

Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas*

Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives

Samira Yarak¹

Oswaldo Keith Okamoto²

Resumo: As células-tronco adultas ou somáticas detêm grande promessa para a reparação e regeneração de tecidos. Atualmente, o interesse dos cientistas é contínuo na investigação da biologia de células-tronco mesenquimais, tanto em aspectos básicos, quanto no potencial de aplicações terapêuticas. As células-tronco adultas derivadas do estroma do tecido adiposo, em comparação com as células-tronco derivadas do estroma da medula óssea, apresentam como vantagem o método fácil de obtenção da fonte tecidual. As células-tronco adultas derivadas do estroma do tecido adiposo apresentam potencial para se diferenciarem em células de tecidos mesodérmicos, como os adipócitos, as cartilagens, os ossos e o músculo esquelético e não mesodérmicos, como os hepatócitos, as células pancreáticas endócrinas, os neurônios, os hepatócitos e as células endoteliais vasculares. Entretanto, os dados disponíveis na literatura científica sobre as características das células-tronco adultas derivadas do estroma do tecido adiposo e os procedimentos para sua obtenção e manipulação no laboratório são inconsistentes. É necessário o desenvolvimento de metodologias e procedimentos eficazes de isolamento dessas células para obtenção de células em quantidade e qualidade suficientes para aplicação terapêutica. Nesta revisão, são discutidos os métodos correntes de coleta de tecido adiposo, isolamento e caracterização de células-tronco adultas derivadas do estroma do tecido adiposo, com ênfase na futura aplicação em medicina regenerativa e nos possíveis desafios nesse recente campo da ciência.

Palavras-chave: Adipócitos; Células-tronco adultas; Tecido adiposo; Terapia tissular

Abstract: Adult or somatic stem cells hold great promise for tissue regeneration. Currently, one major scientific interest is focused on the basic biology and clinical application of mesenchymal stem cells. Adipose tissue-derived stem cells share similar characteristics with bone marrow mesenchymal stem cells, but have some advantages including harvesting through a less invasive surgical procedure. Moreover, adipose tissue-derived stem cells have the potential to differentiate into cells of mesodermal origin, such as adipocytes, cartilage, bone, and skeletal muscle, as well as cells of non-mesodermal lineage, such as hepatocytes, pancreatic endocrine cells, neurons, cardiomyocytes, and vascular endothelial cells. There are, however, inconsistencies in the scientific literature regarding methods for harvesting adipose tissue and for isolating, characterizing and handling adipose tissue-derived stem cells. Future clinical applications of adipose tissue-derived stem cells rely on more defined and widespread methods for obtaining cells of clinical grade quality. In this review, current methods in adipose tissue-derived stem cell research are discussed with emphasis on strategies designed for future applications in regenerative medicine and possible challenges along the way.

Key words: Adipocytes; Adipose tissue; Adult stem cells; Tissue therapy

Aprovado pelo Conselho Editorial e aceito para publicação em 09.04.2010.

* Trabalho realizado na Universidade Federal de São Paulo e Universidade Federal do Vale do São Francisco - Petrolina (PE), Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum / *Conflict of interest: None*
Suporte financeiro: Nenhum / *Financial funding: None*

¹ Mestrado - Docente e chefe da disciplina de Dermatologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco; doutoranda da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (Unifesp-EPM). Departamento de Patologia - São Paulo (SP), Brasil.

² Pós-Doutorado - Docente da disciplina de Neurologia Experimental do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) - São Paulo (SP), Brasil.

©2010 by Anais Brasileiros de Dermatologia

INTRODUÇÃO

Por definição, as células-tronco se caracterizam por serem indiferenciadas ou não especializadas e por terem a capacidade de gerar não apenas novas células-tronco, mas também, sob certas condições fisiológicas e experimentais, células especializadas com diferentes funções.^{1,2} Nesse processo de autorrenovação e diferenciação, a célula-tronco pode seguir dois modelos básicos de divisão: a) o determinístico, que corresponde à divisão celular de uma célula-tronco que gera uma nova célula-tronco e uma célula que irá se diferenciar (progenitora) e b) o aleatório ou estocástico, no qual algumas células-tronco geram apenas novas células-tronco e outras geram células diferenciadas.²

Quanto ao potencial de diferenciação, as células-tronco se classificam em cinco categorias básicas: a) totipotentes, capazes de se diferenciarem em todos os tecidos que formam o corpo humano, incluindo a placenta e membranas embrionárias (derivadas do zigoto); b) pluripotentes, presentes na massa celular interna do blastocisto e capazes de se diferenciarem em células dos três folhetos germinativos humanos (ectoderma, mesoderma e endoderma); c) multipotentes, que se diferenciam em vários tipos de células de um mesmo folheto embrionário; d) oligopotentes, que se diferenciam em poucas células de um mesmo folheto embrionário e e) unipotentes, que se diferenciam em um único tipo de célula de um mesmo folheto embrionário.^{2,3}

A diferença básica quanto à natureza das células-tronco está na existência de **células-tronco embrionárias** (totipotentes ou pluripotentes)¹ e células precursoras do organismo já desenvolvido, chamadas **células-tronco adultas ou somáticas**.^{1,3} Recentemente, com objetivo de melhorar a plasticidade^{III 4} das células-tronco adultas, pesquisadores conseguiram ampliar o potencial de diferenciação dessas células, por meio de: a) transferência nuclear somática⁵ e b) reprogramação genética de células somáticas ao estado embrionário, mediante a introdução de genes determinantes de pluripotência (OCT-4, SOX-2, KLF-4, cMYC). Essas células são denominadas células-tronco pluripotentes induzidas ou *IPs cells*.⁶

