



**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia**

**GISELY JULIANE BARBOSA DE ALBERTIM**

**ESTUDO DA REGULAÇÃO DO VOLUME DAS CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DE GELÉIA DE WHARTON**

Recife  
2012

**GISELY JULIANE BARBOSA DE ALBERTIM**

**ESTUDO DA REGULAÇÃO DO VOLUME DAS CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DE GELÉIA DE WHARTON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia, em Fevereiro de 2012.

ORIENTADOR: Prof<sup>o</sup> Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues.  
Prof<sup>o</sup> Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov(*in memoriam*)

CO-ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Bezerra da Silva

Recife  
2012

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Albertim, Gisely Juliane Barbosa de**  
**Estudo da regulação do volume das células-tronco**  
**mesenquimais de geléia de Wharton/ Recife: O Autor, 2012.**

**95 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Cláudio Gabriel Rodrigues e Oleg Vladimirovich**  
**Krasilnikov**

**Coorientadora: Márcia Bezerra da Silva**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,**  
**Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2012.**

**Inclui bibliografia e anexos**

- 1. Células-tronco I. Rodrigues, Cláudio Gabriel (orientador) II. Krasilnikov, Oleg Vladimirovich (orientador) III. Silva, Márcia Bezerra da (coorientadora) III. Título**

**616.02774**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2014- 192**

**GISELY JULIANE BARBOSA DE ALBERTIM**

**ESTUDO DA REGULAÇÃO DO VOLUME DAS CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DE GELÉIA DE WHARTON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

ORIENTADOR: Prof<sup>o</sup> Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues. Prof<sup>o</sup> Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov(*in memorian*)

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Márcia Bezerra da Silva

**Banca Examinadora**

**APROVADA EM 14.02.2012**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues  
Presidente - Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Adalberto Ramon Vieyra  
Universidade federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade Costa  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho....

.... com muito carinho

À minha pequena e querida filha Maria Isabelly por me dá forças e me fazer uma pessoa melhor a cada dia. Te amo demaissss.

Aos meus pais, em especial minha mãe Conceição pelo apoio e incentivo em minha jornada.

Ao Prof. Dr. Oleg (*in memorian*) pela confiança. Saudades sempre... Aos colegas e amigos do Laboratório de Biofísica de Membranas (LBM).

Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, agradeço pela vida, por iluminar esta caminhada.

À minha filha amada Maria Isabelly, pelo carinho e incentivo diário, por ser a razão da minha constante luta em tornar-me uma pessoa melhor a cada dia. Amoooo mais que tudooo!!!!

À minha família pelo voto de confiança, pelo apoio incondicional e incentivo. Em especial a minha mãe Maria da Conceição.

Um agradecimento especial, ao meu querido orientador - Prof<sup>o</sup>. Oleg Krasinilnikov que infelizmente não está mais entre nós, mas que foi o grande mentor deste trabalho e que seus ensinamentos ficarão guardados para sempre. Saudades imensas!!

Agradeço pela oportunidade, acolhimento e confiança dada durante os anos de convivência, aos aprendizados que nunca serão esquecidos, como também pelo apoio, paciência, compreensão e tolerância em momentos difíceis. Pela preocupação em cada etapa do trabalho o que contribuiu de forma significativa. Por acreditar em meu potencial, motivando-me a seguir em frente e me integrar a uma equipe ao qual tenho o prazer de trabalhar.

À Prof<sup>a</sup> Lylia Yuldasheva, agradeço pelo carinho, disponibilidade, paciência e preocupação. Deus a conforte e dê forças.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Márcia Bezerra que contribuiu de forma significativa na meu ingresso na pesquisa, por ter aberto as portas da Biofísica, pelos ensinamentos, acompanhamento, paciência e dedicação durante todos esses anos. Pelo acompanhamento nos experimentos.

Ao Professor Claudio Gabriel que sempre foi prestativo e ainda mais neste momento difícil se tornou essencial para o cumprimento deste trabalho. Pela atenção, preocupação e apoio. Por nos está dando força para continuar.

Ao Prof. Reginaldo Pereira pela atenção e apoio. Sempre disposto a ajudar.

Ao Clyntiano e Rafael pela colaboração na realização dos experimentos.

A colaboradora Valéria Rego do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães pela disponibilidade na realização dos experimentos no citômetro de fluxo.

Aos amigos do Laboratório de Biofísica de Membranas (LBM), que tornam minha jornada científica melhor a cada dia, acolhedora e rica de aprendizado. Em especial a Djanah Cota pela paciência e disponibilidade sempre prestativa. Diego, Janilson, Juliana, Sheila, Carolina.

A toda equipe de células-tronco (Layse Malagueta, Darlene Paiva, Jéssica) vocês foram importantes na minha jornada.

A minha amiga Nadja Freire pela preocupação e acolhimento nos momentos difíceis - obrigada sempre pela força e torcida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro de suma importância para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Hospital D'Avila pela parceria e concessão dos cordões umbilicais.

*Que Deus proteja todos vocês.*

**“Por mais longa que seja a caminhada, o mais importante é dar o primeiro passo.”**

**(Vinícius de Moraes)**

## RESUMO

A regulação do volume celular é importante em vários processos fisiológicos. O fenômeno de encolhimento e/ou inchaço celular provocado por alterações osmóticas são chamados de aumento regulatório do volume (*RVI*) e diminuição regulatória do volume (*RVD*), respectivamente. A *RVD* é o processo pelo qual as células recuperam o seu volume após terem sido submetidas a um choque hipoosmótico. Esse processo deve-se a liberação de potássio e cloreto através de canais e transportadores iônicos. Evidências indicam que os canais iônicos têm importância fundamental na regulação do volume em células cancerosas e existe uma relação entre a atividade dos canais iônicos e a proliferação celular. A proliferação celular é uma propriedade fundamental tanto no crescimento tecidual como na reprodução celular. Contudo, não há informações sobre os mecanismos de regulação do volume em células-tronco mesenquimais. Neste trabalho, estudamos a participação dos canais e transportadores iônicos envolvidos na *RVD* durante o choque hipoosmótico das células-tronco mesenquimais da geléia de Wharton do cordão umbilical humano (hwMSCs). As hwMSCs foram isoladas de acordo com a técnica de migração espontânea do explante e todo o protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. As hwMSCs foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 20% soro fetal bovino, 10% F-12, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As culturas foram mantidas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Nos experimentos de *RVD*, as hwMSCs foram depositadas em uma cubeta acoplada ao um microscópio invertido com um sistema de vídeo imagem, sendo submetidas inicialmente a um choque hipoosmótico (300mOsm→200mOsm) por perfusão. A dinâmica de variação do volume foi monitorada por 30 minutos e as imagens antes (300 mOsm) e durante o choque hipoosmótico (200 mOsm) foram obtidas a cada minuto e analisadas usando o software ImageJ. As hwMSCs foram submetidas aos seguintes inibidores de canais iônicos: ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzóico (NPPB), (canal de Cl<sup>-</sup>); tetraetilamônio (TEA), (canal de K<sub>v</sub>); glibenclamida (GB), (canal de Kir6.x); 4-aminopiridina (4-AP), (canal de K<sub>v</sub>1, KCNA). Adicionalmente, a *RVD* nas hwMSCs (5x10<sup>6</sup> cels/ml, viabilidade>85%) na ausência e presença dos inibidores TEA e GB, foi monitorada através de um contador de células ViCell. A *RVD* presente nas hwMSCs foi praticamente inibida por TEA (10mM), GB (100µM), 4-AP (5mM) e NPPB (100µM), onde as células permaneceram com seus volumes aumentados durante 30 minutos, possivelmente pela modificação dos canais iônicos. Além da supressão do *RVD*, os inibidores também influenciaram o volume atingido pelas células imediatamente após o choque hipotônico ( $V_{máx}$ ) de forma diferenciada, indicando um bloqueio da entrada de água, sugestivo de alteração no funcionamento das aquaporinas. Deste modo, concluiu-se que canais de potássio dependentes de ATP e de voltagem, e, canais de cloreto participam no mecanismo da *RVD* nas hwMSCs.

**Palavras chaves:** Regulação de volume, *RVD*, canal iônico, células-tronco mesenquimais, inibidores.

## ABSTRACT

Control of cell volume is essential for the survival of animal cells. It is important for various cell functions including proliferation. Using cancer cell lines it was shown that ion channels play a key role in cell volume regulation. However, there is not information about mechanisms of volume regulation in mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord (hwMSCs). Analysis of osmotic cell shrinkage and/or swelling provoked by osmotic challenger is called as a regulatory volume increase (RVI) and a regulatory volume decrease (RVD), and used for study of underlining mechanisms. This work was aimed to study ion channels (cationic and anionic) involved in volume regulation hwMSCs via analysis of cell response to hipoosmotic shock. The hwMSCs were isolated by spontaneous migration according to the protocol approved by the institutional Ethics Committee (Federal University of Pernambuco). The protocol is based uniquely on the capacities of MSCs to adhere to a plastic surface without enzymatic treatment. The cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with 20% bovine fetal serum (LGC) and 10% F-12 (Invitrogen), 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin. Cultures were maintained in a humidified (80%) atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. In the experiments the RVD, the hwMSCs were placed in a chamber attached to an inverted microscope with a video imaging system, being initially subjected to a hipoosmotic shock (300mOsm →200mOsm). The dynamics of change in volume was monitored for 30 minutes and images before (300 mOsm) and during the shock hipoosmotic (200 mOsm) were obtained every minute and analyzed using ImageJ software. Specific inhibitors of cellular anion (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid, NPPB) (Cl-channel) and cation (tetraethylammonium, TEA (K<sub>v</sub> channel); glibenclamide, GB (Kir6.x channel); and 4-aminopyridine, 4-AP (channel K<sub>v1</sub>, KCNA)) permeability were used as molecular tools. In addition, hwMSCs (5x10<sup>6</sup> cells / ml, viability> 85%) in the absence and presence of TEA and GB, was monitored using a cell counter. The results shown that hwMSC hold the RVD. The process was abolished in presence of all inhibitors TEA (10 mM), GB (100 µM), 4-AP (5 mM) and NPPB (100 µm). The maximum volume (V<sub>máx</sub>) was decreased by the inhibitors, suggesting also that they have influence in aquaporins. The hwMSCs possess mechanisms of volume regulation and various ion channels are involved, including ATP-and voltage-dependent potassium channels and chloride channels.

**Key words:** Cell volume, RVD, ion channel, mesenquimal stem cells, inhibitors.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Fluxo osmótico através de uma membrana semipermeável. A seta indica a direção do fluxo resultante, de uma solução com menor concentração do soluto, ou seja, 0,1 M NaCl, para uma de maior concentração (1 M NaCl). Se existir uma pressão aplicada à esquerda da câmara através de um pistão, haverá uma redução no fluxo de água. A pressão necessária para impedir o fluxo da água, é denominada pressão osmótica (Equação 1 abaixo) (Adaptada de STRANGE, 2004)

**Figura 2.** Significado funcional do volume celular (Adaptada de LANG, 2007)

**Figura 3.** Representação esquemática dos mecanismos regulatórios do volume em resposta a perturbações no volume. Perda e ganho de solutos reguladores do volume são denominados de diminuição regulatória do volume (RVD) e aumento regulatório do volume (RVI), respectivamente. O decurso de RVD e RVI varia de acordo com o tipo celular e condições experimentais. Tipicamente, contudo, RVI é mediado pelo ganho de eletrólitos e RVD pela perda de eletrólitos e osmólitos orgânicos ocorrendo durante um período de minutos (Adaptada de STRANGE, 2004)

**Figura 4.** Representação esquemática da regulação de volume em estado estacionário sob condições isotônicas pelo mecanismo “Duplo Donnan” através da Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>/ ATPase na maioria dos tipos celulares (A) e via Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> ATPase em tipos celulares tais como eritrócitos de gato ou de cachorro (B) (Adaptada de OKADA, 2004)

**Figura 5.** Estrutura química das principais classes de osmólitos orgânicos em células animais (Adaptada de LANG et al., 2007)

**Figura 6.** Representação esquemática dos mecanismos de acúmulo e perda de osmólitos orgânicos. O acúmulo de osmólitos orgânicos reguladores do volume em células animais é mediado em grande parte por mudanças na atividade dos transportadores de membrana acoplada ao Na<sup>+</sup> e por alterações nas taxas de síntese e degradação (Adaptada de STRANGE, 2004)

**Figura 7.** Efeitores envolvidos no processo do RVD e RVI (Adaptada de HOFFMAN et al., 2009)

**Figura 8.** Representação ilustrativa do RVD quando a célula é exposta a um meio hipotônico, e o RVI pós RVD que ocorre caso essa célula seja recolocada em meio isotônico. (Adaptada de OKADA, et al., 2004)

**Figura 9.** Canais de potássio sensíveis ao volume. Marcados em círculo vermelho Canais de potássio: TREK, TASK e TRAAK possuem quatro domínios transmembranares; Kv1 e Kv4 , KCNQ1, KCNQ5 são canais de potássio com seis domínios. BK, IK e SK são canais de potássio dependentes de cálcio de alta, intermediária e baixa condutância. (Adaptada de HOFFMANN et al., 2009)

**Figura 10.** Representação esquemática do ciclo celular. Ilustração de Células humanas (HeLa) apresentando cromossomos em azul, microtúbulos (vermelho) e proteínas (verde) (Retirada de PERDIGÃO & TAVARES, 2008)

**Figura 11.** Hierarquia das células-tronco. (Retirada de SALEM & THIEMERMANN, 2010).

**Figura 12.** Representação esquemática de um corte transversal do cordão umbilical humano, contendo células-tronco mesenquimais. CTMs podem ser isoladas da geléia de Wharton a partir de três compartimentos diferentes; zona perivascular (3), zona intervascular (4) e subamionion (5). (Adaptada de TROYER & WEISS, 2008).

## **LISTA DE TABELAS**

**TABELA 1.** Classificação das células-tronco.

**TABELA 2.** Origem e tipos celulares derivadas das CTMs. (Adaptado de POUNTOS & GIANNOUDIS, 2005).

**TABELA 3.** Marcadores de superfície celular de células-tronco mesenquimais (Adaptado de SALEM E THIEMERMANN, 2010).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC: Transportadores do ATP (do inglês ATP- binding cassette)

ADH: hormônio antidiurético

AE: trocador aniônico (do inglês *anion exchanger*)

AQP: canal de aquaporina

ATP: adenosina trifosfato

AVD: diminuição de volume apoptótica

BK: canal de potássio ativado por cálcio de alta condutância

cAMP: monofosfato de adenosina cíclico

CFTR: fator regulador da condutância transmembrana modificado na fibrose cística (do inglês *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)

CFU-F: unidades formadoras de colônias de fibroblastos

CLC família de canal de cloreto

CT: célula-tronco

CTA: células-tronco adultas

CTE: células-tronco embrionárias

CTH: células-tronco hematopoiéticas

CTMs: células-tronco mesenquimais

DIDS: ácido 4,4' diisotiocianoestilbeno – 2,2' dissulfônico

DNA: ácido desoxirribonucléico

ERK: quinases reguladas por sinais extracelulares

ICM: massa celular interna

IK: canal de potássio ativado por cálcio de condutância intermediária

IPs: células-tronco pluripotentes induzidas

JNKs: C-Jun N-terminal quinases

kDa: Quilo Dalton

KCC: co-transportador  $K^+$ -Cl

KCl: cloreto de potássio

KCNE1/KCNQ1: subfamílias de canal de potássio dependente de voltagem

Kir: canal de potássio de retificação interna (do inglês *Inwardly rectifying potassium channels*)

Kv: canal de potássio dependente de voltagem

Lp: condutividade hidráulica

MAP: proteína cinase ativada por mitógeno

MinK: tipo de canal de potássio (do inglês minimal potassium subunits)

MLC: miosina de cadeia leve (do inglês myosin light chain)

MLCK: Quinase de Cadeia Leve de Miosina (do inglês Myosin light chain kinase)

MMP-9: metalopeptidase-9 de matriz

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase  
NEM: tiol-alquilantes N-etilmaleimida  
NCC: co-transportador  $\text{Na}^+$  -  $\text{Cl}^-$   
NKCC: co-transportador  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  -  $2\text{Cl}^-$   
NHE trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$   
NSC: canais catiônicos não seletivos permeáveis ao  $\text{Na}^+$   
NO: óxido nítrico  
PDGFR: receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas  
PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinase  
RVD: diminuição regulatória do volume  
RVDC: canal regulador da RVD  
RVI: aumento regulatório do volume celular  
SK: canal de potássio ativado por cálcio de pequena condutância  
SLC: Família Carreadora de Solutos 4  
TASK: canal de potássio sensível a ácido  
TNF: fator de necrose tumoral  
TRAAK: canal de potássio sensível ao ácido araquidônico  
TREK: Subfamília de canal de potássio de dois poros  
TauT: carreador de taurina  
VRAC: Canal aniônico regulado por volume ou canal mecano-sensível . (do inglês *Volume Regulated Anion Channel*)  
VSCC: Canal de cloreto sensível ao volume (do inglês *Volume Sensitive Chloride Channel*)  
VSOAC: Canal aniônico sensível a osmólitos orgânicos  
VSOR: Canal aniônico sensível ao volume de retificação externa  
WNKs: Quinases sem lisina (do inglês *With-no-lysin kinases*)

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1 Homeostase do volume celular e a entrada de água nas células.....	16
2.2 Regulação do Volume Celular.....	22
2.3 Mecanismos Reguladores do Volume Celular.....	29
2.3.1 Aumento Regulatório do Volume (RVI).....	30
2.3.2 Diminuição Regulatória do Volume (RVD).....	32
2.3.2.1 Mecanismos de transporte iônico envolvidos na RVD.....	34
a) Co-transportadores KCC.....	34
b) Canais catiônicos.....	35
c) Canais aniônicos sensíveis ao volume.....	37
d) Trocador de ânions $Cl^{-}/HCO_3^{-}$ .....	38
2.4 Como as células detectam a mudança de volume.....	39
2.5 Ciclo Celular.....	44
2.6 Células-tronco, localização e classificações.....	45
2.6.1 Células-tronco mesenquimais.....	51
2.6.2 Células-tronco do cordão umbilical.....	56
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>4. MANUSCRITO.....</b>	<b>58</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>
Anexo A: Parecer do comitê de ética em pesquisa da UFPE.....	90
Anexo B: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	92
Anexo C: Trabalho enviado Congresso Brasileiro de Células-tronco e Terapia Celular....	94
Anexo D: Trabalho enviado a FESBE 2011.....	95

## 1 INTRODUÇÃO

A manutenção constante do volume celular diante de perturbações osmóticas extracelulares e intracelulares é um problema crítico enfrentado pela maioria das células. O volume celular não é apenas uma consequência das funções celulares, mas funciona como sinalizador presente em diversos processos fisiológicos. O processo para o restabelecimento do volume celular após seu aumento é chamado de diminuição regulatória do volume (RVD - *Regulatory Volume Decrease*) (STRANGE et al., 1994; OKADA et al., 1997; WALKER et al., 1999). Esse processo tem atraído de forma especial o interesse de alguns cientistas devido a sua importância na regulação do volume celular, no controle da diferença de potencial elétrico transmembrana, na homeostase do pH e no transporte de osmólitos orgânicos e aminoácidos. É também relevante na diferenciação celular, proliferação celular, apoptose e metabolismo celular (PASANTES-MORALES & MORALES-MULIA, 2000; OKADA & MAENO, 2001; WANG et al., 2002; KURBANNAZAROVA et al., 2003; LI & DENG, 2011). Um dos mecanismos pelo qual uma célula pode realizar a RVD envolve a perda de potássio e cloreto através de seus canais iônicos (OKADA, 2004; HOFFMAN et al., 2009), bem como a perda de grandes solutos orgânicos zwitteriônicos como glutamato, aspartato e taurina (KIRK, 1997; LANG et al., 2007). A ativação concomitante dos canais de potássio ou cloreto foi detectada durante a progressão do ciclo celular (VILLAZ et al., 1995; DA SILVA et al., 2010).

