemias normales por más de 60 días.

Hasta el momento, dos grupos de investigadores realizaron trasplantes de células madre en humanos, por medio de infusión intravenosa sin diferenciación previa *in vitro*.

En uno de estos trabajos, se realizó un trasplante autólogo (células obtenidas del mismo paciente) de células provenientes de la médula ósea. Se seleccionaron pacientes con menos de 8 semanas desde el diagnóstico de la diabetes y se les administró, además, una terapia de inmunosupresión a altas dosis previamente a la infusión de las células⁶¹. La inmunosupresión con ciclosporina o

azatioprina en etapas tempranas de la enfermedad, en las que aún existen células β productoras de insulina, puede preservar su función por un tiempo más prolongado.

Otro grupo utilizó células madre provenientes de cordón umbilical seleccionando pacientes que hubiesen preservado la sangre de su cordón. En este estudio, se trasplantaron niños de entre 3 a 7 años con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico⁶². Hasta el momento, ninguno de estos trabajos pudo mostrar que las células madre logren suprimir totalmente el uso de insulina exógena. Sin embargo, se observó en algunos casos una disminución de las dosis diarias de insulina. En el caso de la infusión de células provenientes de sangre de cordón, la caída en la producción de insulina propia fue más lenta que en los niños que no recibieron el trasplante, sugiriendo que las células β de los niños trasplantados tenía una mayor supervivencia.

Discusión

La diabetes afecta en la Argentina al 7% de la población. De ellos, cerca del 10% padece diabetes tipo 1, o insulino dependiente.

Si bien el descubrimiento de la insulina por Banting y Best en 1921 ayudó a salvar millones de vidas, los esquemas clínicos utilizados desde entonces no han sido capaces de lograr un control metabólico perfecto, y por lo tanto no han podido prevenir las complicaciones secundarias de la diabetes, que se asocian fundamentalmente con los episodios repetidos de hiperglucemia.

En nuestro país, la diabetes constituye la cuarta causa más frecuente de muerte, la tercera causa de incapacidad laboral y la primera causa de ceguera. Cuando un paciente con diabetes ingresa en diálisis por nefropatía, se convierte en un paciente sumamente grave, ya que son los diabéticos los que presentan la mayor cantidad de complicaciones y son, además, quienes más frecuentemente mueren en diálisis. El pronóstico de vida a cinco años es de aproximadamente el 50%⁶³.

Como alternativa al uso de la insulina se planteó la posibilidad de restituir las células productoras de insulina por medio del trasplante de páncreas o trasplante de islotes pancreáticos. Como se comentó en la introducción, ambos procedimientos tienen como complicación la utilización de inmunosupresores y el déficit de donantes.

Una alternativa sumamente atractiva sería poder contar con una fuente de células productoras de insulina, en cantidades ilimitadas, que además no requieran la utilización de inmunosupresores en forma crónica para evitar el rechazo. Las células madre podrían responder a estas necesidades si pudieran diferenciarse en células productoras de insulina.

Existen dos cuestiones a considerar en relación con la aplicación de las células madre. Por un lado, una vez

que las células diferenciadas, capaces de producir insulina, hayan sido trasplantadas en el organismo, sería importante saber por cuánto tiempo podrán mantener las propiedades de almacenamiento y liberación controlada de insulina, además de poder monitorearse su "comportamiento", ya que se tratará de células modificadas por el ambiente; es decir, manipuladas *in vitro*, con la potencialidad de tumorigénesis.

Por otra parte, persiste la incógnita de cuál será la reacción del sistema inmune del huésped frente a estas nuevas células que, más allá de tratarse de un trasplante autólogo, se enfrentarán con un sistema inmune que, en el origen de la enfermedad, fue capaz de reconocer como extraño y destruir las células β del páncreas propio.

Concluimos que la obtención de células capaces de producir insulina de manera controlada y con propiedades inmunoprotectoras, o sin riesgo de ser rechazadas por el organismo receptor, sigue siendo un gran desafío. De las diversas fuentes de células madre, es posible afirmar que las células madre mesenquimales son las más efectivas, ya sea por sus propiedades de diferenciación como por su fácil obtención de manera abundante. Los sitios de obtención como la médula ósea, la sangre de cordón umbilical o el tejido adiposo, evitarían los obstáculos éticos que sí se plantean con las células madre embrionarias.

Distintas líneas de investigación con células madre podrán, en un futuro que esperamos sea próximo, hallar una terapia eficaz para la diabetes, una enfermedad de alta morbimortalidad y de progresivo aumento en todo el mundo.

Conflictos de interés: los autores declaran no presentar conflictos de interés.