As células-tronco pluripotentes são as únicas capazes de se diferenciarem *in vitro*, de modo inerente e espontâneo, em células das três linhagens germinativas. Elas se caracterizam por apresentarem alta capacidade de proliferação, morfologia típica, expressão de marcadores específicos (ex. SSEA-3, SSEA-4, OCT-4, SOX-2, NANOG, KLF4) e capacidade de formação de teratomas.^{2,3,7,8}

As células-tronco adultas (ASC) têm sido isoladas e caracterizadas em diferentes tecidos do corpo, como medula óssea, cordão umbilical, encéfalo, epitélio, polpa de dente e, mais recentemente, tecido adiposo. Entretanto, as ASC possuem limitação quanto à capacidade de diferenciação nos diferentes tecidos do corpo humano.⁹ Alguns cientistas denominam essas células de pós-natais, por estarem presentes em recém-nascidos, no cordão umbilical e em outros tecidos. As ASCs são responsáveis por manter a homeostase dos tecidos ao repor as células que foram perdidas na maturação, no envelhecimento ou dano⁹ e, por isso, representam grande promessa para uso em protocolos de reparação e regeneração tecidual.

Um tipo de ASC que vem se destacando nos estudos pré-clínicos e clínicos de terapia celular é a célula-tronco mesenquimal^{III} (MSC), a qual pode ser isolada de várias fontes biológicas, como o cordão umbilical, a medula óssea, o tecido adiposo e o fígado fetal.^{9,10} De acordo com a literatura científica,^{9,11} as MSCs são consideradas grandes candidatas para aplicação em terapia celular devido aos seguintes critérios: a) serem de fácil obtenção; b) poderem ser obtidas do próprio paciente; c) poderem ser obtidas de número de células adequado para transplante, devido à alta capacidade de proliferação celular *in vitro*; d) terem capacidade multipotente de diferenciação celular; e) serem de fácil manipulação no laboratório; f) serem pouco imunogênicas e g) possuírem habilidade de integração no tecido hospedeiro e interação com o tecido circunjacente. Entretanto, o ponto crítico em relação a esses critérios é que os cientistas ainda não conhecem todos os fatores envolvidos no controle da autorrenovação e diferenciação celular (controladas por genes específicos), tampouco os efeitos crônicos *in vivo* decorrentes da infusão de MSC. Não obstante, a capacidade das MSCs de se diferenciarem em tecidos de linhagem mesodérmica,^{10,11} como o muscular esquelético, o ósseo, o cartilaginoso e o adiposo, fortalece o seu potencial de aplicação no campo da medicina regenerativa.

Os fatores circunjacentes às células-tronco (fatores internos e externos) são extremamente importantes para a sua manutenção, isto é, autorrenovação e diferenciação celular. Esse microambiente complexo e dinâmico, que transmite e recebe os sinais por meio de mediadores celulares e não celulares, é denominado nicho.¹² Até o momento, os cientistas desconhecem os mecanismos que estabelecem os nichos.

[I] Plasticidade: recém-reconhecida capacidade das células-tronco de expandir as suas potencialidades para além dos tecidos a partir dos quais são derivados

[II] MSC: células-tronco mesenquimais ou do tecido estromal

Outro fator restritivo da utilização das ASC é a baixa quantidade de telomerase, pois os telômeros, nessas células, estão encurtados, limitando a capacidade de proliferação celular.⁷ Recentemente, os cientistas sugeriram a idade como fator limitante para a utilização das ASC, devido ao acúmulo de eventos intrínsecos, como mutações no DNA, bem como nos extrínsecos (alterações no nicho). Acredita-se que, com o avanço da idade, os mecanismos responsáveis pela supressão do desenvolvimento dos cânceres, como a senescência e a apoptose, podem induzir o declínio da função multiplicativa das células-tronco.¹³

A fração celular do estroma vascular (SVF) do tecido adiposo tem sido foco de pesquisas recentes em ASCs derivadas do tecido adiposo (*adipose-derived stem cells* - ADSCs).^{9,11,14,15} Alguns estudos indicam que esse compartimento tecidual é uma rica fonte de células pluripotentes,¹⁴⁻¹⁶ embora alguns cientistas contestem essa pluripotencialidade das ADSCs.¹⁷ As ADSCs, entretanto, compartilham características de ASCs e sua aplicação em estudos farmacológicos e clínicos, em especial, na busca por tratamentos de doenças degenerativas, tem sido avaliada.^{14,16}

O tecido adiposo é altamente complexo e consiste em adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, células do músculo liso vascular, células endoteliais, monócitos e macrófagos¹⁸ e linfócitos.¹⁹ Observa-se que, na literatura científica, há confusão inconsistente em relação aos termos utilizados para descrever as células-tronco multipotentes do tecido adiposo, como ADSCs, as células procedentes do lipoaspirado (PLA), pré-adipócitos ou SVF. O termo SVF corresponde a ADSCs e descreve as células obtidas imediatamente após a digestão da colagenase.^{20,21} Nesta revisão, adotar-se-á o termo ADSCs para as células-tronco presentes no tecido adiposo.