Mudanças na permeabilidade da membrana são observadas ao longo do ciclo celular. Alterações na proliferação celular referentes a transtornos nos processos de regulação já foram observadas em células Vero (DA SILVA et al., 2010); células de Schwann, linfócitos, fibroblastos, entre outros (PREMACK et al., 1991; WILSON et al., 1993). Deste modo nota-se que mudanças na atividade dos canais iônicos são capazes de modular a progressão das células através do ciclo celular e que a expressão de canais de potássio se altera durante as fases do ciclo celular (MACFARLANE et al., 2000), portanto, sabemos que podem ocorrer alterações na continuidade do ciclo celular devido a bloqueios de canais e transportadores iônicos envolvidos no mecanismo de RVD em diferentes tipos celulares. Em células cancerosas, o papel dos canais iônicos na regulação do volume celular já foi bem documentado e mostrou que existe uma relação entre sua atividade e a proliferação celular (OUADID-AHIDOUCH & AHIDOUCH, 2008).

Não há informação sobre o mecanismo da regulação do volume em células-tronco mesenquimais. Portanto, neste trabalho estudou-se por meio de inibidores e bloqueadores específicos, o papel de canais (catiônicos e aniônicos) e transportadores iônicos atuantes na

RVD das células-tronco mesenquimais obtidas da geléia de Wharton do cordão umbilical humano.

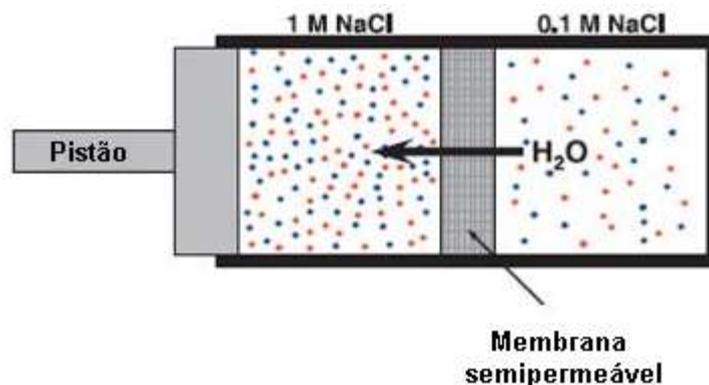
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Homeostase do volume celular e a entrada de água nas células

A água corresponde a 70% ou mais da massa da maioria dos organismos. Deste modo, a água é o maior componente em quantidade nas células e tecidos humanos, o que também é verdadeiro para todos os outros organismos e plantas (AGRE & KOZONO, 2003).

Essa concentração é significativamente maior do que a de outras substâncias, chegando a cerca de 56mol/l nos fluidos biológicos dos mamíferos. Este fato torna a água um caso à parte quando estudamos o transporte de substâncias através das membranas biológicas (PROCOPIO-ARAÚJO, 1999).

A movimentação da água através de uma membrana semipermeável é chamada de osmose. Considere uma membrana semipermeável ideal, como aquela que é permeável apenas à água. Se tal membrana separa soluções com diferentes concentrações de soluto, por exemplo, 0,1M NaCl de um lado e 1M NaCl do outro lado, haverá uma transferência efetiva da água da solução mais diluída para a mais concentrada (**FIGURA 1**). O fluxo resultante da água apenas cessará quando as concentrações de NaCl em ambas as soluções forem equivalentes.



**FIGURA 1.** Fluxo osmótico através de uma membrana semipermeável. A seta indica a direção do fluxo resultante, de uma solução com menor concentração do soluto, ou seja, 0,1 M NaCl, para uma de maior concentração (1 M NaCl). Se existir uma pressão aplicada à esquerda da câmara através de um pistão, haverá uma redução no fluxo de água. A pressão necessária para impedir o fluxo da água, é denominada pressão osmótica (Equação 1 abaixo) (Adaptada de STRANGE, 2004).

A transferência efetiva da água através da membrana pode ser evitada aplicando-se uma força hidrostática (**FIGURA 1**). Já a pressão requerida para impedir o transporte do solvente através da membrana é chamada de pressão osmótica, que sob condição de equilíbrio, é definida através da expressão matemática de Boyle Van't Hoff:

**Equação 1:**  $\Delta\pi = RT\Delta C_i$

Onde,  $\Delta\pi$  é a diferença de pressão osmótica, R é a constante dos gases perfeitos, T é a temperatura absoluta e  $\Delta C_i$  é a diferença na concentração do soluto através da membrana (OKADA, 2004; STRANGE, 2004; HOFFMANN et al., 2009).

A pressão osmótica depende da concentração total de partículas de soluto dissolvidas. A osmolaridade é a propriedade atribuída às soluções para quantificar essa concentração, em número de moles de partículas osmoticamente ativas (ou seja, verdadeiramente dissolvidas na água) por litro da solução, sendo expressa por:

**Equação 2:**  $Osmolaridade = C_i \phi i$

Onde,  $C_i$  indica a concentração molar da solução,  $\phi$  indica o coeficiente osmótico e  $i$  indica o número de partículas osmoticamente ativas por molécula do soluto. Considerar o número de partículas osmoticamente ativas significa dizer, por exemplo, que se a solução possui um mol de glicose por litro, molécula que não se dissocia, ela possuirá também 1 Osmolar, mas se a solução possui uma molécula que se dissocia em dois ou três íons, como NaCl, ou  $Na_2SO_4$ , então uma solução contendo 1 molar vai ter uma concentração de 2 ou 3 osmolares, respectivamente.

O coeficiente osmótico é um fator inerente a cada soluto, que é introduzido para corrigir desvios na osmolaridade causados por interações específicas da molécula dissolvida, e é desprezado muitas vezes por questões práticas (GUYTON & HALL, 2006; PROCOPIO-ARAÚJO, 1999).

Normalmente todas as membranas biológicas são permeáveis a vários solutos. Enquanto muitos solutos biologicamente relevantes têm permeabilidades substancialmente menores que a água e se comportam como se fossem efetivamente impermeável, alguns solutos têm permeabilidades próximas a da água. Estes solutos de alta permeabilidade difundem através da membrana diminuindo seu gradiente de concentração. Assim, a pressão osmótica que direciona o fluxo de água é reduzida. Se o movimento de soluto é rápido o suficiente, as concentrações do soluto nos dois lados da membrana pode se tornar equivalentes antes que ocorra um fluxo de água osmoticamente significativo. Para explicar o comportamento não ideal de membranas, (STAVERMAN,1951) definiu o termo coeficiente de reflexão para o soluto  $i$ ,  $\sigma_i$ , onde  $\Delta\pi_e$  é a pressão osmótica experimental e  $\Delta\pi_t$  é a pressão osmótica teórica obtida através da equação 1.

**Equação 3:**  $\sigma_i = \Delta\pi_e / \Delta\pi_t$

O coeficiente de reflexão é um termo adimensional que varia de 1 para o soluto que se comporta como se fosse efetivamente impermeável (ou seja, o soluto é “refletido” pela membrana, para 0, no caso de um soluto cuja permeabilidade seja igual à da água). A pressão osmótica efetiva através da membrana gerada pelo soluto  $i$  é, portanto:

**Equação 4:**  $\Delta\pi_{ef} = \sigma_i \cdot R \cdot T \cdot \Delta C_i$

O fluxo através de uma membrana permeável apenas ao solvente, ou seja, uma membrana semipermeável ideal é definida por:

**Equação 5:**  $J = L_p (\Delta P - \Delta\pi)$

Onde,  $J$  representa o fluxo resultante,  $L_p$  é chamado de condutividade hidráulica da membrana e corresponde à permeabilidade da membrana à água,  $\Delta P$  é a diferença entre as pressões hidrostáticas dos dois lados da membrana e  $\Delta\pi$  é a diferença entre as pressões osmóticas das duas soluções. Entretanto, as membranas biológicas não exibem esse comportamento ideal, permitindo também a passagem de solutos, assim o fluxo pode ser representado pela seguinte equação:

**Equação 6:**  $J_v = L_p (\sigma_i \Delta\pi_{th} - \Delta P)$  ou  $J = L_p \Delta P - \sigma RT \Delta C_s$

O fluxo de água na maioria das membranas biológicas ocorre por difusão simples das moléculas de água através da bicamada lipídica. Em uma membrana celular, composta de uma bicamada lipídica e proteínas transmembranares, a permeabilidade à água é de  $10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ , porém nas células animais observamos uma permeabilidade que pode chegar a  $10^{-4} \text{ m s}^{-1}$  devido à presença, além de proteínas de membrana, tais como canais e transportadores, de canais próprios para a passagem de água, denominados de aquaporinas (AGRE & KOZONO, 2003), que aumentam drasticamente a permeabilidade à água nas membranas celulares, portanto, a permeabilidade à água na membrana biológica é muito maior que a permeabilidade dos íons e dos principais não eletrólitos (como uréia e glicerol) (FÜRST et al., 2002; OKADA, 2004).

A osmolaridade do meio extracelular nos animais apresenta variações controladas, de forma que mudanças significativas na osmolaridade plasmática estão associadas com uma variedade de estados patológicos (OKADA, 2004; HOFFMANN et al., 2009). A concentração do meio intracelular é aproximadamente 300 mOsm em células de mamíferos.

A pressão osmótica causada por 1 mOsm a 37° C é de 19,3 mmHg, então para a concentração de 300 mOsm a pressão osmótica deveria ser de 5790 mmHg. O valor experimental para essa pressão nos fluidos corporais é, entretanto cerca de 5500 mmHg. Essa pequena diferença ocorre devido à interação entre as partículas que compõem esses fluidos (GUYTON & HALL, 2006).

Quando a osmolaridade extracelular é maior que a intracelular, a concentração de água é, portanto maior no meio intracelular causando um fluxo de água para fora da célula. Se, ao contrário, a osmolaridade intracelular é maior que a extracelular, ocorre um fluxo de água para dentro da célula, causando o fenômeno chamado de turgescência. Ambos os fenômenos causam alterações no volume celular. Durante a plasmólise, as células expostas então a um meio hipertônico, apresentam redução de volume, enquanto durante a turgescência, quando as células estão expostas a um meio hipotônico, as células apresentam aumento do volume.

Essa alteração de volume apresentada pelas células quando expostas a um choque osmótico, graças ao ganho ou perda de água para o meio extracelular, pode ser obtida em função da pressão osmótica através das relações a seguir.

Substituindo  $C_i$  por  $\phi_i Q_i/V$  na equação 1, teremos:

$$\text{Equação 7: } \pi = RT \sum \phi_i Q_i / V$$

Podemos então reescrever a equação 7 da seguinte forma:

$$\text{Equação 8: } \pi V = RT \sum \phi_i Q_i$$

Quando a célula é submetida a uma pressão osmótica inicial  $\pi_0$  e em seguida é transferida para um meio de pressão osmótica  $\pi$ , sem que a osmolaridade intracelular e a temperatura sejam alteradas, ou seja, o valor de  $RT \sum \phi_i Q_i$  não se modifica, temos que:

$$\text{Equação 9: } \pi V = \pi_0 V_0$$

Porém, para células vivas, como existem espaços na membrana que são inacessíveis para a água (a razão entre o volume osmoticamente ativo da célula e o volume total é de 0,7 a 0,9) (HOFFMANN et al., 2009), o volume inativo é representado então por  $b$  na equação seguinte:

$$\text{Equação 10: } \pi (V - b) = \pi_0 (v_0 - b) \text{ ou } V = \pi_0 (v_0 - b) / \pi + b$$

Podemos utilizar essa equação para fazer estimativas da mudança de volume da célula quando exposta a variações da pressão osmótica, já que o volume e a pressão osmótica são inversamente proporcionais (OKADA, 2004; HOFFMANN et al., 2009).

Em células que apresentam pouca regulação de volume e uma membrana bastante permeável à água, essa relação foi verificada experimentalmente com sucesso. As células expostas a 50% da osmolaridade isotônica apresentam um aumento de volume de cerca de duas vezes o volume inicial, se comportando nesse momento como previsto teoricamente pela relação de Van't Hoff (MORISHIMA et al., 2000). Dessa forma, as células apresentam um comportamento semelhante ao de um osmômetro: quando há alterações na osmolaridade, a célula apresenta uma mudança de volume devido à entrada ou saída de água, que varia proporcionalmente a essas alterações.

Para prevenir a ruptura pela pressão osmótica, células animais possuem normalmente pequenos dobramentos ou invaginações na membrana plasmática, incluindo microvilosidades, que se desfazem após aumento do volume celular de forma a não aumentar significativamente a tensão na membrana. O excesso de água dentro da célula pode causar um aumento de volume que ultrapasse a capacidade elástica da membrana, o que pode levar ao seu rompimento e morte celular (OKADA, 2004).

Mudanças de volume celular são geralmente agrupados em duas grandes categorias: anisosmóticos e isosmóticos. Alterações de volume (anisosmótico) são induzidas por alterações na osmolaridade extracelular. Em condições fisiológicas, a maioria das células de mamíferos, com algumas exceções notáveis (por exemplo, as células da medula renal e do trato gastrointestinal), é protegida contra variações de volume pela regulação precisa da osmolalidade plasmática pelos rins (LANG, et al., 2007).

Mudanças de volume isosmótica são provocadas por alterações no conteúdo do soluto intracelular. Em condições de estado estacionário, os níveis intracelulares de soluto são mantidos constantes por um balanço preciso entre o influxo e efluxo através da membrana plasmática, e também pela produção metabólica e remoção das substâncias osmoticamente ativas.

Diversas condições patológicas estão associadas a alterações osmóticas como, por exemplo:

- Isquemia, hipóxia, hipotermia e epilepsia – Associadas a um aumento da osmolaridade intracelular;
- Cirrose hepática, nefrose, mixedemas, hiponatremia – Associadas a uma diminuição da osmolaridade do plasma;

- Diarréia, consumo excessivo de álcool, diabetes mellitus e insipidus, hiperglicemia, uremia – Associadas a um aumento da osmolaridade plasmática (LANG et al., 1998; OKADA, 2004; LANG et al., 2007; PASSANTES-MORALES, 2007; HOFFMANN et al., 2009).

Como vimos, a maioria das células são banhadas por um líquido extracelular isotônico. Na medula renal do ser humano, no entanto, a osmolaridade extracelular pode se aproximar de 1400 mosmol/l (LANG, 2007). Além disso, a osmolaridade extracelular pode mudar em menos de uma hora de um valor elevado para próximo da isotonicidade, durante a transição de antidiurese a diurese. Assim, as células da medula renal têm que lidar com rápidas mudanças de osmolaridade extracelular. Em menos de 1 minuto, células sanguíneas passando através da medula renal são expostas a alta osmolaridade medular e retornam às condições isosmóticas do sistema sanguíneo.

A absorção de nutrientes pode levar a condições anisosmóticas, que causam geralmente a pequenas alterações na osmolaridade sanguínea. Hepatócitos são exemplos de células que sofrem alterações moderadas na sua osmolaridade, ingestão de água, as células do fígado “incham” e tamponam as alterações da osmolaridade sanguínea.

Outros tecidos são expostos a moderadas alterações de osmolaridade extracelular durante condições de hiponatremia (diminuição da concentração de íons  $\text{Na}^+$  no sangue) ou hipernatremia (aumento da concentração de íons  $\text{Na}^+$  no sangue).

A hiponatremia está associada com alterações na osmolaridade extracelular, dependendo da concentração de substâncias orgânicas osmoticamente ativas que podem atingir concentrações excessivas no sangue (LANG et al., 1998; HOFFMAN et al., 2009).

Pode ocorrer devido à ingestão excessiva de água por via oral ou através da eliminação renal de água. Além disso, a hiponatremia pode ocorrer devido a um déficit de  $\text{Na}^+$  resultante da perda renal ou extra renal (LANG et al., 2007). A hiponatremia não está necessariamente associada com hipoosmolaridade, podendo também ocorrer em estados isosmótico ou mesmo em estado hiperosmótico (por exemplo, na ingestão excessiva de álcool), hiperglicemia do diabetes mellitus não controlado, ou estado hipercatabólicos (tais como queimaduras, pancreatite e síndrome de esmagamento - também denominada de Síndrome da Compressão Muscular).