Bibliografía

- Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994; 331: 1428-36.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
- Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 328: 1676-85.
- Gruessner AC, Sutherland DER. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clin Transplant* 2005; 19: 433-55.
- Sollinger HW, Odorico JS, Becker YT, D'Alessandro AM, Pirsch JD. One thousand simultaneous pancreas-kidney transplants at a single center with 22-year follow-up. *Ann Surg* 2009; 250: 618-30.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 2060-9.
- Robertson RP. Islet transplantation a decade later and strategies for filling a half-full glass. *Diabetes* 2010; 59: 1285-91.
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-8.
- Kaufman DB, Lowe WL Jr. Clinical islet transplantation. *Curr Diab Rep* 2003; 4: 344-50.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
- Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008; 322: 945-9.
- Huangfu D, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1269-75.
- Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; 322: 949-53.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-7.
- Bianchi De Di Risió CC, Callero F, Hidalgo A, Argibay P. Mesenchymal stem cells. Differentiation and alternative source of neural tissue. *Medicina (Buenos Aires)* 2004; 64: 543-9.
- Beyer N, Da Silva L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 174: 249-82.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294-301.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005; 33: 1402-16.
- Wexler S, Donaldson C, Denning P, Rice C, Bradley B, Hows J. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal «stem» cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121: 368-74.
- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cel Mol Med* 2004; 8: 301-16.
- Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22: 625-34.
- Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, Jodon V, Rossi GA, Brouty-Boye D. Human bronchial fibroblast exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest* 2005; 85: 962-71.
- Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005; 8: 191-99.
- Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal Stem Cells for bone, cartilage, tendon and skeletal repair. *Bone* 2006; 39: 678-83.
- Kassem M, Kristiansen M, Abdallah B. Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential use in Therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95: 209-14.
- Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnoli S, Anunziato. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 435-41.

27. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2006; 312: 2169-79.
28. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005; 23: 352: 2598-608.
29. Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, et al. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9: 841.
30. Chen X, Katakowski M, Li Y, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J Neurosci Res* 2002; 69: 687.
31. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005; 112: 1128.
32. Sadat S, Gehmert S, Song YH, et al. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 674.
33. Xu X, Chen L, Hou WK, et al. Mesenchymal stem cells treated with rat pancreatic extract secrete cytokines that improve the glycometabolism of diabetic rats. *Transplantation Proceedings* 2009; 41: 1878-84.
34. Ding Y, Xu D, Feng G, et al. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogenic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes* 2009; 58: 1797.
35. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, et al. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 1759-67.
36. Le Blac K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 2007; 262: 509-25.
37. Ozaki K, Sato K, Oh I, et al. Mechanisms of immunomodulation by mesenchymal stem cells. *Int J Hematol* 2007; 86: 5-7.
38. Wu Y, Chen L, Scott PG, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007; 25: 2648-59.
39. American College of Endocrinology consensus statement on guidelines for glycemic control. *Endocr Pract* 2002; 8: 5-11.
40. The American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology. Medical guidelines for the management of diabetes mellitus: the AACE system of intensive diabetes self management-2002 update. *Endocr Pract* 2008; 8: 40-82.
41. Saydah SH, Fradkin J, Cowie CC. Poor control of risk factors for vascular disease among adults with previously diagnosed diabetes. *JAMA* 2004; 291: 335-42.
42. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide 1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* 1993; 214: 829-35.
43. Creutzfeldt W. Entero-insular axis and diabetes mellitus. *Horm Metab Res Suppl* 1992; 26: 13-8.
44. Nauk MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993; 91:301-7.
45. Saydah SH, Fradkin J, Cowie CC. Poor control of risk factors for vascular disease among adults with previously diagnosed diabetes. *JAMA* 2004; 291: 335-42.
46. UKPDS. Overview of 6 year's therapy of type II diabetes a progressive disease. *Diabetes* 1995; 44: 1249-58.
47. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Bio Chem* 1992; 267: 7402-5.
48. Doyle ME, McConville P, Theodorakis MJ, et al. In vivo biological activity of exendin (1-30). *Endocrine* 2005; 27: 1-9.
49. Kolterman OG, Buse JB, Fineman MS, et al. Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88.
50. Fehse F, Trautmann M, Holst JJ, et al. Exenatide augments first and second phase insulin secretion in response to intravenous glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5991-7.
51. Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, et al. Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J Med Chem* 2000; 43: 1664-9.
52. Chang AM, Jakobsen G, Sturis J, et al. The GLP-1 derivative NN2211 restores beta-cell sensitivity to glucose in type 2 diabetic patients after a single dose. *Diabetes* 2003; 52: 1786-91.
53. Feinglos MN, Saad MF, Pi-Sunyer FX, An B, Santiago O. Effects of liraglutide (NN2211), a long-acting GLP-1 analogue, on glycaemic control and bodyweight in subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2005; 22: 1016-23.
54. Madsbad S, Schmitz O, Ranstam J, Jakobsen G, Matthews DR. Improved glycemic control with no weight increase in patients with type 2 diabetes after once-daily treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 analog liraglutide (NN2211): a 12-week, double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Care* 2004; 27: 1335-42.
55. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* 2004; 53: 1721-32.
56. Yang L, Li S, Hatch H, et al. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8078-83.
57. Gao F, Wu DQ, Hu YH, 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.
58. Oh SH, et al. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab. Invest* 2004; 84: 607-17.
59. Gabr MM, Sobh MM, Zakaria MM, Refaie AF, Ghoneim MA. Transplantation of insulin-producing clusters derived from adult bone marrow stem cells to treat diabetes in rats. *Exp. Clin. Transplant* 2008; 6: 236-43.
60. Kang HM, Kim J, Parks S, et al. Insulin-secreting cells from human eyelid-derived stem cells alleviate type I diabetes in immunocompetent mice. *Stem Cells* 2009; 27: 1999-2008.
61. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1150: 220-9.
62. Wasserfall CH, McGrail KM, et al. Autologous umbilical cord blood transfusion in very young children with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 2041-6.
63. La Rocca E, Fiorina P, di Carlo V, et al. Cardiovascular outcomes after kidney-pancreas and kidney-alone transplantation. *Kidney Int* 2001; 60: 1964-71.