Alguns cientistas acreditam que o tecido adiposo seja uma promissora fonte de ASC para aplicações terapêuticas, em princípio, por estar disponível em grandes quantidades (100ml até 1l) por meio da liposucção e com mínima morbidade.^{22,23} Entretanto, há poucas revisões, na literatura científica, que abordam a caracterização celular e molecular das ADSCs.^{20,21} No campo da bioengenharia tecidual, o emprego das ADSCs tem sido cogitado no tratamento de doenças crônicas degenerativas, como na distrofia muscular ligada ao X de camundongos,²⁴ além de ser promissor para os tratamentos cirúrgicos reconstrutivos, de origem traumática ou não, como nas lipoatrofias congênitas ou adquiridas.^{25,26}

O objetivo deste trabalho de revisão é reunir as informações disponibilizadas na literatura científica sobre a preparação do tecido para a caracterização celular e molecular, a diferenciação das ADSCs e a sua

futura aplicação em medicina regenerativa, bem como os possíveis desafios nesse recente campo da ciência.

O TECIDO ADIPOSEO

Em humanos adultos, os depósitos de tecido adiposo marrom (TAM) estão praticamente ausentes. Por outro lado, o depósito localizado do tecido adiposo branco (TAB) está presente em diversas regiões do organismo, envolvendo órgãos e estruturas internas ou mesmo infiltrando-se neles.^{27,28} Anatomicamente, o TAB se distribui no organismo como tecido adiposo subcutâneo (TAS) e tecido adiposo visceral (TAV). Além dos adipócitos, o TAB contém uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos, macrófagos), fibroblastos e células-tronco.^{27,28}

Observou-se, nos últimos anos, que o tecido adiposo não é apenas um fornecedor e armazenador de energia, mas um órgão dinâmico, produtor de hormônios, que está envolvido em uma variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos, por ser capaz de secretar várias proteínas denominadas adipocinas (citocinas).²⁷

A estrutura protéica, assim como a função fisiológica das adipocinas identificadas até o momento, é altamente variada. As adipocinas podem ser agrupadas de acordo com a sua função principal: imunológica (ex. adiposina), cardiovascular, metabólica ou endócrina (ex. adiponectina).¹⁸

1. Adipogênese

A análise da adipogênese (processo de diferenciação do tecido adiposo) tem o intuito de desvendar a base molecular e celular do desenvolvimento do tecido adiposo.²⁷ Os componentes envolvidos na interação célula-célula ou na matriz celular são importantes na regulação do processo de diferenciação dos adipócitos.²⁷ Tanto os sinais hormonais como os nutricionais também podem afetar essa diferenciação de maneira positiva e negativa.

A diferenciação do pré-adipócito em adipócito é um processo altamente controlado. Fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR- γ), a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c) e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (*CCAAT/enhancer binding protein* - C/EBPs), desempenham um papel-chave na complexa cascata transcricional que ocorre durante a adipogênese.^{28, 29}

Os PPAR- γ são responsáveis pela diferenciação dos adipócitos e pelo armazenamento de lipídios. São os reguladores-chave da diferenciação dos adipócitos, com estímulo para aumento na expressão de vários genes. A ativação desses receptores leva à diminuição

da secreção de adipocinas (fator de necrose tumoral alfa - TNF- α e da leptina), ao mesmo tempo em que aumenta a secreção de adiponectina.^{28,29}

Os PPAR- γ podem ser ativados por compostos sintéticos denominados tiazolidinedionas (TZDs), os quais são usados clinicamente como agentes antidiabéticos.^{28,29}

A proteína SREBP (receptor nuclear órfão) é um fator de transcrição clonado originalmente do tecido adiposo de rato. O fator de transcrição SREBP é importante na homeostase dos lipídios, por aumentar a expressão do gene responsável pelas enzimas da lipogênese; entretanto, a sua função adipogênica e a relação com o PPAR- γ permanecem desconhecidas.^{28,29}

Os C/EBPs são membros da família b-zip (domínio básico de ligação do DNA), que contém um domínio *zipper* de leucina necessário para a dimerização. As isoformas do C/EBP (α , β e δ) são altamente expressas nos adipócitos e são induzidas durante a adipogênese. O C/EBP β tem um papel importante na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos e atua na conversão de fibroblastos em adipócitos. O C/EBP β também induz adipogênese, possivelmente, por estimular a expressão do PPAR- γ , cujo gene contém sítios C/EBP na sua região promotora. Foi demonstrado que o PPAR- γ é um potente estimulante da cascata de diferenciação celular do adipócito e atua sinergicamente com C/EBP β para promovê-la ou para induzir a diferenciação de fibroblastos em adipócitos.^{28,29}

CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo representa fonte abundante de células para transplantes autólogos, além de ser facilmente obtido por lipoaspiração, que é um método mais barato e menos invasivo do que a punção da medula óssea. Ainda não há, entretanto, um consenso entre os pesquisadores quanto à nomenclatura e à plasticidade das ADSCs.^{17,20,21}

As análises comparativas das MSCs, das células-tronco derivadas do estroma da medula óssea (*bone marrow stromal cells* - BMSCs), das ADSCs e das células-tronco do cordão umbilical (CUSC) demonstraram que as ADSCs não são diferentes quanto à morfologia e ao fenótipo imunológico, comparativamente às BMSCs e às CUSCs.^{10,15} Contudo, a frequência de ADSCs no tecido adiposo excede a frequência das BMSCs^[III] no estroma medular.³⁰⁻³³ A taxa de proliferação celular das ADSCs é maior do que a das BMSCs.³¹

Por meio de lipoaspirado, podem-se obter aproximadamente $2-6 \times 10^8$ células em 300ml de tecido

adiposo. Esse número de ADSCs, entretanto, pode variar, dependendo do método de coleta. De fato, os dados da literatura em relação ao isolamento das ADSCs indicam que, de acordo com o procedimento cirúrgico^[IV] e o método laboratorial empregado, podem-se obter não apenas quantidades diferentes de ADSCs a partir da mesma quantidade de tecido adiposo,³⁰⁻³⁵ mas também ADSCs com viabilidade e características variadas.³⁴ A viabilidade das ADSCs, entretanto, aparentemente, não é alterada após a criopreservação do material aspirado.³⁵