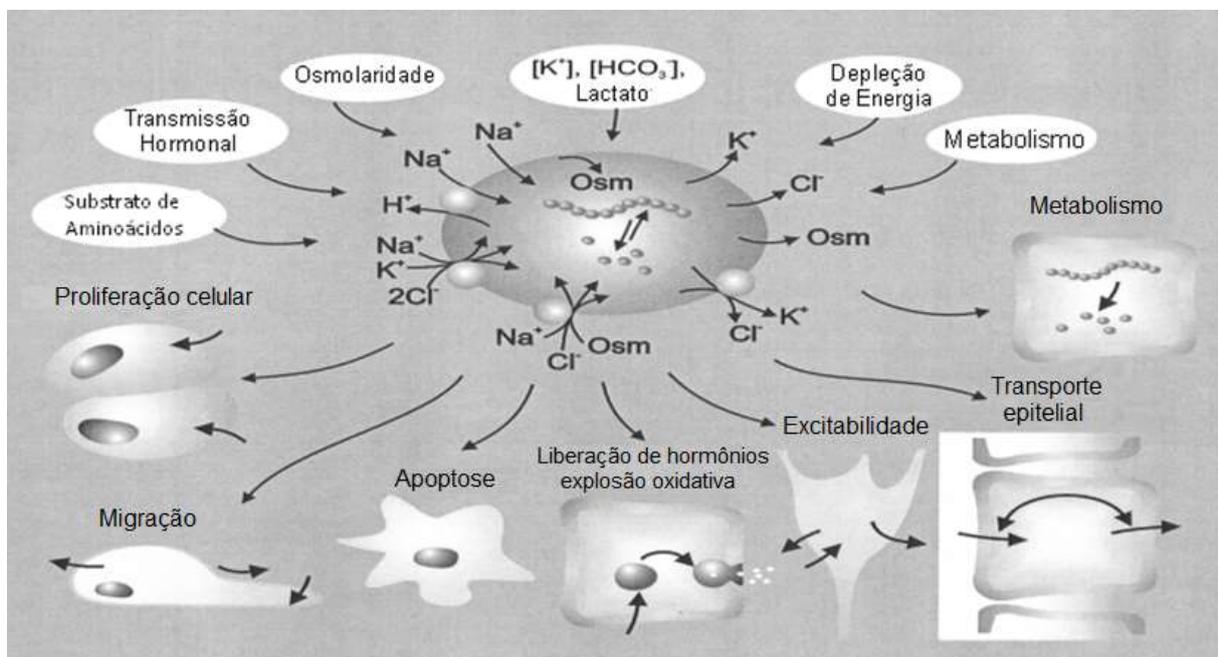
A hipernatremia pode resultar de uma ingestão excessiva de sal de cozinha, retenção renal de  $\text{Na}^+$  e/ou perda renal ou extrarrenal de água. Durante a hipernatremia, a osmolaridade extracelular é aumentada. Sais de sódio principalmente o  $\text{NaCl}$ , normalmente contribuem com mais de 90% da osmolaridade extracelular e assim hipernatremia é necessariamente paralela a

um aumento da osmolaridade extracelular. Assim sendo, células animais possuem mecanismos fisiológicos pelos quais elas sentem as mudanças no volume celular e regulam seu volume diminuindo o impacto provocado pela entrada ou saída de água em excesso nas células, conforme veremos adiante.

## 2.2 Regulação do volume celular

Cada tipo de célula animal possui um volume apropriado, e alterações nesse volume devido à entrada ou saída excessiva de água podem causar diversos problemas para a célula, conforme já comentado anteriormente.

Alterações no volume celular, por sua vez, servem como sinalizadores de forma a modular uma variedade de respostas celulares e alterar processos celulares importantes, mesmo que nenhum dano imediato seja causado (VAN DER GEER et al., 2004). Mesmo em condições constantes de osmolaridade do meio extracelular, as células apresentam variações de volume fisiológicas, devido à sua própria atividade, que altera constantemente a osmolaridade intracelular. Casos em que isso pode ocorrer estão principalmente relacionados ao metabolismo celular, mudanças no transporte transepitelial, atividade neuronal e a atividade hormonal, entre outros processos (OKADA, 2004; HOFFMANN et al., 2009; LANG et al., 2007) (FIGURA 2).

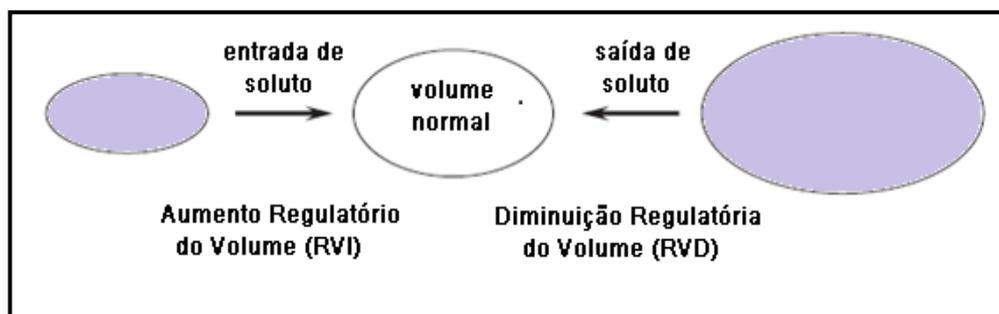


**FIGURA 2.** Significado funcional do volume celular (Adaptada de LANG, 2007).

O volume celular pode interferir em processos fisiológicos como a síntese de glicogênio, a glicogenólise nos hepatócitos, a glicólise nos músculos, a secreção de bile, a lipogênese e a respiração nas células da glia (LANG et al., 1998).

Apoptose celular, por exemplo, está associada com uma diminuição no volume celular e esta é denominada diminuição apoptótica de volume (AVD - Apoptotic Volume Decrease) que precede a liberação do citocromo C, ativação de caspases, fragmentação do DNA e eventual morte celular, sendo assim o AVD é um pré-requisito essencial para indução de apoptose (MAENO et al., 2000; OKADA & MAENO, 2001; SHIMIZU et al., 2006). Já na morte celular por necrose é observado um aumento do volume celular (OKADA, 2004).

A maioria das células é capaz de restaurar seu volume original quando confrontado com aumento ou diminuição do volume celular (O'NEILL, 1999; WEHNER et al., 2003). A maioria das células responde ao aumento ou diminuição do volume ativando transportadores específicos de membrana e/ou processos metabólicos que servem para que as células retornem ao seu volume normal. Assim canais e transportadores de membrana são rapidamente ativados para responder a essas mudanças de osmolaridade intra e extracelular possibilitando a passagem de osmólitos que tanto podem ser inorgânicos (íons) quanto de pequenas moléculas orgânicas. Com a passagem de osmólitos, ocorre obrigatoriamente a passagem de água para dentro ou para fora da célula, regulando assim seu volume (HOFFMANN & SIMONSEN, 1989). Os processos pelo qual as células “inchadas” ou “encolhidas” retornam ao seu volume inicial são denominados RVD (do inglês *Regulatory Volume decrease* – que significa “diminuição regulatória do volume”) e RVI (do inglês *Regulatory Volume increase* – que significa “aumento regulatório do volume”), respectivamente (FRIEDRICH et al., 2006). **(FIGURA 3).**



**FIGURA 3.** Representação esquemática dos mecanismos regulatórios do volume em resposta a perturbações no volume. Perda e ganho de solutos reguladores do volume são denominados de diminuição regulatória do volume (RVD) e aumento regulatório do volume (RVI), respectivamente. O decurso de RVD e RVI varia de acordo com o tipo celular e condições experimentais. Tipicamente, contudo, RVI é mediado pelo ganho de eletrólitos e RVD pela perda de eletrólitos e osmólitos orgânicos ocorrendo durante um período de minutos. (Adaptada de STRANGE, 2004).

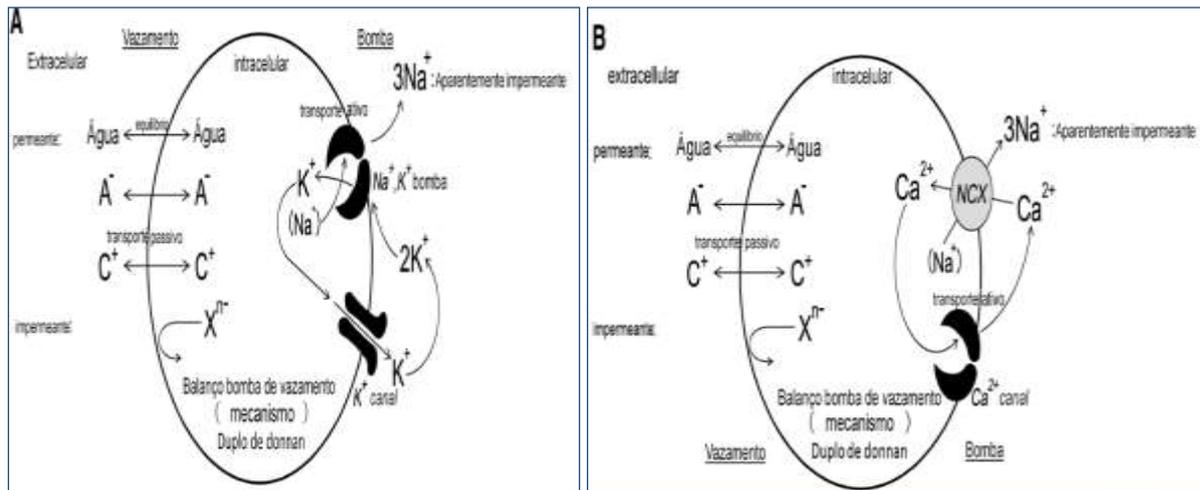
O aumento da osmolaridade das células devido à entrada de substâncias por transporte acoplado ao sódio é regulado através da ativação dos canais de potássio, sendo estes então essenciais para a manutenção do volume celular e para a própria formação do potencial elétrico favorável ao transporte epitelial. As concentrações extracelulares de potássio são fundamentais para o disparo de potenciais de ação em neurônios e para a contração de células musculares. Assim, a regulação de volume também influencia a excitabilidade e a função de células neuronais e do tecido muscular (LANG et al., 1998).

Mesmo em condições isotônicas, processos de regulação de volume precisam ocorrer constantemente. Isso acontece porque dentro da célula há um grande número de ânions macromoleculares polivalentes ( $X^{n-}$ ) carregados negativamente (70% das proteínas), impermeáveis à membrana, que não causam um aumento significativo da osmolaridade intracelular por si, entretanto, são responsáveis por atrair uma grande quantidade de cátions para dentro da célula. Estas cargas negativas atraem os cátions inorgânicos permeáveis à membrana ( $C^+$ ) para o citosol, e o gradiente de concentração para os ânions inorgânicos permeáveis à membrana ( $A^-$ ) também direciona os ânions para o citosol. Desta forma, estes cátions e ânions podem se distribuir entre o meio intra e extracelular de acordo com o **Equilíbrio de Gibbs - Donnan** (que estabelece que o produto das concentrações de íons difundíveis é igual nos dois lados da membrana) e a eletroneutralidade (que estabelece que a soma das cargas positivas deva ser igual à soma das cargas negativas) (Equação 11). Deste modo, a concentração de íons no citosol seria necessariamente maior que no meio extracelular. A entrada desses íons seria necessariamente acompanhada de uma entrada de água e um aumento do volume celular.

$$\text{Equação 11: } [C^+]_{in} \times [A^-]_{in} = [C^+]_{ext} \times [A^-]_{ext}$$

Entretanto, a concentração intracelular dos íons inorgânicos precisa ser menor do que a concentração extracelular para contrabalancear o acúmulo celular de substâncias orgânicas. Para que essa entrada de água não cause alterações no volume celular, a célula precisa perder cátions para o meio extracelular. Essa extrusão de íons positivos ocorre através de transporte ativo (bombas) (OKADA, 2004; HOFFMANN et al., 2009). Na maioria das células animais, a bomba que desempenha essa função é a bomba de sódio potássio ( $Na^+/K^+$ -ATPase) que opera contra o gradiente eletroquímico dos íons  $Na^+$  e  $K^+$ , onde três íons sódio são colocados para fora da célula e dois íons  $K^+$  para dentro da célula (**FIGURA 4**).

Células que não possuem esse tipo de transporte utilizam para esta função a bomba de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase). Neste caso, ocorre paralelamente o transporte passivo de cálcio através do antiporte de cálcio e sódio. O contra transportador leva três íons  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular e um íon  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular, e a bomba serve para “reciclar” esses íons cálcio (OKADA, 2004) (**FIGURA 4**).



**FIGURA 4.** Representação esquemática da regulação de volume em estado estacionário sob condições isotônicas pelo mecanismo “Duplo Donnan” através da  $\text{Na}^+ \text{K}^+ / \text{ATPase}$  na maioria dos tipos celulares (**A**) e via  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+} \text{ATPase}$  em tipos celulares tais como eritrócitos de gato ou de cachorro (**B**) (Adaptada de OKADA, 2004).

A membrana celular é menos permeável ao  $\text{Na}^+$  do que ao  $\text{K}^+$ . O gradiente químico direciona  $\text{K}^+$  para fora da célula através dos canais de  $\text{K}^+$ . O movimento de saída de  $\text{K}^+$  gera uma diferença de potencial negativo através da membrana celular que então direciona  $\text{Cl}^-$  para o espaço extracelular. Em um potencial de membrana de  $-18\text{mV}$  e uma concentração extracelular de  $\text{Cl}^-$  de  $110\text{ mmol/l}$ , a concentração intracelular de  $\text{Cl}^-$  é de  $55\text{mmol/l}$  em equilíbrio eletroquímico. Assim, neste potencial de membrana a distribuição desigual de  $\text{Cl}^-$  permitiria o acúmulo de cerca de  $55\text{ mmol/L}$  de substâncias orgânicas. A baixa concentração intracelular de  $\text{Cl}^-$  é compensada pelo excesso de substâncias orgânicas intracelulares. Na maioria das células, a diferença de potencial através da membrana é mais negativa que  $-18\text{mV}$  e a concentração intracelular de  $\text{Cl}^-$  inferior a  $55\text{mmol/l}$ .

O funcionamento da bomba  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ , portanto, o estabelecimento dos gradientes iônicos requer transformação de energia. A depleção de energia prejudica a função da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , dissipa os gradientes do  $\text{Na}^+$  e do  $\text{K}^+$ , despolariza a membrana e leva ao acúmulo de  $\text{Cl}^-$  e assim ao inchaço celular (LANG et al., 1998). Durante a isquemia, o inchaço é agravado por um aumento na concentração de  $\text{K}^+$  extracelular, o que dissipa o gradiente de  $\text{K}^+$ . Além disso, a formação excessiva e a redução do *clearance* do lactato levam a acidose celular, o que aumenta a atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , e assim, aumenta o acúmulo celular de  $\text{Na}^+$  e favorece ainda mais ao inchaço da célula. No cérebro, a despolarização desencadeia a liberação de glutamato, o que ativa os canais catiônicos não específicos e assim induz ao edema celular. A energia requerida para manutenção do gradiente iônico e constância do volume celular depende da taxa/nível de entrada de  $\text{Na}^+$  (LANG et al., 1998). Em teoria, uma célula completamente impermeável aos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  apresenta um equilíbrio que não requer consumo de energia para manter a constância do volume celular.

A inibição da bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  com ouabaína eventualmente leva ao inchaço da célula devido a dissipação dos gradientes de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , despolarização da membrana e subsequente entrada de  $\text{Cl}^-$  nas células (LANG et al., 1998), contudo, a inibição de  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase nem sempre leva a um aumento rápido do volume celular que pode permanecer constante ou mesmo em uma diminuição transitória. Uma sequência de eventos que leva as células diminuírem seu volume após inibição  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase incluem aumento da atividade de  $\text{Na}^+$  intracelular, trocador reverso de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$ , aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^+$ , subsequente ativação de canais de potássio sensíveis a  $\text{Ca}^{+2}$ , e, hiperpolarização, apesar da diminuição da concentração de  $\text{K}^+$  intracelular.

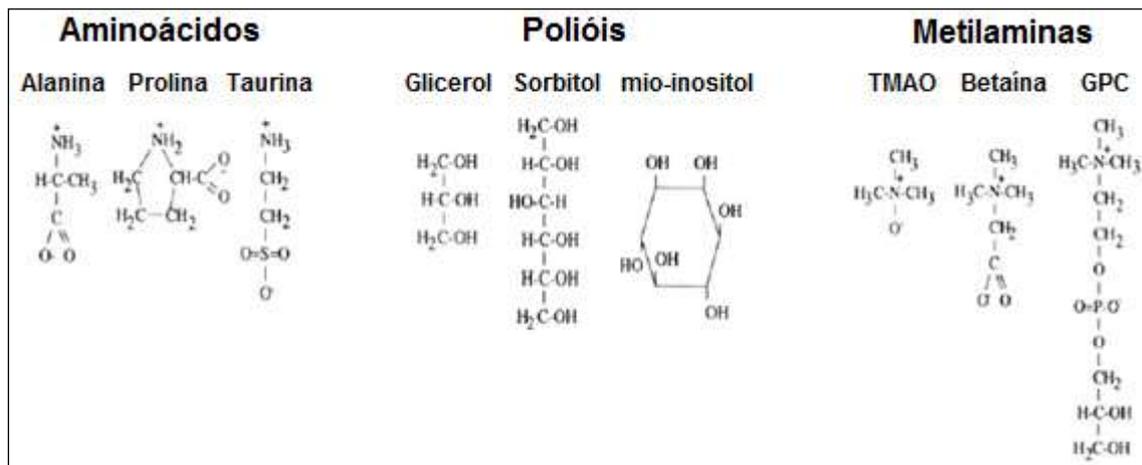
Sob influência da ouabaína, hepatócitos e células renais corticais são aparentemente

capazes de manter seu volume pelo acúmulo de eletrólitos em vesículas intracelulares que são subsequentemente expelidas por exocitose. O acúmulo de eletrólitos é realizado pela  $H^+$ -ATPase em paralelo aos canais de  $Cl^-$  (LANG et al., 1998; HOFFMAN et al., 2009). Teoricamente, a  $H^+$ -ATPase na membrana plasmática pode manter o volume celular pela criação de um potencial de membrana negativo através da membrana celular, direcionando a extrusão de  $Cl^-$ .