Apesar da carência de estudos clínicos, o número das ADSCs parece não se alterar, quanto à região anatômica.³² Entretanto, nos humanos, o tecido adiposo apresenta diferenças de metabolismo, conforme a localização anatômica.²⁷ Além disso, outro fator que pode interferir na composição celular é a idade, pois se observou que os indivíduos mais jovens apresentam maior número de ADSCs em comparação com os mais idosos.¹³ Em camundongos, pesquisadores observaram diferenças em relação à composição celular e à capacidade de diferenciação das ADSCs, de acordo com as regiões anatômicas.¹⁵

Assim, parece provável que o tecido adiposo humano seja composto de diferentes subtipos de células-tronco, dependendo da localização anatômica. No entanto, são necessários mais estudos comparativos acerca da natureza celular e do potencial de diferenciação das ADSCs isoladas de tecido adiposo de regiões anatômicas distintas, com atenção, também, ao tipo de procedimento cirúrgico e/ou laboratorial empregado.

É clinicamente relevante o número de células-tronco que podem ser obtidas do tecido adiposo, uma vez que elas possuem maior taxa de proliferação celular do que as BMSCs.³²

1. Identificação, características moleculares e diferenciação das ADSCs

Rodbell et al. (1960)³⁶ introduziram o método inicial para isolar as células do tecido adiposo. No início, esse método era realizado apenas em amostras de tecido adiposo de animais de laboratório (ratos, coelhos). Posteriormente, foi modificado para amostras de tecido adiposo humano (Figura 1).

O tecido adiposo é triturado e lavado extensivamente com tampão salino de fosfato (*phosphate-buffered saline* - PBS) contendo penicilina/estreptomicina (P/S). Logo em seguida, com a adição da colagenase, inicia-se a fase de digestão. O tecido é incubado a 37°C por 30 minutos a 90 minutos. Após esse tempo, é

[III] A incidência das BMSCs é estimada em cerca de 1 em cada 100.000-500.000 células nucleadas do aspirado da medula óssea de adultos

[IV] Ressecção cirúrgica ou lipoaspiração tumescente ou lipoaspiração assistida com ultrassom

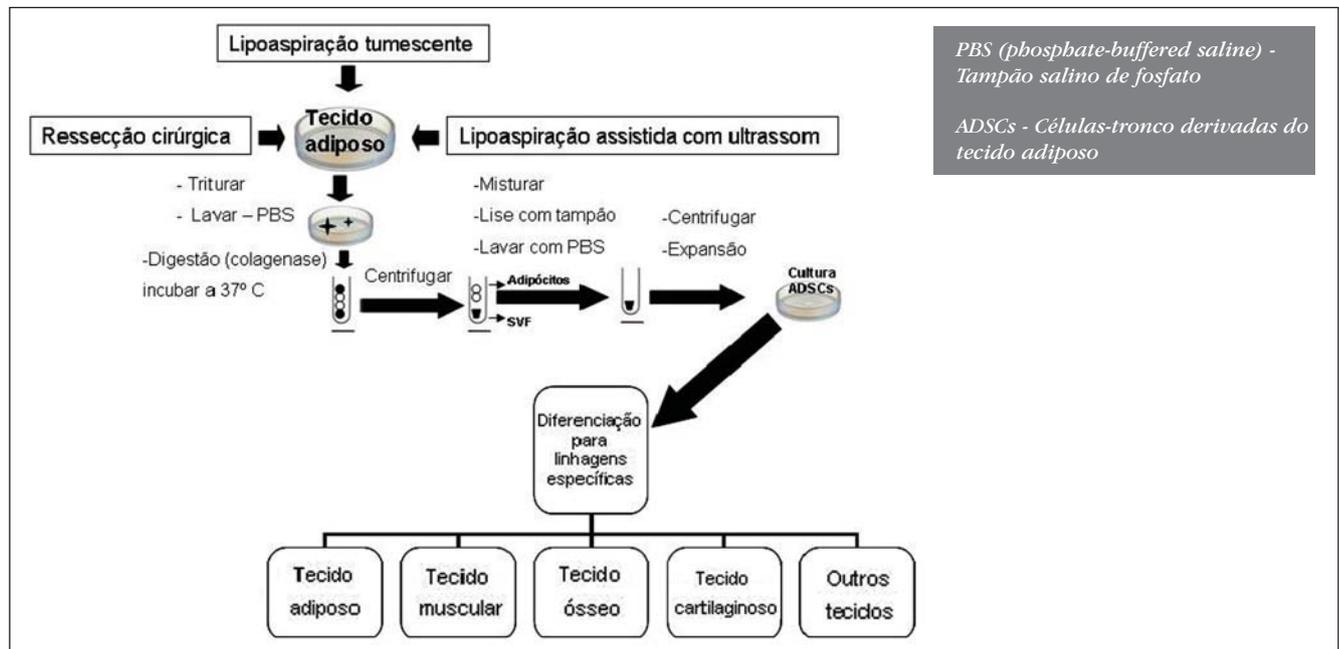


FIGURA 1: Esquema do procedimento laboratorial para isolamento de células-tronco derivadas do tecido adiposo

necessário neutralizar a atividade da colagenase, por meio da adição de soro fetal bovino (FBS).^{20,21,33}

Antes de se transferir a amostra para o tubo da centrifugação, é aconselhável misturar, para desintegrar, os agregados do tecido adiposo. Após o material ser centrifugado, é possível separar os adipócitos do SVF. O SVF consiste em população heterogênea de células, incluindo células sanguíneas circulantes, fibroblastos, periócitos e células endoteliais, bem como as ADSCs.^{21,33}

O passo final para o isolamento das ADSCs é a seleção da população aderente dentro do SVF. Após completar a separação do SVF dos adipócitos, a amostra (SVF) é incubada no gelo por 10 minutos, com tampão de lise. Logo depois, a amostra é lavada com PBS contendo P/S e, novamente, centrifugada. Em seguida, inicia-se a expansão celular em meio de cultura apropriado (ex. DMEM-LG - *Dulbecos's modified Eagle's medium*). As células são semeadas em placas de cultura celular e expandidas em cultura por até 15 passagens.^[V] As ADSCs assim obtidas podem ser utilizadas em vários protocolos de caracterização celular (Figura 1).^{33,36,37} As várias proteínas de superfície tidas como marcadores de ADSCs são apresentadas na tabela 1.^{9,10,17,30,31,33,34}

Zhu Y et al. (2008)³² observaram que as ADSCs podem ser mantidas em cultura com várias fases de crescimento, sem passagem, por mais de um mês. Durante esse período, logo depois da segunda semana, os autores observaram que houve aumento da sín-

tese protéica e, conseqüentemente, da expressão das proteínas de superfície.

Como pré-requisito mínimo, por meio de análise de citometria de fluxo, as MSCs devem expressar antígenos característicos, como CD73, CD105 e CD90. As ADSCs também expressam altos níveis desses antígenos, sendo CD13, CD29, CD44, CD105 e CD166 os mais frequentes (Tabela 1).^{9,10,30,31,33,34} Em contrapartida, as ADSCs não expressam antígenos hematopoéticos, como CD34, CD45 e HLA-DR, perfil também encontrado em MSCs.

Zhu Y et al. (2008),³² depois de 25 passagens, realizaram subculturas das ADSCs a cada 14 dias, em vez de cinco, com o propósito de obter maior quantidade de ADSCs, mantendo o fenótipo, a capacidade de proliferação e diferenciação.

Alguns autores observaram melhora da taxa de crescimento e da viabilidade das ADSCs, com o uso de antioxidantes e concentração baixa de cálcio.³⁷ Várias proteínas podem estimular a proliferação das ADSCs, como:

- fator de crescimento -2 (FGF-2), pelo receptor do FGF-2;³⁸
- esfingofosforilcolina, pela ativação da quinase no N terminal de c-jun (JNK);³⁹
- fator derivado de plaquetas, pela ativação do JNK⁴⁰
- oncostatina M,⁴¹ pela ativação associada dos microtubos da quinase (MEK), do sinal

[V] Passagem: na cultura celular, é o processo no qual as células são dissociadas, lavadas e semeadas em novas placas de cultura, depois de um ciclo de crescimento e proliferação celular. O número de passagens que uma linha de células cultivadas percorre é uma indicação da sua idade e suposta estabilidade

TABELA 1: Perfil de expressão de marcadores proteícos em células-tronco derivadas do tecido adiposo

Expressão positiva	Expressão negativa ou deficiente
CD9	CD11b
CD10	CD14
CD13	CD19
CD29	CD31
CD44	CD34
CD49	CD45
CD54	CD79 ALFA
CD55	CD80
CD59	CD117
CD73	CD133
CD90	CD144
CD105	HLA-DR
CD106	c-kit
CD146	MyD88
CD166	STRO-1
HLA1	LIN
FIBRONECTINA	HLAI
ENDOMUCINA	
ASMA	
VIMENTINA	
COLÁGENO-1	

* Conforme a literatura científica - Barry & Murphy, 2004;⁹ Kern et al., 2006;¹⁰ De Ugarte et al., 2003;³⁰ Lee et al., 2004;³¹ Oedayrajsingh et al., 2006;³³ Gronthos et al., 2001³⁴ -, todos os marcadores de superfície celular foram verificados *in vitro* após a expansão celular. Não foram avaliados em células primárias. Todos os esforços para tentar diferenciar o fenótipo molecular dessas células e as similares aos fibroblastos não obtiveram sucesso. Como pré-requisito mínimo, as ADSCs expressam marcadores tipicamente mesenquimais (em negrito) e expressam, de modo deficiente, marcadores de linhagem hematopoética e endotelial. (Fonte: Schäffler & Büchler, 2007²⁰).

extracelular regulador da quinase (ERK) e pelo JAK3/STAT1.^[VI]

As ADSCs são capazes de manter a autorrenovação (ou automultiplicação) *in vitro*,⁴² por secretarem fatores de crescimento. O potencial oncogênico das ADSCs pode ser reduzido pela inibição da proteína MEK1, porém isso não afeta o potencial de diferenciação das ADSCs. A longevidade das ADSCs humanas pode ser prolongada pela superexpressão da subunidade catalítica do gene da telomerase.⁴³ Além disso, as ADSCs secretam outros potentes fatores do crescimento, como o fator de crescimento endotelial (VEGF), o fator de crescimento dos hepatócitos

(HGF) e o fator de crescimento 1, que é similar ao fator de crescimento insulínico-1 (IGF-1).⁴⁴ O fator de necrose tumoral pode aumentar significativamente a secreção de VEGF, HGF, e IGF-1 das ADSCs pela ativação do p38, que é dependente do mecanismo da proteína quinase.⁴⁴