Para manter suas funções metabólicas, as células acumulam um grande número de substâncias, tais como proteína, aminoácidos ou metabólitos de carboidratos. A concentração destas substâncias é maior dentro das células do que no fluido extracelular. O excesso da concentração celular destas substâncias orgânicas é contrabalanceado pela baixa concentração iônica intracelular conforme visto acima.

Em células animais, osmólitos orgânicos são agrupados em três classes distintas:

- 1) Polióis (por exemplo, sorbitol e mio-inositol);
- 2) Os aminoácidos e respectivos derivados (por exemplo, taurina, alanina e prolina);
- 3) Metilaminas (por exemplo, a betaína, glicerofosforilcolina) (**FIGURA 5**).

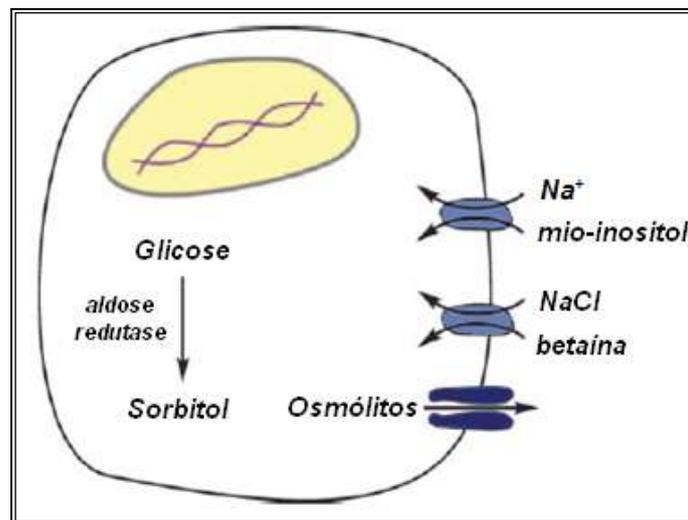


**FIGURA 5.** Estrutura química das principais classes de osmólitos orgânicos em células animais (Adaptada de LANG et al., 2007).

Alguns destes osmólitos liberados pelas células durante a exposição a um meio hipotônico, como a taurina, o glutamato e o aspartato, desempenham papel como neurotransmissores no cérebro (PASANTES-MORALES, 2007; HOFFMAN, et al., 2009).

O acúmulo de osmólitos orgânicos reguladores do volume é tipicamente um processo lento comparado à absorção de eletrólitos e requer muitas horas após início da ativação. Este curto período de tempo observado se deve a ativação das vias de acúmulo de osmólitos orgânicos que usualmente requer transcrição e tradução de genes codificadores dos

transportadores de osmólitos orgânicos e enzimas sintetizadoras. A perda de osmólitos orgânicos parece primeiramente ser mediada em grande parte por mecanismos de efluxo passivo. Essa ativação ocorre tipicamente dentro de segundos após iniciado o inchaço celular (KIRK & STRANGE, 1998) (FIGURA 6). A baixa regulação da síntese de osmólitos orgânicos e os mecanismos de captação também contribuem para a perda dos solutos destas células. Em geral, este processo é lento. O inchaço celular inibe a transcrição dos genes que codificam os transportadores de osmólitos orgânicos e enzimas de síntese. Como diminui a transcrição, há uma queda nos níveis de mRNA e o número de proteínas funcionais declinam durante um período de muitas horas a dias.



**FIGURA 6.** Representação esquemática dos mecanismos de acúmulo e perda de osmólitos orgânicos. O acúmulo de osmólitos orgânicos reguladores do volume em células animais é mediado em grande parte por mudanças na atividade dos transportadores de membrana acoplada ao  $\text{Na}^+$  e por alterações nas taxas de síntese e degradação (Adaptada, STRANGE, 2004).

As funções celulares estão acopladas a alterações no metabolismo ou nos sistemas de transporte da membrana. Tanto o anabolismo (síntese) ou catabolismo (degradação), especialmente de macromoléculas, causam perturbação osmótica por causa de uma mudança no número total de osmólitos celulares. Em células do fígado, os hormônios que regulam o metabolismo podem induzir as células a mudanças de volume, e vice-versa (LANG et al., 1998; HOFFMAN et al., 2009).

Um bom exemplo seria o de hepatócitos, que apresentam alterações na quantidade de partículas presentes no seu interior quando são estimulados por hormônios como a insulina e o glucagon. Quando há o estímulo do glucagon, essas células hidrolisam o glicogênio transformando-o em várias moléculas de glicose e aumentando a osmolaridade intracelular. Já quando são estimuladas para síntese de glicogênio, elas apresentam uma consequente

diminuição da osmolaridade (JENTSCH et al., 2002). Da mesma forma, as células apresentam alterações osmóticas e de volume quando há secreção, absorção de nutrientes, ou ainda quando estão entrando na fase S da mitose, situação em que estão com volume bastante aumentado (OKADA, 2004).

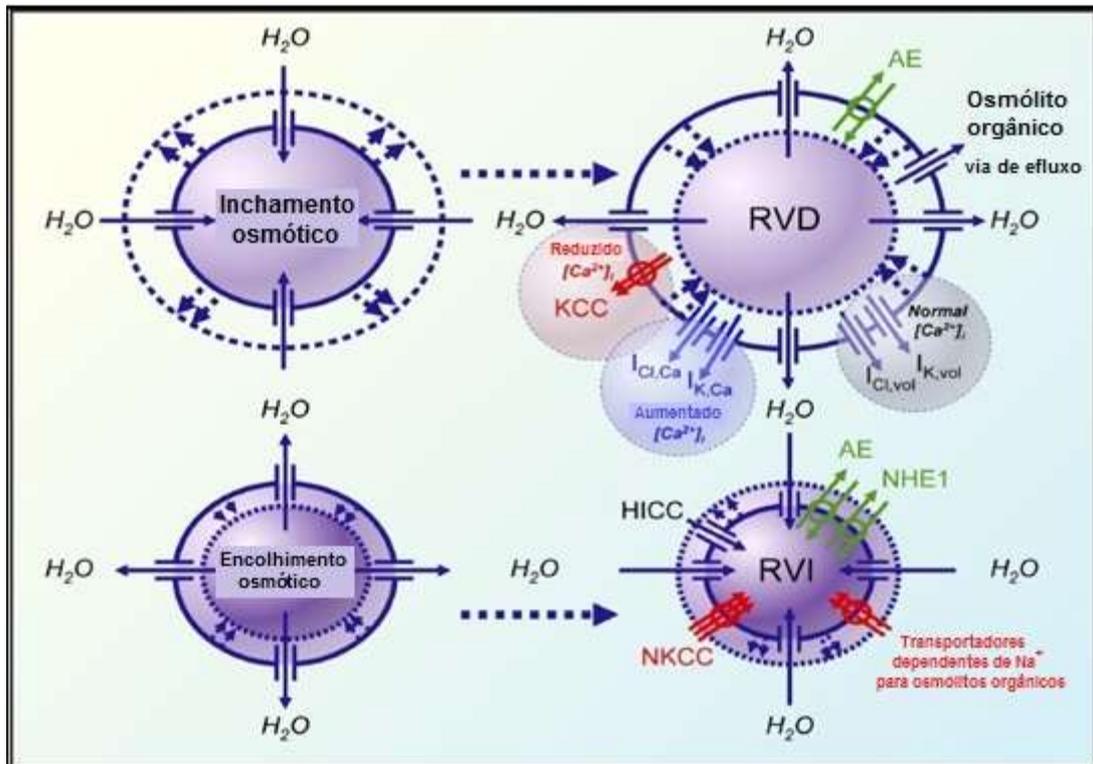
Ainda podem ocorrer mudanças na osmolaridade extracelular fisiologicamente, como no caso das células epiteliais intestinais e das células sanguíneas que são expostas a uma baixa osmolaridade extracelular após a ingestão de água, e nas células medulares renais que são expostas a uma osmolaridade extracelular bastante elevada durante a antidiurese (LANG et al., 1998; HOFFMANN et al., 2009).

Nota-se que as células em diversas funções celulares ativam os mecanismos regulatórios do volume celular de maneira a evitar o impacto de entrada ou saída de água nas células.

### **2.3 Mecanismos reguladores do volume celular**

O volume celular pode ser regulado tanto pelo ganho ou perda de solutos osmoticamente ativos, principalmente íons inorgânicos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , ou por pequenas moléculas orgânicas chamadas osmólitos orgânicos. Durante a regulação do volume, a perda ou ganho de eletrólitos são mediados principalmente através de transportadores de membrana (LANG et al., 1998; JANÁČEK & SIGLER; 2000; FÜRST et al.; 2002; FRIEDRICH, 2006; LAMBERT, 2008).

Na maioria das células animais, a diminuição regulatória do volume ocorre através da perda de KCl via ativação de canais sensíveis a  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  ou pela ativação do co-transportador de KCl. O aumento regulatório do volume ocorre pela entrada na célula tanto de KCl, quanto NaCl. O acúmulo destes sais é provocado pela ativação dos trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  ou através do co-transportador Na-K-2Cl. **A FIGURA 7** ilustra os mecanismos regulatórios do volume celular (RVI e RVD), assim como os sistemas de transporte iônicos comumente envolvidos. A ativação destas vias de transportes é rápida e ocorre dentro de segundos a minutos após perturbação do volume.

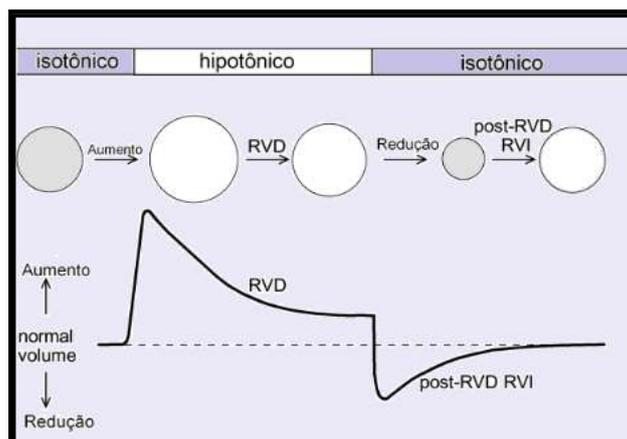


**FIGURA 7.** Efeitores envolvidos no processo do RVD e RVI (Adaptada de, HOFFMAN et al., 2009).

Quando há um retorno da célula para uma situação isotônica logo após o RVD ou o RVI, a célula pode apresentar uma ligeira diminuição ou aumento imediato de volume, a ser corrigido com um novo processo regulatório oposto, esse processo secundário é chamado de RVI pós-RVD ou de RVD pós-RVI, respectivamente (OKADA, 2004) (FIGURA 8).

### **2.3.1 Aumento regulatório do volume – RVI**

O mecanismo de RVI ocorre fundamentalmente através do aumento da permeabilidade da membrana à entrada de cloreto e sódio nas células (SHIMIZU et al., 2006). Essa entrada induz a passagem de água para o meio intracelular, aumentando o volume da célula. Além da entrada de íons ser aumentada durante o RVI, a saída de íons também é inibida (LANG et al., 1998). Em alguns tipos de célula, apenas o RVI pós-RVD é apresentado, indicando um efeito do RVD favorável ao RVI. Como o RVD influencia no RVI é algo ainda desconhecido. Entre as possibilidades estão: através da diminuição da concentração de cloreto no citoplasma, através de alterações causadas no citoesqueleto, ou através da inserção na membrana de canais envolvidos no RVI durante o RVD (LANG et al., 1998; OKADA, 2004) (FIGURA 8).



**FIGURA 8.** Representação ilustrativa do RVD quando a célula é exposta a um meio hipotônico, e o RVI pós RVD que ocorre caso essa célula seja recolocada em meio isotônico. (Adaptada de OKADA, et al., 2004).

A exposição das células ao meio hipertônico ou perda celular de osmólitos leva à saída de água em acordo com o seu gradiente osmótico e em seguida ao encolhimento celular. O RVI é realizado pela captação de íons. O encolhimento celular leva a ativação do co-transportador  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  (NKCC) e/ou ativação concomitante do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) em paralelo ao trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (AE) (HOFFMAN et al., 2009; OKADA, 2004; LANG et al., 1998). O  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$  extruídos pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , respectivamente, são reabsorvidos pela célula na forma de  $\text{CO}_2$  via  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . O efeito resultante desses dois carreadores é a entrada de  $\text{NaCl}$ . O íon  $\text{Na}^+$  acumulado pelo co-transportador  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  ou trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  é extruído pela bomba de sódio potássio em troca de  $\text{K}^+$ . Assim, os transportadores eventualmente levam a ganho de  $\text{KCl}$ . Existem diferentes isoformas dos co-transportadores NKCC e trocador NHE, porém, nem todas servem para a regulação do volume celular. Por exemplo, os trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHE-1, NHE-2 e NHE-4 são ativados enquanto NHE-3 é inibido pelo encolhimento celular.

O encolhimento de algumas células leva a ativação de canais de  $\text{Na}^+$  e despolarização de sua membrana, que por sua vez dissipam o gradiente elétrico para  $\text{Cl}^-$  e assim permite a entrada de  $\text{Cl}^-$  (WEHNER et al., 2003). Algumas células inibem canais de  $\text{K}^+$  mais uma vez levando a despolarização. Algumas células inibem canais de  $\text{Cl}^-$  durante encolhimento celular para evitar a perda de  $\text{Cl}^-$  celular (LANG et al., 1998). O encolhimento celular não é apenas neutralizado pelo acúmulo de íons, mas também pela captação celular ou geração de osmólitos orgânicos (LAMBERT, 2008). Além desses co-transportadores, os canais para sódio como o NSC (*Na<sup>+</sup> - permeable nonselective cation channels*), o carreador de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , NCC (*Na<sup>+</sup> - Cl<sup>-</sup> Cotransporter*) e o carreador de taurina TauT (associado ao transporte de sódio e cloreto) contribuem para o RVI.

A participação de cada um desses transportadores nesse processo varia entre os diferentes tipos celulares (OKADA, 2004; HOFFMANN et al., 2009).

Neste trabalho, abordaremos especificamente o processo de RVD.

### **2.3.2 Diminuição regulatória do volume (RVD)**

A exposição das células a um fluido extracelular hipotônico leva ao influxo de água, em acordo com o gradiente osmótico através da sua membrana plasmática e então a célula aumenta de volume. A diminuição regulatória do volume (RVD) é o processo responsável pela recuperação do volume celular quando a célula é submetida ao choque hipotônico.

Os sistemas de transporte mais frequentemente ativados na maioria das células que sofrem “inchaço” celular são os canais de  $K^+$  e/ou os canais aniônicos (HOFFMANN et al., 2009; OKADA, 2006; WEHNER, 2006). A RVD requer a liberação destes íons. Em alguns casos, diferentes canais iônicos podem participar na regulação do volume celular. Esse processo ocorre principalmente através da liberação dos íons  $K^+$  e  $Cl^-$  através de canais e transportadores da membrana plasmática, e de transportadores eletroneutros induzindo a saída de água da célula (FIGURA 7). Dentre os canais de  $K^+$  que atuam na regulação do volume estão os  $K_v1.3$  (canais de  $K^+$  tipo N), o canal  $K_v1.5$ ,  $KCNE1/KCNQ1$  (LANG F et al, 1998) e o canal  $minK$  (BUSCH & MAYLIE, 1993). Os canais de cloreto que atuam na regulação do volume celular incluem os canais de  $ClC-2$  e  $ClC-3$  (JENTSCH et al, 2002; WEYLANDT. et al., 2001, LANG et al., 1998),  $BRI-VDAC$ ,  $I_{Cl}$  (SARDINI et al, 2003) e a P-glicoproteína (ou proteína MDR) (TOMINAGA et al., 1995). Apesar do papel de  $I_{Cl}$  e P-glicoproteína (MDR) na regulação do volume celular ainda ser uma questão controversa (RITTER et al., 2003).

Três tipos de transportadores estão envolvidos: O trocador de ânions  $Cl^-/HCO_3^-$  (AE); O trocador de cátions  $K^+/H^+$  (KHE); e o co-transportador de  $K^+-Cl^-$  (KCC) (FRIEDRICH. et al., 2006).

Claramente, muitas das propriedades dos canais aniônicos reguladores do volume celular não podem ser explicadas apenas pelos canais de cloreto, sendo necessários outros canais aniônicos. Em adição, o co-transportador  $Na^+ (HCO_3^-)$  também pode participar do RVD.

O co-transportador eletroneutro -  $KCl$ , permite a saída acoplada de ambos os íons sendo o carreador mais frequentemente utilizado. Paralelamente a ativação do co-transportador  $KCl$  as células dispõem dos trocadores  $K^+/H^+$  e  $Cl^-/HCO_3^-$ . O  $H^+$  e  $HCO_3^-$  reagem via  $H_2CO_3$  e  $CO_2$  para que facilmente atravesse a membrana celular e não é relevante osmoticamente,

servindo para liberar KCl (LANG F et al., 1998). O inchaço celular leva a ativação de canais catiônicos não específicos em alguns tipos celulares.

Assim, a permeabilidade dos íons através destes canais pode não servir diretamente para regulação do volume celular. O gradiente eletroquímico favorece a entrada ao invés da saída de cátions através destes canais. Estes canais permitem a passagem de  $\text{Ca}^{2+}$  que então entra nas células e ativa os canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Usualmente, mais cátions são perdidos das células que  $\text{Cl}^-$  (HALLOWS & KNAUF, 1994). A diferença é particularmente devido a perda de  $\text{HCO}_3^-$ . A maior parte do  $\text{HCO}_3^-$  perdido é substituído por  $\text{CO}_2$  não contribuindo diretamente para a regulação do volume celular, mas permite a entrada de  $\text{K}^+$ .