Há algumas diferenças moleculares entre as ADSCs e as BMSCs, embora os perfis da expressão das proteínas de superfícies^[VII] e dos genes^[VIII] pareçam ser similares^{10,33} (Tabela 1). Estima-se que menos de 1% dos genes é expresso de modo diferente entre as ADSCs e as BMSCs.³¹ Na literatura, não houve sucesso na caracterização fenotípica específica das ADSCs e são raros os estudos comparativos entre a expressão do gene e as proteínas de superfície das ADSCs e BMSCs.^{10,30,31}

É necessário o desenvolvimento do conhecimento sobre os mecanismos que regulam a biologia das ADSCs para que se possa aperfeiçoar e padronizar as técnicas laboratoriais de isolamento, caracterização e manipulação de ADSCs. Tal conhecimento é pré-requisito não apenas para cultura e diferenciação de linhagem celular específica, mas também para o desenvolvimento de possível terapia de maior eficácia.

Cabe ressaltar que as ADSCs compartilham propriedades imunossupressoras com as BMSCs,⁴⁵ além da expressão deficiente de HLA-DR. Assim, é bem possível que, no futuro, as ADSCs possam ser disponibilizadas para transplantes alogênicos, em razão do menor risco de rejeição.⁴⁵

O processo pelo qual as ADSCs se diferenciam em outras células é denominado diferenciação de linhagem específica⁹ e se inicia pela ativação de certos fatores de transcrição (Figura 2). Atualmente, pesquisadores^{17,25,46-49} demonstraram *in vitro* a habilidade das ADSCs de se diferenciarem em células de origem mesenquimal (adipócitos, miócitos, osteócitos e condrócitos) e não mesenquimal (hepatócitos, neurônios, células pancreáticas, células endoteliais e cardiomiócitos) - (Tabela 2).²⁰ Rodriguez et al. (2005)⁴⁸ demonstraram *in vivo* que a implantação de ADSCs em camundongos restaurou a expressão de distrofina nas células musculares dos mesmos.

Antes dos eventos de transcrição, o processo pelo qual as células-tronco se tornam comprometidas ou destinadas a certa linhagem específica ainda é insuficientemente compreendido.⁸ Todavia, alguns fatores de transcrição teciduais são conhecidos. Em células-

[VI] JAK3 - Janus Kinase 3- enzima encontrada nas células imunes, responsável pelo processo de sinalização que resulta na diferenciação de leucócitos. STAT1 - fator de transcrição - transdutor de sinal e ativador da transcrição que media as respostas celulares aos interferons. STAT1 interage com a proteína supressora de tumor p53 e regula a expressão de genes envolvidos no controle do crescimento e apoptose

[VII] Determinada pelo rastreamento de células ativadas por imunofluorescência - FACS (fluorescence-activated cell sorting)

[VIII] Determinado por microarranjos

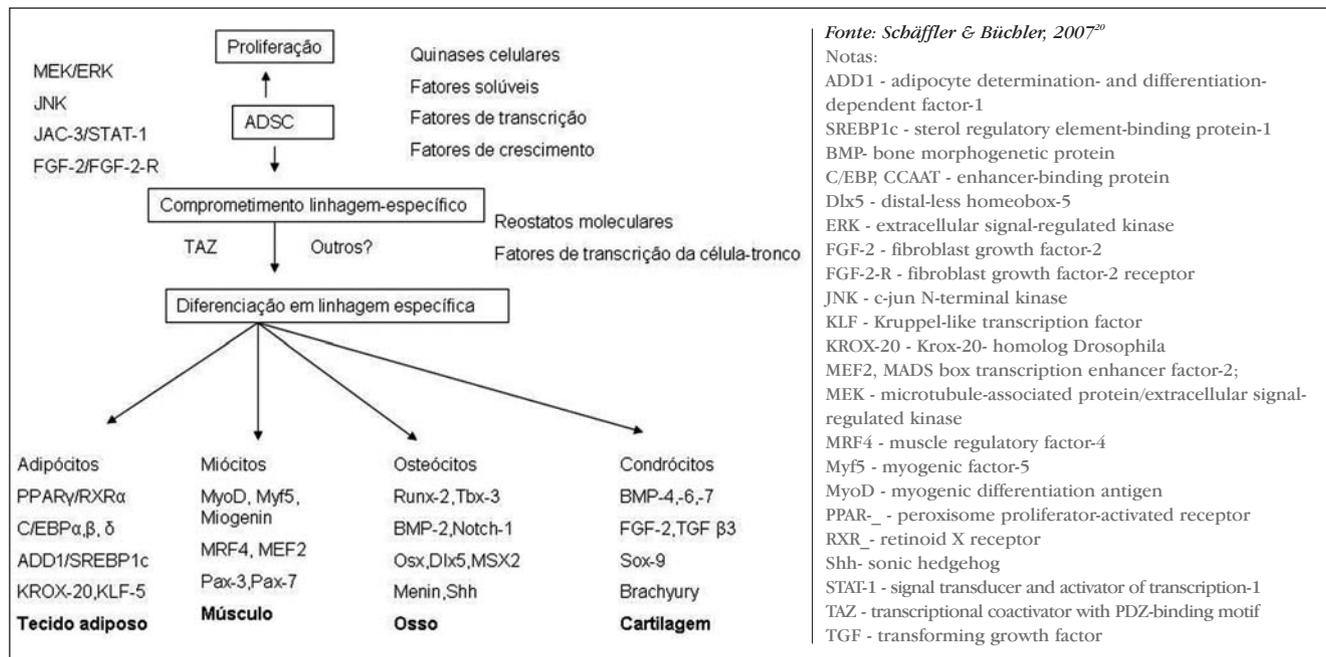


FIGURA 2: Regulação molecular da proliferação, comprometimento linhagem-específico e diferenciação das células-tronco derivadas do tecido adiposo