Além do transporte de íons, o transporte de pequenas moléculas orgânicas também está envolvido no RVD. Os mecanismos que medeiam a liberação de osmólitos orgânicos ainda não são bem compreendidos e podem envolver vários transportadores e/ou canais concomitantemente.

Em vários tipos de células (células renais, células epiteliais intestinais humanas, células mamárias de camundongo, entre outras) foi verificada a liberação de ATP através dos canais aniônicos contribuindo para o mecanismo de RVD (DUTTA et al, 2002; SABIROV et al, 2001). A saída de ATP influencia as concentrações citoplasmáticas de  $\text{Ca}^{2+}$ , o que pode causar a ativação de canais de  $\text{K}^+$  dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , facilitando assim o RVD. Além do ATP, outra molécula orgânica significativa para o processo de RVD é a taurina, que é acumulada nas células pelo transportador acoplado ao  $\text{Na}^+$  onde a transcrição do transportador é acumulada pelo aumento da força iônica, o que leva ao acúmulo de taurina. Ainda não se sabe precisamente através de que vias a taurina é liberada pela célula. Há indícios de que essa liberação esteja associada a canais aniônicos ativados pelo aumento de volume, entretanto os perfis farmacológicos das correntes aniônicas sensíveis ao volume e da atividade do suposto “canal de taurina” sensível ao volume são bastante divergentes (HOFFMANN et al., 2009). É possível que a liberação de taurina e outros osmólitos orgânicos ocorram através de transportadores aniônicos, especificamente através dos AE (MOTAIS et al., 1997).

Em adição a taurina, o inchaço celular estimula a rápida saída de glicerilfosforilcolina, betaína, aminoácidos e seus metabólitos incluindo glutamina, glutamato, glicina, prolina, serina, treonina, B-alanina (N-acetil), aspartato e GABA, e também alguns polióis incluindo o sorbitol e inositol (WEHNER et al., 2003).

Embora a concentração intracelular da maioria dos aminoácidos individuais seja frequentemente baixa, a soma de todos contribui significativamente para osmolaridade quando as células são expostas a um fluido extracelular. O inchaço celular, por exemplo, inibe a

proteólise e estimula a síntese de proteínas diminuindo assim a concentração de aminoácidos em células “inchadas”. Esse transporte de osmólitos orgânicos é particularmente importante nos rins, onde a osmolaridade extracelular pode sofrer mudanças drásticas, e no cérebro, onde o aumento de volume pode causar problemas devido à pressão intracraniana e a composição iônica é importante para a excitabilidade das células (LANG et al., 1998).

#### 2.3.2.1 Mecanismos de transporte iônico envolvidos na RVD

Os mecanismos através dos quais a célula transporta íons para o meio extracelular, quando em processo regulatório de volume, estão descritos a seguir:

##### **A) Os co-transportadores de potássio e cloreto, KCC:**

Os co-transportadores KCCs constituem membros da família SLC12a (*Solute carrier family 12*) e possuem 4 isoformas, KCC1-4 que são codificadas pelos genes SLC12a4-7, respectivamente. Possuem massas moleculares entre 120 e 130 kDa. Bumetanida, furosemida e outros tipos de diuréticos inibem o KCC (ALPER, 2006). Os KCCs desempenham importantes papéis além da RVD, como secreção renal de potássio, absorção de sal transepitelial, relaxamento da musculatura vascular lisa, regulação da concentração de cloreto, tamponamento extracelular de  $K^+$  no cérebro e até mesmo na regulação do pH intracelular, devido a sua capacidade de transporte de  $NH_4^+$  (GAMBA, 2005). Em adição ao inchaço celular, uma série de outros ativadores de KCC em vários tipos celulares tem sido amplamente caracterizados, incluindo uréia, alta pressão do oxigênio, pH extracelular baixo, o agente tiol-alkilantes N-etilmaleimida (NEM) e vários estímulos que regulam a proteína fosfatase 1, como a ativação do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (“platelet-derived growth factor receptor” - PDGFR) e aumento dos níveis de óxido nítrico (NO).

A presença desse tipo de transportador já foi verificada em células neuronais, musculares, endoteliais e epiteliais. A sua primeira descrição, no entanto, foi como via de eliminação do potássio na RVD de células sanguíneas de ovelha, e as células sanguíneas são ainda o modelo mais utilizado para o estudo desse transporte. Eles se utilizam da diferença entre o gradiente de concentração do  $K^+$  e do  $Cl^-$  para favorecer o co-transporte eletroneutro dos dois íons para fora da célula.

As quatro isoformas estão relacionadas à resposta celular em condições hipotônicas (GAMBA, 2005). A expressão de KCC1 é ubíqua e tem o RVD como sua principal função fisiológica. O KCC2 é expresso principalmente em neurônios, e possui um papel mais relacionado à regulação da concentração citoplasmática de cloreto e tamponamento do potássio extracelular. O KCC3 (homologia próxima do KCC1) e o KCC4 (similar ao KCC2) são

amplamente distribuídos em uma grande variedade de tecidos, e pelo menos nas células epiteliais renais parecem estar localizados na membrana basolateral, possuem as funções de transporte transepitelial, regulação da contração dos músculos lisos vasculares, além da RVD (HOFFMANN et al., 2009). A regulação da ativação dos KCCs ainda não foi elucidada. Muitos estudos indicam que essa regulação se daria através de um mecanismo de fosforilação-desfosforilação, uma vez que transportadores da mesma família envolvidos no RVI (NKCCs) são ativados por fosfatases (OKADA, 2004). As fosfatases de serina/tirosina desempenham um importante papel na ativação de KCCs, assim inibidores de fosfatases como caliculina A e ciclosporina A são eficientes na inibição da ativação desses transportadores em diversos tipos celulares. Essas fosfatases são ativadas quando ocorre um aumento do volume celular. Mesmo que a ativação dessas enzimas pelo aumento de volume tenha um papel essencial nesse mecanismo, a regulação da atividade de KCCs ocorreria principalmente através de quinases que são sensíveis ao volume (ativadas quando há diminuição do volume, e inibidas quando há aumento). Quinases conhecidas como WNKs (*With-no-lysin kinases*), que devem seu nome à substituição de uma lisina por uma cisteína numa sequência de aminoácidos são altamente conservadas entre as quinases e indicadas como possíveis reguladoras sensíveis ao volume. A ativação dessas quinases seria responsável por controlar a ativação de KCCs por fosfatases (HOFFMANN. et al., 2009; JENNINGS & AL-ROHIL, 1990).

Algumas evidências vão de encontro à explicação dessa ativação pelo mecanismo de fosforilação-desfosforilação: Já foi observada a ativação de KCCs pelo aumento de volume na ausência de ATP e outros estímulos, além de alterações volumétricas, também são capazes de ativar esses transportadores, incluindo agentes oxidantes e a baixa concentração de  $Mg^{2+}$  (OKADA, 2004).

## **B) Canais Catiônicos**

Em boa parte das células, a ativação concomitante dos canais de potássio e cloreto são os eventos mais importantes na regulação do volume celular. A RVD está associada com a ativação de uma grande variedade de canais de potássio (OKADA, 2004). Os canais de potássio que já foram descritos como sensíveis ao volume (FIGURA 9) são:

- Entre os canais com quatro domínios transmembranares: o TREK, o TASK (em células de tumor ascítico de Erlich) e o TRAAK.
- Entre os canais com seis domínios transmembranares:  $K_v1$  e  $K_v4$ , KCNQ1, KCNQ4 e KCNQ5 (entre os dependentes de voltagem) em diferentes tipos celulares como neurônios,

miócitos e linfócitos, o BK, o IK e o SK (entre os dependentes de cálcio) em células tubulares renais e miócitos cardíacos.

Os canais de potássio dependentes de voltagem KCNQ1 e KCN4 mostraram recentemente exibir uma sensibilidade ao volume quando expressos com AQP1 em oócitos de *Xenopus* (HOFFMANN et al., 2009; OKADA, 2004).

Recentemente, o canal de potássio ativado por  $Ca^{2+}$  em células intestinais epiteliais humanas 407 tem sido identificado molecularmente como hIK (WANG et al., 2002).

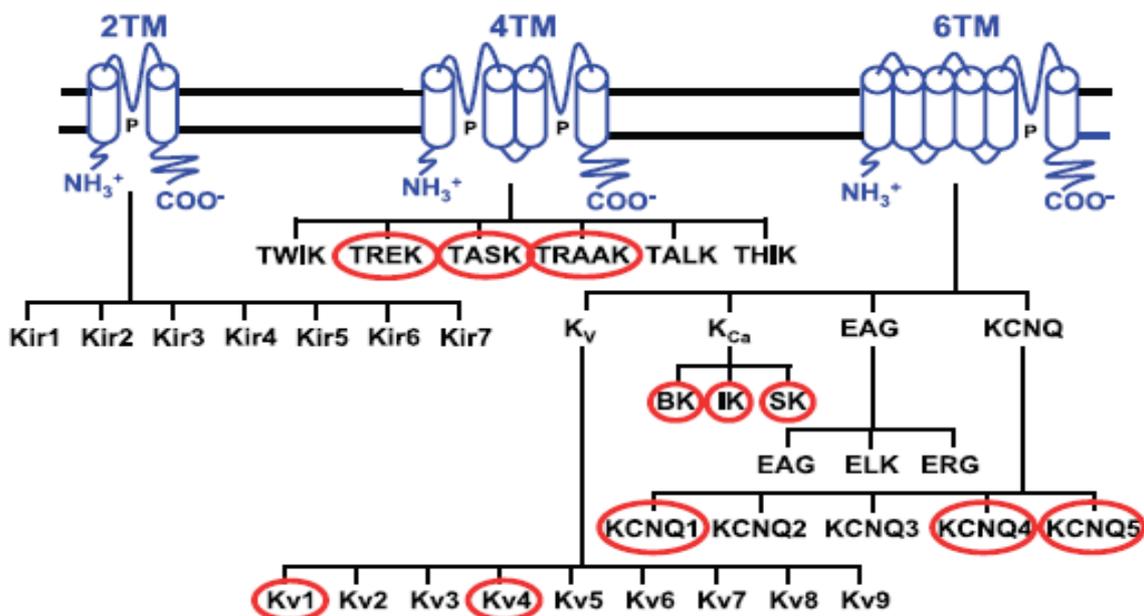
- Entre os canais com dois domínios transmembranares: Kir (KATP)

- O canal MinK em células epiteliais traqueais murinas (LOCK & VALVERDE, 2000)

Os canais de potássio são ativados por aumento na tensão da membrana, por vias relacionadas ao citoesqueleto, pelo aumento de cálcio que ocorre durante o RVD provavelmente através da ativação de canais dependentes do ATP liberado durante esse processo ou pela despolarização causada pela saída de cloreto e pela ativação de canais catiônicos não seletivos sensíveis ao volume (LANG, F. et al., 1998, HOFFMANN et al., 2009).

Embora esses canais sejam sensíveis ao volume, a contribuição de cada um deles para o RVD pode não ser significativa dependendo do tipo de célula (HOFFMANN et al., 2009).

### Canais de potássio



**FIGURA 9.** Canais de potássio sensíveis ao volume. Marcados em círculo vermelho Canais de potássio: TREK, TASK e TRAAK possuem quatro domínios transmembranares; K<sub>v</sub>1 e K<sub>v</sub>4, KCNQ1, KCNQ5 são canais de potássio com seis domínios. BK, IK e SK são canais de potássio dependentes de cálcio de alta, intermediária e baixa condutância. (Adaptada de HOFFMANN et al., 2009).

### **C) Os canais aniônicos sensíveis ao volume**

Diante de um estresse hipotônico, as células extruem  $\text{Cl}^-$  através de todos os canais aniônicos disponíveis, incluindo os canais ativados na membrana basal, sensíveis ao volume, ativados por  $\text{Ca}^{2+}$ , ativados pela adenosina monofosfato cíclico - cAMP.

Durante o RVD, uma corrente aniônica com características bem distintas é verificada, a qual é chamada de  $I_{Cl}$ , (JENTSCH et al., 2002). O canal que ocorre com mais frequência é o canal de cloreto VSOR (Retificador de saída sensível ao volume). Esse canal é responsável pela maior parte do fluxo de cloreto para fora da célula durante o RVD, e é apontado como possível canal permissivo a passagem dos osmólitos orgânicos (HOFFMANN. et al., 2009; OKADA, 2004; JENTSCH et al., 2002, EGGERMONT et al, 2001; LANG et al., 1998). Várias nomenclaturas têm sido utilizadas para se referir a ele na literatura como: VRAC (canal aniônico regulado por volume), VSOAC (canal aniônico sensível a osmólitos orgânicos, canal regulador da RVDC e canal de cloreto sensível ao volume (NILLIUS, 2001). Esta confusão de nomenclatura reflete a ausência de um candidato confiável de canal a nível molecular. Esses nomes referem-se à possível permeabilidade aos osmólitos orgânicos e aminoácidos e sua seletividade seguindo a sequência da permeabilidade de Eisenman tipo I  $\text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^- > \text{gluconato}$ . Apesar da vasta literatura referente a esse canal, utilizando-se de todas as nomenclaturas supracitadas, o desconhecimento a cerca desse canal é tal que não é certo se todos esses trabalhos refiram-se de fato a um único canal protéico ou a várias isoformas desse canal (SARDINI et al. 2003; EGGERMONT et al, 2001).

Os mecanismos de ativação dos canais de cloreto VSOR ainda são desconhecidos ou controversos, embora muitos estudos tenham mostrado um grande número de vias regulatórias ou de fatores moduladores. Recentes estudos sugerem evidências para o envolvimento de reações das proteínas de fosforilação/desfosforilação mediadas pela tirosina quinase, tirosina fosfatase, MAP quinases, quinase PI3, Rho-quinase e MLCK ou fosfatases de cadeia leves de miosina (MLC) na regulação dos canais cloreto VSOR (OKADA, 2004). Contudo, pode ser notado que a ativação é dependente de ATP intracelular, mas não requer sua hidrólise e é insensível a uma variedade de bloqueadores de proteínas quinases e fosfatases (JACKSON et al, 1994). Foi proposto que a ativação de canais VSOR em células hepáticas é induzida pelo estímulo autócrino de receptores purinérgicos do tipo P2 após liberação de ATP em inchaço celular. Atividade deste canal é totalmente independente da liberação de ATP induzida pelo inchaço celular tanto em células epiteliais intestinais 407 sem CFTR (fator regulador da condutância transmembrana modificado na fibrose cística) como em células mamárias 127 expressando CFTR.

Além desse canal, outros canais aniônicos são ativados para eliminação do cloreto durante o RVD. Existem diferentes tipos de canais aniônicos sensíveis ao volume. Um membro bem estabelecido é da família de genes CLC dos canais de cloreto CLC-2, que está relacionado não apenas a hiperpolarização da membrana, mas também a RVD em vários tipos de células (JENTSCH. et al, 2002; OKADA, 2004). O canal de cloreto ativado por cAMP conhecido como CFTR possui influência na RVD, porém de forma aparentemente indireta, através da regulação dos canais de potássio (VALVERDE et al., 1995).

O transportador conhecido como Mdr, ou glicoproteína P, foi proposto por alguns estudos como a identidade molecular do VRAC, porém foi visto que ele apenas possui um papel regulador na ativação do VRAC, assim como possivelmente transportadores da família ABC (*ATP-binding cassette transporters*) como o próprio CFTR. O CLC-3 também foi indicado e subseqüentemente refutado como responsável pela corrente  $I_{Cl}$ , (WEYLANDT et al., 2001; JENTSCH et al, 2002).

O VSOR parece ser ativado através de vias de sinalização intracelular envolvendo segundos mensageiros, devido a certo atraso na ativação de  $I_{Cl}$ , quando a célula é submetida ao choque hipoosmótico. A via precisa através da qual ocorre essa ativação ainda é desconhecida. O  $Mg^{2+}$  intracelular foi visto como um importante regulador da função desse canal, mas mudanças na sua concentração não causam a ativação desse canal sem o aumento de volume causado por um choque osmótico.

#### **D) O trocador de ânions $Cl^-/HCO_3^-$**

Os trocadores eletroneutros (AE) contribuem em funções celulares importantes como a regulação do pH intracelular e a regulação do volume. São responsáveis pela troca eletroneutra de  $HCO_3^-$  por cloreto através de membranas. São codificados pelos genes da família AE1-3, que por sua vez pertencem a família SLC4 (Família 4 dos carreadores de soluto) (ALPER, 2006). O AE1 é a isoforma mais conhecida entre estes trocadores e está presente nos eritrócitos para manutenção da forma e flexibilidade via interações funcionais com o citoesqueleto. Um subtipo bastante conhecido de AE1 é chamado de banda 3 (MOTAIS et al., 1997) sendo um transportador e não um canal, ele está envolvido no efluxo de osmólitos orgânicos ativados pelo “inchaço” celular. Organismos com expressão de formas mutadas ou com expressão reduzida do gene AE1 exibem alta instabilidade eritrocitária e acidoses. O AE2 é abundante no trato gastrointestinal e acredita-se que seja o responsável pela entrada de  $Cl^-$  pela membrana basolateral, destinado à secreção de HCl e também pela liberação de  $HCO_3^-$ . O AE2 foi encontrado como único tipo de AE envolvido no RVD de células de câncer cervical humanas.

O AE3 é bastante expresso no coração e no encéfalo. Distúrbios na expressão de AE3 estão relacionados a algumas doenças neurológicas e cardiológicas (SHEN et al., 2002).