tronco, o processo de proliferação, comprometimento e diferenciação terminal para uma linhagem celular específica é regulado por complexa rede de interação molecular, que envolve moduladores da transcrição gênica, fatores de transcrição, proteínas quinases, fatores de crescimento e receptores celulares (Figura 2). O Runx-2, por exemplo, é um fator-chave de transcrição para a osteogênese, envolvido na diferenciação de ADSCs em osteócitos,⁵⁰ enquanto que o PPAR- γ é um fator envolvido na diferenciação adipogênica das ADSCs. Hong et al. (2006)⁵⁰ demonstraram que o TAZ (fator co-ativador de transcrição) é capaz de ativar o fator de transcrição Runx-2, além de inibir a transcrição do gene codificador de PPAR- γ .

2. Perspectivas terapêuticas

As células-tronco somáticas e embrionárias são úteis para investigar questões não apenas no campo da ciência básica, mas também das pesquisas clínicas. O uso de células-tronco somáticas, principalmente, pela praticidade e por não envolver questões éticas e imunogênicas, é uma das áreas mais promissoras nas pesquisas acerca da regeneração tecidual e do desenvolvimento do câncer. Nesse campo, há um interesse crescente na utilização de ADSCs em estudos sobre o desenvolvimento de neoplasias, doenças degenerativas e ainda aplicações terapêuticas na área de cirurgia reconstrutiva (Tabela 2).²⁰

Além disso, as ADSCs podem ser empregadas em: i) estudos básicos com vistas à compreensão de mecanismos moleculares, genéticos e epigenéticos envolvidos no controle de processos intrínsecos de

células-tronco, ii) estudo da fisiopatologia de doenças genéticas humanas e iii) desenvolvimento e teste de novos fármacos. Embora estratégias terapêuticas com as ADSCs ainda não tenham sido amplamente testadas em humanos, acredita-se que os avanços técnico-científicos nas áreas de biologia celular e molecular, facilitados pelos estudos com células-tronco somáticas humanas, poderão influenciar, de modo positivo, o avanço da pesquisa clínica com as ADSCs.

CONCLUSÕES

Apesar do rápido progresso, várias questões importantes sobre o uso das ADSCs na bioengenharia tecidual permanecem sem resposta. Essas questões precisam ser abordadas em uma fase anterior à fase de testes clínicos, para melhor direcionamento das estratégias clínicas. Entre os principais desafios atuais, podem-se citar: como controlar os processos de proliferação e diferenciação das ADSCs *in vitro* e *in vivo*? Quais são os fatores que controlam esses processos? Quais fatores do nicho celular são determinantes no controle do seu comportamento? Quais são os fatores que estimulam a migração e integração de ADSCs nos sítios de injúria tecidual? Qual é a capacidade de ADSCs em formar tumores?

Um fator importante para o avanço das pesquisas com ADSCs é a padronização dos métodos cirúrgicos e laboratoriais aplicados no isolamento e caracterização dessas células. Nessa linha, estudos comparativos são extremamente relevantes e devem ser desenvolvidos para avaliação de procedimentos cirúrgicos com fins de obtenção de tecido adiposo, bem como

TABELA 2: Fatores utilizados experimentalmente para induzir a diferenciação das células-tronco derivadas do tecido adiposo

Fatores de diferenciação	Tipo de diferenciação	Potencial clínico
Insulina, IBMX (3-isobutil-1-metixantina), dexametasona, rosiglitazona, indometazona	Adipogênico	Cirurgias reconstrutivas, preenchimento cutâneo
Proteína morfogenética do osso (BMP-6, BMP-7), fator de crescimento de fibroblasto (FGF-2), fator de crescimento de transformação (TGF- β_1 , TGF- β_2), dexametasona, fator de crescimento insulínico (IGF)	Condrogênico	Cirurgias reconstrutivas, reparo das articulações nas doenças degenerativas
1,25 didroxicolecalciferol β , glicerofosfato, ácido ascórbico, BMP-2, ácido valproico	Osteogênico	Regeneração do tecido ósseo nas doenças degenerativas, nos tumores e nos traumas
?	Miogênico	Regeneração nas doenças degenerativas como a distrofia muscular de Duchenne
Fator de célula-tronco (SCF), interleucina-3, interleucina-6	Cardiomiogênico	Regeneração do músculo cardíaco após infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca
?	Vascular/endotelial	Neovascularização/doenças isquêmicas
Ácido valproico, insulina, hidrocortisona, fator de crescimento epidérmico (EGF), FGF	Neurogênico	Doenças crônico-degenerativas e traumas do sistema nervoso central e periférico
Activina-A, exedina-4, pentagastrina, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), nicotinamida, glicose	Pancreático/endócrino	Diabetes melito tipo 1
HGF, oncostatina, dimetilsulfoxide	Hepático	Regeneração hepática
?	Hematopoético	Reconstituição hematopoética

Fonte: Schäffler & Büchler, 2007²⁰

da melhor localização da área doadora de tecido adiposo. Também devem ser padronizadas as técnicas laboratoriais de preparação do tecido para isolar e identificar as ADSCs, as técnicas de cultivo celular em escala e grau de pureza para aplicação clínica e os métodos que avaliam a qualidade das células a serem implantadas (ex. avaliação de potencial de diferenciação celular, presença de alterações genéticas ou epigenéticas, etc.).