Durante o RVD, ocorre uma maior saída de potássio do que de cloreto, o que se deve pelo menos em parte à atividade dos contra transportadores AEs (HOFFMANN et al, 2009). Uma acidificação do meio intracelular é essencial para o desenvolvimento do RVD, provavelmente devido à ativação de canais de potássio que dependem de um pH extracelular alcalino. A saída de  $\text{HCO}_3^-$  é responsável pela alcalinização do meio extracelular, e ocorre através da ativação dos AEs. A atividade dos AEs, por sua vez, depende da ativação de canais para cloreto. Em alguns tipos de células, transportadores de sódio e hidrogênio podem ser ativados concomitantemente para essa regulação do pH durante a RVD (L'HOSTE, 2007). Outra forma observada da participação do AE no RVD é através da atuação desse transportador como canal permeável a íons e a solutos orgânicos. Já foi suposto que esses transportadores seriam o eixo central de regulação do transporte de íons, posto que apenas a inibição deles por DIDS seja capaz de impedir o RVD completamente em alguns tipos celulares (MOTAIS et al., 1997).

#### **2.4 Como as células detectam a mudança de volume**

Mudanças de volume celular alteram parâmetros que servem de estímulo para que as células ativem mecanismos de regulação. Os mecanismos de detecção do volume parecem ser extremamente sensíveis. Por exemplo, estudos realizados por LOHR E GRANTHAM (1986) sobre o túbulo proximal renal demonstraram que as células podem sentir e responder às mudanças de volume em cerca de 3%. No entanto, nossa compreensão dos mecanismos regulatórios pelos quais as células sentem essas variações de volume e transduzem essas alterações em respostas regulatórias ainda é pouco explorado. Diferentes sinalizadores do volume celular têm sido postulados, incluindo mudanças induzidas pelo inchaço, encolhimento, tensão da membrana, arquitetura do citoesqueleto, concentração de íons celular, concentração de macromoléculas no citoplasma (LANG, 1998, O'NEILL, 1999).

No momento, parece que nenhum dos mecanismos sinalizadores dá conta da sensibilidade ao volume, e vários genes e vias de transportes são ativadas ou inativadas em resposta a variações do volume celular. As células provavelmente possuem múltiplos sensores de volume e vias efetoras de regulação, que respondem especificamente para o mecanismo e magnitude da mudança de volume celular (STRANGE, 1994).

Uma variedade de vias metabólicas é sensível a variação do volume celular e o efeito desta variação no metabolismo resulta da ativação, inibição ou alteração da expressão de enzimas (LANG F, 1998).

Alterações de volume celular influenciam diversas vias do metabolismo da glicose e aminoácidos. O encolhimento celular estimula a degradação de proteínas em aminoácidos inibindo a síntese de proteínas e de glicogênio. Os produtos de degradação são osmoticamente mais ativos que as macromoléculas e sua quebra geram osmolaridade celular. Inversamente, o 'inchaço' celular estimula a síntese de proteínas e de glicogênio e inibe a proteólise e glicogenólise, de modo a converter os aminoácidos intracelulares e glicose fosfatada em macromoléculas osmoticamente menos ativas (LANG F, 1998).

O inchaço das células inibe a glicólise, estimula o fluxo através da via da pentose fosfato, favorece a lipogênese e diminui a transcrição de carboxiquinase fosfoenolpiruvato, uma enzima chave para a gliconeogênese. Estimula a oxidação da glicina e alanina, degradação de glutamina, bem como a formação de  $\text{NH}_4$  e uréia a partir de aminoácidos. Estimula a oxidação do cetoisocaproato, carboxilase, Acetil CoA e lipogênese; inibe a carnitina palmitoiltransferase I; diminui a concentração citosólica de ATP e fosfato, aumenta a respiração e estimula a síntese de DNA e RNA. Todos esses efeitos são revertidos pelo encolhimento celular. O estímulo do fluxo através da via pentose fosfato aumenta a produção de NADPH e assim aumenta a formação de glutathiona (LANG, 2007). Inversamente, o encolhimento celular diminui a produção de NADPH e formação de glutathiona. Como resultado, o inchaço celular aumenta e o encolhimento diminui a resistência celular ao estresse oxidativo. Ao mesmo tempo, o encolhimento das células diminui a atividade da NADPH oxidase e, assim, impede a formação celular de  $\text{O}_2$ . Assim, um ambiente hipertônico, como o que prevalece na medula renal, suprime a explosão oxidativa de leucócitos e a resposta antibacteriana (LANG, 1998). A expressão de uma grande variedade de genes é sensível ao volume celular (FERRARIS & BURG, 2006).

Os mecanismos pelos quais o estresse hipertônico induz aumento na expressão de genes que codificam transportadores de osmólitos orgânicos e enzimas envolvidas na sua síntese foram estudados extensivamente nos rins. Os principais osmólitos orgânicos presentes na medula renal hipertônica de mamíferos incluem betaína, sorbitol e mio-inositol. Alguns desses genes servem para a regulação do volume celular. Por exemplo, estimula a expressão de enzimas ou transportadores envolvidos na formação celular ou acúmulo de osmólitos incluindo a aldose redutase e os transportadores acoplados ao  $\text{Na}^+$  para betaína, taurina, mio-inositol e aminoácidos. Foi observada uma relação entre a atividade de aldolase redutase e os níveis

intracelulares de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (UCHIDA et al., 1989). Esse estímulo da transcrição é parcialmente mediado pela respectiva região promotora no gene sensível ao volume celular: os genes que codificam a aldolase redutase, betaína contém osmolaridade responsiva (ORE), tonicidade responsiva (TonE) ou elementos responsivos ao volume celular (CVE). O TonE liga um elemento resposta de tonicidade se ligando a proteína TonEBP para estímulo da expressão. Outros genes sensíveis ao volume celular codificam elementos na sinalização dos mecanismos regulatórios de volume celular. Por exemplo, o inchaço celular estimula a expressão de sinais extracelulares regulados por quinases ERK1, ERK2 e quinase JNK-1 (LANG et al., 2000), enquanto o encolhimento celular aumenta a expressão no soro, de glicocorticóides indutores de quinases SGK1 e cicloxigenase-3. O encolhimento celular estimula a expressão de proteínas de choque térmico, que estabilizam as proteínas. Sua expressão causada pelo encolhimento possivelmente protege contra os efeitos desestabilizadores de aumento da concentração dos íons citosólicos (LANG et al., 1998),

Numerosas vias de transdução de sinal têm sido implicada no controle das vias de transportes reguladoras do volume incluindo mudanças na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, atividade GTPase, fosforilação/desfosforilação serina/treonina e tirosina e os níveis de eicosanóides (LANG et al., 1998). Talvez o mecanismo melhor compreendido de sinalização da regulação do volume sejam as reações de fosforilação/desfosforilação. Inchaço induzido por ativação e o encolhimento induzida por inativação do co-transportador  $\text{K}^+-\text{Cl}^-$  são mediados pela desfosforilação serina/treonina e fosforilação, respectivamente. O inverso é verdadeiro para o co-transportador  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ , encolhimento induzido por ativação é mediado por fosforilação e o inchaço induzido por inativação é dado pela desfosforilação.

O encolhimento celular estimula a expressão de citocina  $\text{TNF}\alpha$ , canal de cloreto  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ , glicoproteína P, genes de ativação imediata Egr-1 e c-fos, o inibidor de GTPase  $\alpha$ 1-chimaerin, o antígeno  $\text{CD}\beta$ , as enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), arginina succinato liase, tirosina aminotransferase, tirosina hidroxilase, dopamina hidroxilase, metallopeptidase 9 (MMP-9), o ativador de plasminogênio tecidual, assim como uma matriz protéica incluindo biglicano e laminina B2. Estimula a expressão e liberação do hormônio antidiurético ADH (LANG et al., 1998).

A própria composição lipídica da membrana altera a atividade dos transportadores envolvidos na regulação de volume. A ativação de canais pode ocorrer através do esticamento da membrana, ou de alterações na sua curvatura, embora a presença do citoesqueleto e de microvilosidades na membrana limite essa ativação a momentos de aumento ou diminuição. O inchaço celular pode causar esticamento na membrana celular ou citoesqueleto, que podem

igualmente servir como sensor do volume celular (HOFFMANN, et al., 2006). Os sensores acionam uma série de vias de sinalização celular, que pode variar consideravelmente entre diferentes tipos celulares ou em uma mesma célula em diferentes estados funcionais (HOFFMANN et al., 2009). Na maioria das células, o inchaço celular aumenta a atividade intracelular de  $Ca^{+2}$ , que entra através dos canais de  $Ca^{+2}$  e/ou liberação das reservas intracelulares seguindo a formação de 1,4,5-inositol-trifosfato. O  $Ca^{+2}$  ativa os canais de potássio e cloreto reguladores do volume e influencia outras funções celulares sensíveis ao volume celular (LANG et al., 1998).

O citoesqueleto desempenha importância significativa para a regulação de volume (PEDERSEN et al. 2001). Microtúbulos e filamentos de actina podem participar na regulação do volume celular. O inchaço celular estimula a  $\beta$  actina e tubulina, por exemplo, filamentos de actina se encontram despolimerizados em vários tipos celulares. A actina interfere na entrada e saída de água da célula, retardando alterações de volume, e a interferência da citocalasina D no citoesqueleto impede que ocorra a RVD em alguns tipos de células. Contraditoriamente, em alguns outros tipos de células, a citocalasina D causa um aumento da sensibilidade do VSOR. Tem sido especulado que o citoesqueleto participa na inserção de novos transportadores na membrana e na regulação de transportadores por proteínas quinases. A colchicina, citada mais adiante como disruptora do ciclo celular, interfere no arranjo dos microtúbulos, e impede também que ocorra a RVD em células de Jurkat, HL-60 e neutrófilos (OKADA, 2004; LANG et al., 1998).

Fosfolipases e quinases de fosfolipídios também podem ser osmossensíveis e assim regular a atividade de transportadores por alterar a própria curvatura da membrana. Alterações do volume celular modificam a fosforilação de uma variedade de proteínas. Uma grande limitação no entendimento desses mecanismos é a dificuldade em distinguir os estímulos mecânicos dos osmóticos. Muitas outras dificuldades estão envolvidas na identificação das vias de sinalização e no processamento dos estímulos que levam à regulação de volume, por exemplo: Nem todo efeito das alterações de volume nos mecanismos de sinalização celular diz respeito à ativação de mecanismos regulatórios de volume; vários mecanismos podem ser ativados paralelamente para promover a regulação; e esses mecanismos de sinalização não são extensíveis para vários tipos celulares de forma que cada tipo de célula pode apresentá-los de forma diferente (LANG et al., 1998).

A regulação de volume parece estar envolvida em cascatas de sinalização em que as quinases desempenham papel fundamental. As MAP quinases, as C-Jun N-terminal quinases (JNKs) e a p38 mostram-se ativadas durante o estresse osmótico em células de mamíferos. Em

leveduras, homólogos dessas quinases participam de uma via de osmossensibilidade que se inicia com proteínas transmembranares “osmosensoras” chamadas de SLN1 e SHO1, o que sugere que células de mamíferos podem ter também proteínas “osmosensoras”. A quinase de regulação extracelular ERK2, junto com a JNK1 também são ativadas com a tensão da membrana em alguns tipos de células, ratificando a presença de um sensor de volume que inicie essa cascata de sinalização. Quinases ativadas durante inchaço celular incluem tirosina quinase, proteína quinase C, adenilato ciclase, MAP quinase, Jun-Kinase e a quinase de adesão focal (p121FAK). O encolhimento celular desencadeia ativação das WNK e diversas cascatas MAP quinases (proteína ativadas por mitógenos), levando a ativação de SAPK, quinase p38, e a quinase de cadeia leve da miosina (MLCK). As quinases podem fosforilar diretamente os carreadores de regulação do volume celular ou citoesqueleto e podem levar à ativação de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de genes reguladores do volume (OKADA, 2004).

A fosfolipase C e a fosfolipase A2 são por vezes indicadas como sensores mecânicos, embora sua ativação não esteja diretamente ligada à tensão da membrana, e sim ao espaço entre os lipídeos que a compõem. Em algumas células, o aumento do volume ativa a fosfolipase A2, que leva a formação de hepoxilina A3 produto da 15-lipoxigenase e leucotrieno LTD4 principal produto do metabolismo da 5-lipoxigenase (MARGALIT et al 1997), Os eicosanóides, por sua vez, estimulam os canais de  $K^+$  e/ou  $Cl^-$  reguladores de volume celular e/ou liberação de taurina. Integrinas também são responsáveis por sinalizar estímulos mecânicos, o que caracteriza essas proteínas como candidatas ao papel de sensor.

Inchaço celular inibe a formação de PGE2 e assim previne a ativação de canais de sódio sensíveis a PGE2. Sinalizadores do volume celular também podem envolver o óxido nítrico. Inchaço celular alcaliniza e o encolhimento acidifica os compartimentos celulares, tais como endossomos, lisossomos e grânulos secretores. A alcalinização dos compartimentos celulares ácidos por sua vez inibe a proteólise autofágica (LANG et al 1997).

Apesar do enorme esforço para entender precisamente essas vias de sinalização e a ativação dos mecanismos responsáveis pela regulação de volume nos últimos anos, muito ainda há muitas questões a serem esclarecidas sobre a existência de sensores específicos para alterações de volume durante o estresse osmótico.

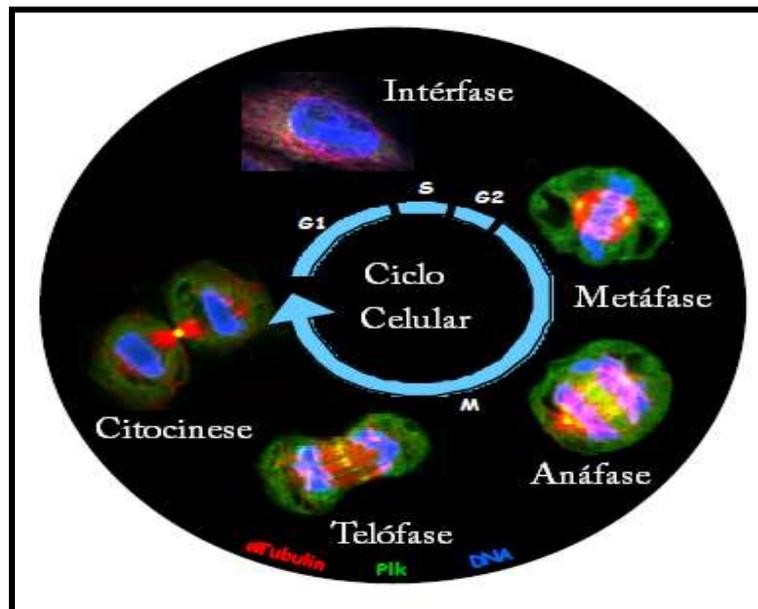
## 2.5 Ciclo Celular

O ciclo celular é denominado como uma sequência de eventos pela qual uma célula duplica todos os seus componentes e se divide em duas células filhas. A regulação do ciclo celular é crítica para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares. A divisão de todas as células deve ser cuidadosamente regulada para assegurar que a formação das células filhas possua os genomas intactos. Ao mesmo tempo, a perda do seu controle pode acarretar uma superprodução desnecessária de células, frequentemente com resultados maléficos como, por exemplo, a formação de tumores. O ciclo celular eucariótico pode ser subdividido em duas fases principais: a interfase, um longo período durante o qual o conteúdo das células se duplica, e a fase M ou mitose, durante o qual o conteúdo da célula é segregado (BUDIRAHARDJA., 2009; REIS., 2005).

A interfase divide-se nas fases G1(entre interfase e fase S), G2 (entre a fase S e fase M). Estes intervalos permitem a preparação celular, síntese de proteínas e prevê um tempo necessário no ciclo celular, para a sinalização intra e extracelulares. A mitose ou fase M é composta por quatro subfases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Na prófase, o DNA se condensa em estruturas compactas conhecidas como cromossomos. Durante a metáfase, os cromossomos são alinhados no plano equatorial. A segregação dos cromossomos ocorre na anáfase, através dos fusos mitóticos compostos pelos cinetócoros que medeiam a ligação deste com o cromossomo. O fuso segrega os cromossomos para polos opostos da célula. A mitose chega ao fim quando os núcleos são formados e a células filhas começam a se dividir. A divisão do citoplasma denomina-se de citocinese. Divisão e morte celular (autofagia, apoptose e necrose) são dois processos fisiológicos que regulam a homeostase do organismo nos indivíduos. A falta de regulação destes processos pode trazer ao indivíduo diversas patologias, como câncer, infarto do miocárdio, aterosclerose, infecções, inflamações e desordens neurodegenerativas. Diante destas patologias associadas à desregulação da homeostase, buscase encontrar moduladores do ciclo celular, como também tentativas para reprogramar a morte celular. A integridade genômica, proliferação e sobrevivência celular, são reguladas por pontos de checagem no ciclo celular. A perda no reparo do DNA e morte celular programada pode acarretar em crescimento celular descontrolado.

Como resposta ao stress replicativo ou danos ao DNA, células ativam uma rede complexa de fatores conhecidas como quinases dependentes de ciclinas, estas retardam ou detêm a progressão do ciclo celular (vias dos pontos de checagem), promovendo assim a reparação ao DNA ou em casos de danos irreparáveis as células são eliminadas

(ZHIVOTOVSKY. et al., 2010).



**FIGURA 10.** Representação esquemática do ciclo celular. Ilustração de Células humanas (HeLa) apresentando cromossomos em azul, microtúbulos (vermelho) e proteínas (verde) (Retirada de PERDIGÃO & TAVARES, 2008).

Neste estudo utilizamos uma abordagem simples para distinguir em que fase do ciclo as células se encontram: através da medida do volume que possuem. Sabemos que células que acabaram de se dividir possuem um menor volume ( $G_0$ - $G_1$ )  $2n$ , células que passaram pelo crescimento em  $G_1$  e entraram em  $S$  apresentam seu volume um tanto maior ( $S$ )  $4n$  e células prontas para se dividir possuem seu volume máximo  $4n$  (ANDERSON et al, 1969; DOROSHENKO et al., 2001; COOPER et al., 2003; DA SILVA et al., 2010). Este método apesar de ser muito trabalhoso e não muito preciso, apresenta uma grande vantagem, pois, permite a realização de uma análise com o mínimo de interferência bioquímica, preservando ao máximo, as condições fisiológicas da célula.