Igualmente relevante é a compreensão dos mecanismos moleculares que fundamentam a autorrenovação e a diferenciação das ADSCs, bem como a sua interação com o nicho celular. Esse tipo de conhecimento básico poderá auxiliar o desenvolvimento de novas terapias e avaliar questões de biossegurança em protocolos clínicos futuros. □

REFERÊNCIAS

1. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154-6.
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshal VS, et al Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 1998; 282:1145-47.
3. Verfaillie CM, Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*. 2002;12:502-8.
4. Forbes SJ, Vig P, Poulson R, Wright NA., Alison M.R. Adult Stem Cell Plasticity: New Pathways of Tissue Regeneration become Visible. *Clin Sci*. 2002;103:355-69.
5. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic. *Stem Cells Cell*. 2003;113:643-55.
6. Nishikawa SI, Goldstein RA, Nierras CR. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;9:725-29.
7. Josephson R, Sykes G, Liu Y, Ording C, Xu W, Zeng X et al . A molecular scheme for improved characterization of human embryonic stem cell lines. *BMC Biol*. 2006;4: 28.
8. Dani C. Differentiation of embryonic stem cells as a model to study gene function during the development of adipose cells. *Methods Mol Biol*. 2002;185:107-16.
9. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:568-8417.
10. 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.
11. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.
12. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:11-21.
13. Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:703-13.
14. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2003;5:362-69.
15. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Exp Cell Res* 2006;312:727-36.
16. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells*. 2005;23:412-23.
17. Awad HA, Halvorsen YD, Gimble JM, Guilak F. Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng*. 2003;9:1301-12.
18. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112:1821-30.
19. Caspar-Bauguil S, Cousin B, André M, Nibbelink M, Galinier A, Periquet B, et al. Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific change in obesity. *FEBS Lett*. 2005;579:3487-92.
20. Schäffler A, Büchler C. Concise Review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25 818-27.
21. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoli C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45:115-20.
22. Coleman SR. Long-term survival of fat transplant: controlled demonstrations. *Aesth Plast Surg*. 1995;19:421-5.
23. Yokomizo VMF, Benemond TMH, Kadunc BV. PO94-Tratamento de cinco casos de lipodistrofia por transplante de gordura autóloga. *An Bras Dermatol*. 2005;80(Supl 2):S148.
24. Fernyhough ME, Hausman GJ, Guan LL, Okine E, Moore SS, Dodson MV. Mature adipocytes may be a source of stem cells for tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;368:455-7.
25. Fischer P, Möller P, Bindl L, Melzner I, Tornqvist H, Debatin KM, et al. Induction of Adipocyte Differentiation by a Thiazolidinedione in Cultured, Subepidermal Fibroblast-Like Cells of an Infant with Congenital Generalized Lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:2384-90.
26. Kimura Y, Ozeki M, Inamoto T, Tabata Y. Time course of de novo adipogenesis matrigel by gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng*. 2002;8:603-13.
27. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280:E827-47.
28. Osborne TF. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPS): key regulations of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem*. 2000;275:32379-82.
29. Olefsky JM. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem*. 2001;276:36863-64.
30. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174:101-9.
31. Lee RH, Kim BC, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh KT, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14:311-24.
32. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct*. 2008;26:664-75.
33. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, et al

- Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8:166-77.
34. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 2001;189:54-63.
 35. Pu LLQ, Xiangdong C, FINK BF, Dayong G, Vasconez HC. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117:1845-50.
 36. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. V. Preparation of "ghosts" and their properties; adenyl cyclase and other enzymes. *J Biol Chem*. 1967;242:5744-50.
 37. Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells*. 2005;14:92-102.
 38. Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343:644-52.
 39. Jeon ES, Song HY, KIM MR, Moon HJ, Bae YC, Jung JS, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via activation of JNK. *J Lipid Res*. 2006;47:653-64.
 40. Kang YJ, Jeon ES, Song HY, Woo JS, Jung JS, Kim YK, et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2005;95:1135-45.
 41. Song HY, Jeon ES, Jung JS, Song HY, Jeon ES, Jung JS, et al. Oncostatin M induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:2357-65.
 42. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:2412-19.
 43. Jun ES, Lee TH, Cho HH, Suh SY, Jung JS. Expression of telomerase extends longevity and enhances differentiation in human adipose tissue-derived stromal cells. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14:261-8.
 44. Wang M, Crisostomo PR, Herring C, Meldrum KK, Meldrum DR. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF and IGF-1 in response to TNF by a p38 mitogen activated protein kinase dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291:R880 -R884.
 45. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005;129:118 -129.
 46. Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose derived adult stem cells. *J Cell Physiol*. 2006;206:229-37.
 47. Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, et al. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng*. 2005;11:120 -29.
 48. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med*. 2005;201:1397-1405.
 49. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Jazedje T, Secco M, Nunes VA et al. Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of duchenne skeletal-muscle cells in vitro. *Biol Cell*. 2008;100:231-41.
 50. Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam AA, Tian Y, Kalmukova R. TAZ a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science*. 2005;309:1074-78.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Samira Yarak
Universidade Federal do Vale do São Francisco
Avenida José de Sá Maniçoba, s/nº Centro Caixa
postal 252
56304-205. Petrolina -PE
E-mail: sa.la@terra.com.br

Como citar este artigo/How to cite this article: Yarak S, Okamoto OK. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *An Bras Dermatol*. 2010;85(5):647-56.