## 2.6 Células-tronco, localização e classificações

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas, raras na maioria dos tecidos e podem ser definidas segundo três propriedades: I) auto renovação, ou seja, capacidade de originar outra célula com características idênticas; II) habilidade de se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares; e III) capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (VERFAILE, 2002).

Em primeiro lugar, sua capacidade de auto renovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e, a outra característica, ainda mais interessante, é sua capacidade de originar diferentes tipos celulares especializados, não possuindo nenhuma função específica até que essa receba um sinal do ambiente, direcionando-a a diferenciação em uma célula especializada (BYDLOWSKI et al., 2009; CHOUMERIANOU et al, 2008; WANG et al., 2004; REYA et al, 2001; FUCHS & SEGRE, 2000). Esses sinais incluem danos aos tecidos como: trauma, fraturas, inflamação, necrose e tumores (PALERMO et. al., 2005).

Deste modo é de fundamental importância que as células-tronco controlem firmemente a escolha entre divisões simétricas (capacidade de auto renovação, em células idênticas a si mesmas) e assimétricas (quando uma célula-filha permanece indiferenciada enquanto a outra pode seguir a diferenciação) durante o desenvolvimento e reparação de tecidos. A diferenciação prematura pode levar ao desenvolvimento ou reparo incompleto do órgão ou tecido, enquanto a proliferação descontrolada pode levar a formação de tumores (MOORE & LEMISCHKA, 2006; FUCHS et al., 2004).

Devido a estas propriedades únicas, as células-tronco são alvos de intensas pesquisas e muitas questões científicas principalmente em relação aos mecanismos moleculares de indução e diferenciação precisam ser esclarecidos. Atualmente vários cientistas estão trabalhando para utilização destas células na cura de muitas doenças, pois, elas são a fonte mais promissora para a terapia celular. Acredita-se que futuramente poderemos substituir tecidos lesionados ou doentes, como nos casos de Alzheimer, Parkinson e doenças neuromusculares em geral, ou ainda substituir células que o organismo deixa de produzir por alguma deficiência, como no caso do diabetes. O uso de células-tronco na área clínica ganhou grande impulso nas últimas décadas, alcançada, por vários níveis de sucesso em ensaios clínicos e pelo avanço na compreensão dos mecanismos pelos quais as células-tronco exercem seus efeitos. De um modo geral, as células-tronco podem ser classificadas de acordo com sua origem e plasticidade (CHOUMERIANOU et al, 2008) **(TABELA 1)**.

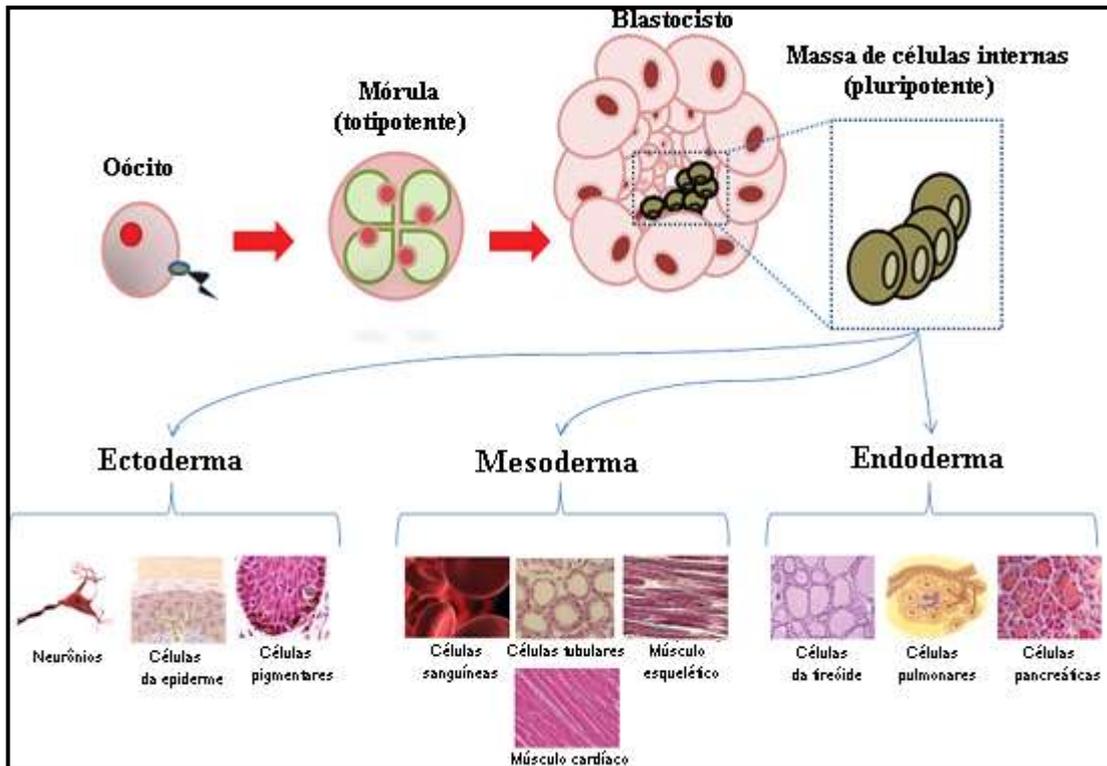
Considerando a origem de obtenção, as células-tronco podem ser classificadas como células-tronco embrionárias (CTE) que podem ser isoladas nos primeiros estágios do embrião. ou como células-tronco adultas (CTA) obtidas de tecidos adultos. Por outro lado, se a plasticidade for considerada, as células-tronco podem ser classificadas em ordem decrescente de potencialidade como células-tronco totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes.

**TABELA 1:** Classificação das células-tronco

<b>Quanto à origem:</b>	<b>Quanto à plasticidade:</b>
<b>Embrionárias</b>	<b>Toti- ou pluripotente</b>
<b>Adultas</b>	<b>Pluri-, multi- ou unipotente</b>

Em teoria, células-tronco embrionárias (CTE) parece ser o tipo de célula-tronco mais versátil para aplicações na medicina regenerativa. Na hierarquia da CTE, as células retiradas dos oócitos fertilizados são chamadas totipotentes (ROSSANT et al., 2001), que são encontradas apenas no estágio de zigoto e na primeira clivagem do blastômero. Estas células totipotentes podem dar origem a todos os tecidos embrionários e extra-embrionários necessários para gerar um novo organismo. Então, as células totipotentes são capazes de se especializar, formando o blastocisto, do qual o embrião se desenvolverá. Quando as células-tronco perdem esta capacidade, passam a ser classificadas como células-tronco pluripotentes, sendo as encontradas na massa interna do blastocisto, nas células do epiblasto (após implantação) e nas células germinativas primordiais (na fase tardia embrionária/início da fetal) que podem dar origem a praticamente todos os tipos celulares maduros que compõem um organismo, exceto os anexos embrionários. Células obtidas a partir da massa celular interna (ICM) de blastocisto pré-implantação não são mais totipotentes. A perda da totipotência está, portanto, relacionada ao destino do desenvolvimento do organismo. No entanto, estas células pluripotentes mantêm a capacidade, em condições definidas, para gerar todos os tipos de células derivadas de três camadas germinativas: ectoderma (tecidos da epiderme e nervos), mesoderma (músculos, ossos e sangue) e endoderma (fígado, pâncreas, trato gastrointestinal, pulmões), incluindo células fetais e adultas (FIGURA 11).

O grupo de células-tronco que apresenta plasticidade mais restrita é denominado de multipotentes. Estas células podem se diferenciar em determinado tipo celular comprometido com um órgão ou tecido específico.



**FIGURA 11.** Hierarquia das células-tronco. (Retirada de SALEM & THIEMERMANN, 2010).

As CTA, normalmente, apresentam potencial mais limitado quando comparado às CTE, podendo ser multipotentes, como no caso das CT hematopoéticas (CTH) ou unipotentes (como exemplo, temos as células encontradas nos testículos).

Atualmente existe uma nova categoria de CTA “reprogramadas” que atingem estágio de pluripotência artificialmente e são ditas células-tronco pluripotentes induzidas (IPs), que podem ser alteradas por meio da tecnologia: de transferência nuclear, fusão celular ou manipulação genética. Esta reprogramação nuclear é de grande interesse médico, porque tem o potencial de gerar uma fonte de células específicas do próprio paciente (JAENISCH & YOUNG, 2008).

O desenvolvimento de iPS (TAKAHASHI et al., 2007) e a propriedade delas se diferenciarem em tipos celulares de diferentes camadas germinativas têm complicado a nomenclatura de CTA, e, portanto, flexibilidade e cuidado é necessário ao definir os tipos específicos de células-tronco.

A maior vantagem do uso das CTE é sua alta capacidade de proliferação e diferenciação em diversos tipos celulares. Embora já existam muitos estudos com as CTE, em camundongos e humanos, o seu uso em terapia celular e na pesquisa tem sido dificultado por questões de compatibilidade, segurança e ética. Em qualquer transplante, é necessário existir compatibilidade entre doador e receptor para que as células não sejam rejeitadas. Formas de

contornar esse problema foram propostas como: uma delas foi à criação de um banco dessas CTE (cada uma derivada de um embrião diferente), para aumentar as chances de semelhança entre doadores. Quanto à segurança, ainda restam dúvidas a cerca da utilização destas células na medicina regenerativa porque, se por um lado são atrativas por conta de sua enorme plasticidade, por outro elas representam um perigo. Testes indicam que se injetadas em seu estado nativo, as CTE podem gerar teratomas, ou seja, antes de utilizar estas células, é necessário controlar cuidadosamente o processo de diferenciação para que elas gerem apenas os tecidos de interesse.

As desvantagens da CTE, como instabilidade genética, obrigatoriedade de sua transplantação para hospedeiros imuno-comprometidos, o risco de formação de teratocarcinomas, a falta de compreensão sobre o que regula especificamente o mecanismo de diferenciação e a tumorigenicidade amplamente divulgada (ODORICO et al., 2001), além da questões éticas envolvidas (BLUM et al., 2008) direcionam os pesquisadores a desenvolver e utilizar as CT

A que não possuem essas desvantagens.

A viabilidade do uso de células-tronco adultas na regeneração e reconstrução de tecidos tem suscitado grande interesse entre os pesquisadores, dado o aumento de leis em diversos países que proíbem o uso de células-tronco embrionárias. Ao contrário, as CTA não apresentam estes empecilhos, podem ser isoladas do próprio paciente, são autogênicas, apresentando uma menor possibilidade de rejeição, são responsivas aos fatores de crescimento inerentes ao hospedeiro, podem ser multiplicadas *in vitro* e utilizadas para benefício do paciente ou armazenadas em bancos para uso posterior. Não incorre em limitações morais, contornando as questões de âmbito religioso ainda tão intrinsecamente ligadas às pesquisas com as CTE, apesar da extensão da plasticidade das CTA ainda estar sob investigação. Atualmente, diversos testes clínicos em humanos estão em andamento utilizando CTA, principalmente derivadas da medula óssea (PEREIRA, 2008). No entanto, também apresentam desvantagens, como o fato de não serem pluripotentes, sendo menos indiferenciadas e tecido específicas, a dificuldade em torno de seu isolamento e expansão *in vitro*, na maioria das vezes limitando-se a função de reparação e homeostase do tecido onde foram encontradas, além de sua menor quantidade nos tecidos, (CHOUMERIANOU et al, 2008). Apesar dos avanços obtidos no emprego de células-tronco como auxiliares no tratamento de inúmeras enfermidades, muitos questionamentos ainda não foram esclarecidos.

A fonte melhor caracterizada de células-tronco adultas ainda é da medula óssea adulta (ZHAO et al., 2003; SALEM & THIEMERMANN, 2010). Medula óssea adulta contém uma

população heterogênea de células relacionada à taxa de proliferação e morfologia, incluindo células-tronco hematopoiéticas, macrófagos, eritrócitos, fibroblastos, adipócitos, e células endoteliais. Sabe-se que nem todas as colônias da medula óssea apresentam de fato característica multipotencial. Assim, sugere-se que a medula óssea seja composta pela mistura de células progenitoras diferenciadas e indiferenciadas. O isolamento e consequente caracterização das variedades celulares presentes é dificultado pela ausência de marcadores antigênicos específicos bem estabelecidos (SCHWINDT et al., 2005).

Além desses tipos celulares, a medula óssea também contém um subconjunto de células-tronco não hematopoiéticas (CTM) que possuem um potencial múltiplo (DEANS & MOSELEY, 2000; BIANCO & GEHRON, 2000). Sendo assim, as duas principais populações de células-tronco alojadas dentro da medula óssea adulta, são as células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais (CTMs) (PITTENGER et al., 1999). Estas células têm a capacidade de se diferenciarem em células dos tecidos ósseo, adiposo, cartilaginoso e muscular, o que demonstra sua alta plasticidade.

Apesar da medula óssea ser considerada uma fonte bem aceita de CTA, estas têm sido isoladas a partir de uma variedade de tecidos e órgãos, incluindo: cérebro (CLARKE et al., 2000), coração (MESSINA et al., 2004), pulmões (KIM et al., 2005), fígado (MATTEWS & YEOH, 2005), pâncreas (KRUSE et al., 2006), rins (AL-AWQATI & OLIVER, 2002), tecido adiposo (ZUK et al., 2002), músculo esquelético (CHEN & GOLDHAMER, 2003), decídua dos dentes (MIURA et al., 2003), folículos de cabelos (JAHODA et al., 2003), pele (JOHNSTON, 2004), sangue periférico (ZHAO et al., 2003), testículos (GUAN et al., 2006), sangue menstrual (MENG et al., 2007), líquido amniótico (DE COPPI et al., 2007). O termo CTA também descreve as células obtidas de fontes menos maduras, como: sangue de cordão umbilical (KANG et al., 2006), tecido do cordão umbilical incluindo vasos sanguíneos e geléia de Wharton (SECCO et al., 2008), placenta (YEN et al., 2005) e tecidos fetais (INTANKER et al., 2003).

O conhecimento da existência das células-tronco provenientes de várias fontes de tecidos adultos, contendo células mais indiferenciadas (multipotentes, pluripotentes) com a possibilidade de se diferenciar em tipos celulares provenientes de diferentes camadas germinativas, abre um leque de possibilidades para obtenção de CT – sem grandes preocupações éticas, morais ou religiosas – e oferece esperança para a população no que diz respeito à evolução das pesquisas com a finalidade de uma utilização mais rápida na terapia celular para o tratamento de várias doenças (AEJAZ et al., 2007; DEL CARLO et al., 2008).

Dentre as células-tronco adultas, as células-tronco mesenquimais são as de maior interesse nas pesquisas atuais, por não apresentarem barreiras éticas, pela facilidade de obtenção e ainda por serem utilizadas em transplantes autólogos, sendo a medula óssea a maior fonte de obtenção.

### **2.6.1 Células-tronco mesenquimais (CTMs)**

As células-tronco mesenquimais (CTMs) têm gerado uma grande dose de excitação e vem sendo aplicadas em vários ensaios clínicos como uma nova estratégia para reparo tecidual (BOBIS et al., 2006), imunomodulação (NEWMAN et al., 2009), transplante celular (HEMMATTI, 2008), terapia do câncer (STUDENY et al., 2004) e terapia gênica (CHAMBERLAIN et al., 2004) devido sua capacidade intrínseca de auto-renovação e diferenciação em vários tipos celulares funcionais, assim como alta capacidade imunossupressora (MULLER et al., 2008, COLLINS et al., 2010) . Como vimos, entre os tecidos conhecidos por apresentarem as células-tronco adultas (CTA), a medula óssea foi a mais estudada, por muitos anos, como fonte tanto de células-tronco hematopoéticas (CTH), quanto de células-tronco mesenquimais (CTM). A medula óssea tem sido considerada ainda a principal fonte de CTM para a maioria dos estudos experimentais e clínicos, por conta de seu potencial tanto para proliferar quanto se diferenciar (HORWITZ et al.,2005). As CTMs constituem uma população muito pequena. Estima-se que na medula adulta fresca, são cerca de somente 0,01% a 0,0001% das células nucleadas (PITTENGER et al., 1999). Apesar deste baixo número e de sua capacidade de diferenciação mais limitada quando comparada as células-tronco embrionárias, apresentam grandes vantagens, levando em conta a facilidade de isolamento destas células, sua capacidade de propagação em cultura, com alta eficiência, não são eticamente restritas e apresentam baixa imunogenicidade, podendo ser teoricamente empregadas em transplantes alogênicos. Sendo assim, apresentam um potencial uso na medicina regenerativa e engenharia de tecidos.

No entanto, outras fontes de populações de células semelhantes são investigadas, pois CTMs isoladas de medula óssea exige um procedimento doloroso e invasivo e pode causar infecção, hemorragia e dor crônica, a frequência de MSCs é baixa (PITTENGER et al., 1999), e sua capacidade de proliferar e se diferenciar diminuem com a idade (MUELLER & GLOWACKI. 2001).

O termo células-tronco mesenquimais foi popularizado por Caplan (GAO et al., 2001),

em referência ao trabalho de FRIEDENSTEIN et al., 1970 descrevendo a célula como fibroblástica *in vitro*, aderente ao plástico, isolada por centrifugação em gradiente de densidade Percoll, reativa para os anticorpos monoclonais SH2 e SH3. FRIEDENSTEIN et al., demonstrou pela primeira vez que células derivadas da medula óssea foram capazes de diferenciação osteogênica. Ele descreveu uma população de células como estromais multipotentes, fusiformes e clonogênicas em condições de culturas, sob a designação de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F). Essas células foram capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos, osteócitos e mioblastos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

As células-tronco mesenquimais da medula óssea humana são comumente chamadas de células-tronco esqueléticas, células-tronco estromais da medula óssea, de células-tronco mesenquimais, ou, como recentemente sugerido pela *International Society for Cytotherapy*, de células estromais mesenquimais multipotentes (CTMs) (BYDLOWSKI et al., 2009). Assim, a nomenclatura não é consistente. Recentemente, designações para as células multipotentes não hematopoiéticas foram referidas na literatura por outros nomes, como colônias formadoras de fibroblastos', células do estroma (tronco)", "as células da medula óssea (estroma)", "as células-tronco do esqueleto", "as células progenitoras mesodérmica", "células estaminais não hematopoiéticas", "(medula óssea) células-tronco', "as células progenitoras mesenquimais" e outros (BAKSH et al, 2004).

Há também uma tendência para designar estas células, como "pré-células (linhagem sob investigação)" (por exemplo, pré-osteoblastos, etc.). Também tem sido sugerido que a CTM são simplesmente pericitos (NAKASHIMA & DE CROMBRUGGHE, 2003). Embora nenhum desses termos possa determinar com precisão a origem do desenvolvimento e capacidade de diferenciação destas células, o termo (CTM) "células-tronco mesenquimais" ainda é atualmente o mais empregado.

Algumas das inconsistências em torno da identificação deste tipo celular surgem do fato que marcadores específicos ainda não foram definidos, juntamente com as diferenças na terminologia. Portanto, a questão principal é se essas células derivadas de adesão definitivamente correlacionam-se com uma população *in vivo* das CTMs. Desde os primeiros trabalhos de CASTRO-MALASPINA et al, 1980 muitos pesquisadores têm empregado diferentes métodos para isolar as CTMs, tanto em condições de soro como privados de soro, e desenvolveram novas abordagens para isolar populações purificadas de CTMs.

Esses avanços favoreceram a nossa compreensão a respeito da biologia das CTMs, mas também criaram diferenças na sua terminologia (exemplo: com base na morfologia, fenótipo, a expressão do gene, e suas combinações) para descrever as células com capacidade

aderentes derivadas de diferentes fontes de tecidos adultos exibindo morfologia fibroblastóide.

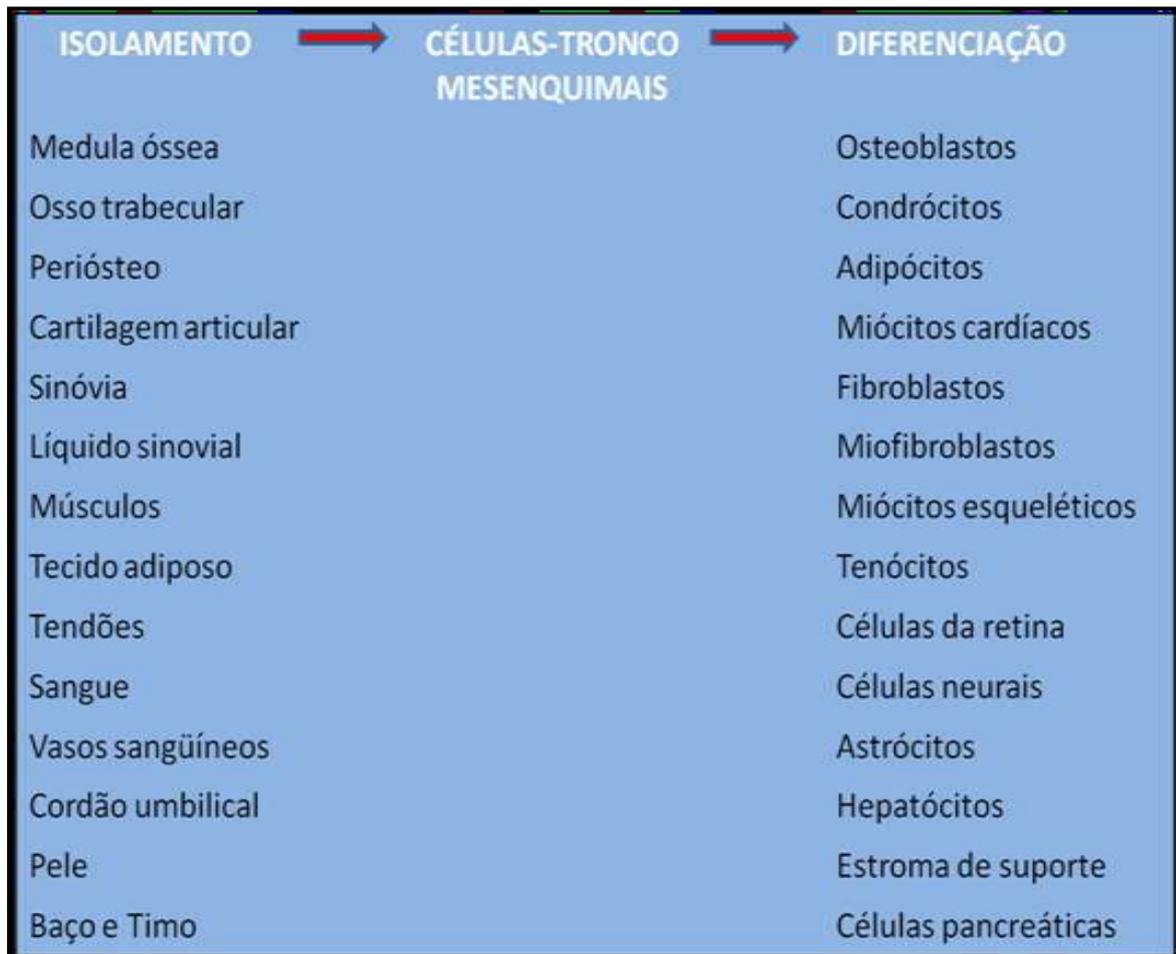
Além da medula óssea, populações semelhantes de CTMs vêm sendo isoladas de vários locais do organismo humano e animal, incluindo sangue periférico (ZVAIFLER et al., 2000), osso trabecular (NOTH et al., 2002), tecido adiposo (UGARTE et al., 2003), tecido conjuntivo (YOUNG et al., 1995), sangue do cordão umbilical (LEE et al., 2004) pele (TOMA et al., 2001), líquido sinovial (JONES et al., 2004), placenta (WALLER et al., 1995), polpa dentária (SETHE et al., 2006, NAKASHIMA & DE CROMBRUGGHE, 2003), músculo e cérebro (JIANG et al., 2002). Além de uma variedade de tecidos fetais, como baço, pulmão, pâncreas, rins e do líquido amniótico durante meados da gestação (JIANG et al., 2002; YEN et al., 2001; LEE et al., 2004). Os tecidos fetais, placenta, vasos sanguíneos e do sangue do cordão umbilical apresentam pouca quantidade de CTM quando comparado as de medula óssea, além de ainda não estarem bem estabelecidas as condições ideais de cultivo (WEXLER et al., 2003) (TABELA 2).

As CTMs foram classicamente descrita para dar origem a tecidos conjuntivos incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo e estroma medular (ROMANOV et al., 2003), células do músculo esquelético e células do sistema vascular. As CTMs, na visão tradicional, devem referir-se às células-tronco, que também são capazes de produzir células sanguíneas, no entanto, células do sangue são realmente derivadas de uma população de células distintas chamadas de células-tronco hematopoiéticas. Isso permite que CTMs sejam classificadas como não hematopoiéticas, células-tronco multipotentes que são capazes de se diferenciar tanto em linhagens de células mesenquimais como não mesenquimais (SALEM & THIEMERMANN, 2010).

Assim, células-tronco mesenquimais (CTMs) são células indiferenciadas capazes de auto renovar, com alta capacidade proliferativa, constituindo uma rara população de células progenitoras multipotentes, não-hematopoéticas, estromais, capazes de suportar a hematopoiese e que exibem uma ampla capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares, incluindo condrócitos, osteócitos, adipócitos (PURPURA et al., 2004), miócitos (POUNTOS & GIANNOUDIS, 2005, DENG et al., 2001, PITTENGER et al., 1999) (TABELA 2). Além disso, também tem sido demonstrado que as CTMs são capazes de se diferenciar em cardiomiócitos, neurônios e astrócitos *in vitro* e *in vivo* (BEYER NARDI & DA SILVA MEIRELLES, 2006; KERN et al., 2006; BIANCO & GEHRON, 2000; PITTENGER et al., 1999) (TABELA 2), como também em células endoteliais (KESTENDJIEVA et al., 2008), células produtoras de insulina e células germinativas (HUANG et al., 2010).

**TABELA 2** – Origem e tipos celulares derivadas das CTMs. (Adaptado de POUNTOS &

GIANNOUDIS,2005)



Imunofenotipicamente, as CTMs foram definidas como células que expressam CD29, CD44, CD90, e CD105 e sem marcadores de linhagem hematopoiéticas e HLA-DR (KERN S et al., 2006). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que CTMs isoladas de diversas fontes não são uma população homogênea e que seu potencial de diferenciação pode variar dependendo da fonte e do doador (KERN S et al., 2006; BIEBACK et al., 2004). Infelizmente, os fatores que afetam essas diferenças ainda são desconhecidos.

Essas observações formaram a base para a maioria dos estudos atuais de células do estroma derivadas da medula óssea. No entanto, ainda existem muitas perguntas sem resposta sobre a verdadeira natureza e identidade de CTMs, incluindo a localização, origem e capacidade multipotentes. Estas variáveis são responsáveis pelo fenótipo e função de populações de células resultantes. Se estas condições seletivamente promove a expansão de diferentes populações de CTMs ou causa populações de células semelhantes a adquirir fenótipos diferentes não está clara.

Documentos da Sociedade Internacional de Terapia Celular tentaram resolver estas questões esclarecendo a terminologia e determinaram que as células multipotentes devam

incluir a fonte na terminologia, isto é, CTMs derivadas de tecido adiposo, CTMs derivadas da medula óssea, etc. A Sociedade Internacional de Terapia Celular também forneceu os seguintes critérios mínimos para a definição de células estromais mesenquimais humanas multipotentes (HORWITZ et al., 2005):

- aderentes ao plástico sob condições de cultura padrão;
- positivas para a expressão de CD105, CD73, e CD90, e ausência de expressão de marcadores de superfície de células hematopoiéticas CD34, CD45, CD11a, CD19 e HLA-DR;
- sob estímulo específico, as células devem diferenciar-se em osteócitos, adipócitos e condrócitos in vitro.

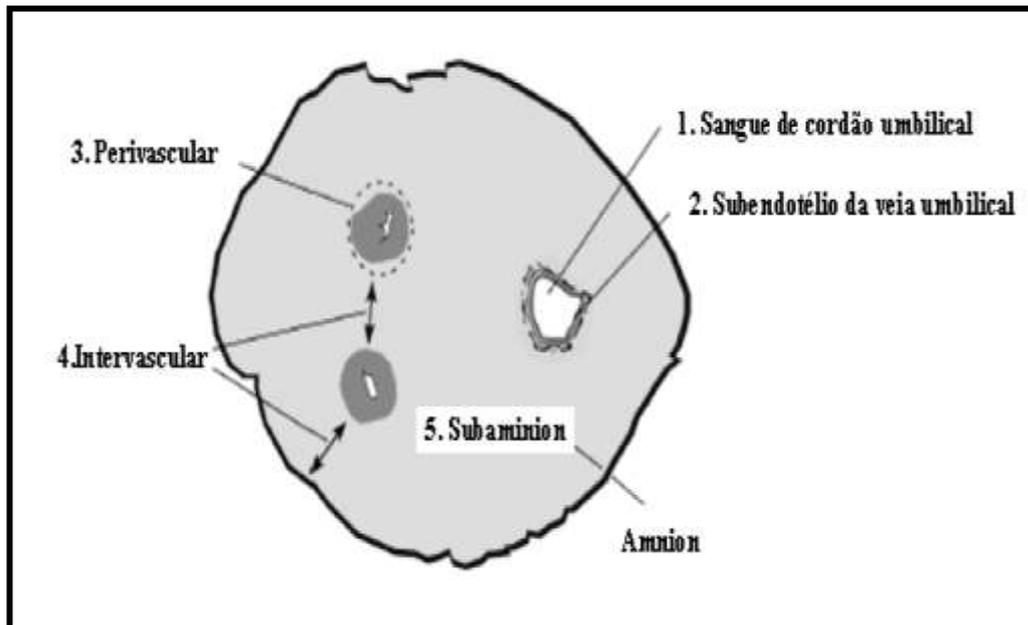
A **Tabela 3** apresenta muitos marcadores de superfície celular que têm sido utilizados para caracterizar MSCs como positivo ou negativo para a expressão de marcadores, embora isso seja ainda mais complicada pelas diferenças entre espécies e entre as diferentes estirpes de espécies (PITTENGER et al., 1999). Esta questão continua por se resolver na ausência da identificação de um marcador exclusivo da superfície celular. Diferentes marcadores de superfície têm sido associados com as CTMs, incluindo D7fib (JONES et al, 2002.) Stro1 (STENDERUP et al, 2001.), CD45 e A Glicoforina (PITTENGER et al, 1999.; REYES et al., 2001; JONES Et al, 2004;., BMPR1a (ZVAIFLER et al., 2000).

**TABELA 3:** Marcadores de superfície celular de células-tronco mesenquimais (Adaptado de SALEM E THIEMERMANN, 2010).

Positivos	Negativos
CD09, CD10, CD13, CD29	CD45, CD34, CD14
CD123, CD124, CD126	CD11a, CD19, CD86
CD127, CD140a, CD166	CD80/CD40, CD15
CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5,	CD18, CD25
CCR10, VCAM-1, CD166, AL-CAM,	CD31, CD49d
ICAM-1, STRO-1(CD140b)	CD50, CD62E
HER-2/erbB2(CD340), frizzled-9	CD62P, CD117
CD349	

## **2.6.2 Células-tronco em cordão umbilical**

Nas últimas décadas, o cordão umbilical humano tem sido considerado como uma fonte alternativa à medula óssea para atender a demanda existente para fins terapêuticos por conta de seus componentes hematopoéticos e mesenquimais (WEISS & TROYER, 2006; SECCO et al, 2008a, ROMANOV et al, 2003). O cordão umbilical humano é obtido após o parto a termo do recém-nascido, de uma amostra que seriam inevitavelmente descartadas, por ser um órgão extra-embriônico, a coleta trata-se de procedimento não invasivo, indolor, e menos caro quando comparado com o recolhimento de células do aspirado de medula óssea. Adicionalmente ele contorna as questões éticas que envolvem as CTE e não causa danos para a saúde da mãe ou do recém-nascido (WEISS & TROYER, et al 2006; CAN & KARAHUSEYINOGLU, 2007; SECCO et al, 2008b). Em todo o mundo, bancos de sangue de cordão são formados e poderiam e deveriam ser utilizados para a obtenção de material celular. O sangue de cordão umbilical, na realidade, é o sangue fetal que fica retido na placenta no momento do nascimento, no qual é interrompida a circulação materno-fetal. Estudos mostram que as CTMs presentes no sangue de cordão são similares àquelas obtidas a partir de medula óssea no que diz respeito ao perfil morfológico e imunofenotípico e ao potencial de diferenciação (PANEPUCCI RA et al., 2004). No entanto, a presença de CTMs no sangue do cordão umbilical é controversa. Alguns pesquisadores conseguiram isolar essas células (LEE et al., 2004) enquanto outros falharam ou obtiveram baixo rendimento (ROMANOV et al., 2003). Mais recentemente, alguns grupos têm relatado sucesso em isolar e estabelecer culturas de CTMs a partir da veia cordão umbilical e estroma, também chamado de géleia de Wharton, sendo uma fonte importante de CTMs. A geléia de Wharton é um tecido conectivo e apresenta os mesmos marcadores de superfície das CTM o que sugere que estas células fazem parte da mesma família (TROYER & WEISS, 2008) (FIGURA 12).



**FIGURA 12.** Representação esquemática de um corte transversal do cordão umbilical humano, contendo células-tronco mesenquimais. CTMs podem ser isoladas da geléia de Wharton a partir de três compartimentos diferentes; zona perivascular (3), zona intervascular (4) e subamniótico (5). (Adaptada de TROYER & WEISS, 2008.)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. Geral:

- Investigar a participação dos canais iônicos envolvidos na regulação do volume celular das células-tronco mesenquimais obtidas da geléia de Wharton de cordão umbilical humano.

#### 3.2. Específicos:

- Isolar, cultivar e caracterizar as células-tronco mesenquimais obtidas de cordão umbilical humano;
- Estudar a cinética de Diminuição Regulatória do Volume (RVD) das células-tronco mesenquimais (CTMs);
- Estabelecer os canais iônicos participantes no mecanismo de RVD nas CTM;
- Validar a correlação entre o tamanho das hMSCs e a posição delas no ciclo celular;

**4 MANUSCRITO**

**ION CHANNELS IN VOLUME REGULATION OF MESENCHYMAL  
STEM CELLS OF WHARTON'S JELLY HUMAN UMBILICAL CORD**

## ABSTRACT

*Introduction:* Control of cell volume is essential for the survival of animal cells. It is important for various cell functions including proliferation. Using cancer cell lines it was shown that ion channels play a key role in cell volume regulation. However, there is not information about mechanisms of volume regulation in mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord (hwMSCs). Analysis of osmotic cell shrinkage and/or swelling provoked by osmotic challenger is called as a regulatory volume increase (RVI) and a regulatory volume decrease (RVD), and used for study of underlining mechanisms.

*Objectives:* This work was aimed to study ion channels (cationic and anionic) involved in volume regulation hwMSCs via analysis of cell response to hyposmotic shock and its relationship with the cell cycle contribute to understanding of relationships between ion activities and RVD.

*Methods and results:* The hwMSCs were isolated by spontaneous migration according to the protocol approved by the institutional Ethics Committee (Federal University of Pernambuco). The protocol is based uniquely on the capacities of MSCs to adhere to a plastic surface without enzymatic treatment. The cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with 20% bovine fetal serum (LGC) and 10% F-12 (Invitrogen), 100 U/ml of penicillin and 100 µg of streptomycin. Cultures were maintained in a humidified (80%) atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. In the RVD experiments, the hwMSCs were placed in a chamber attached to an inverted microscope with a video imaging system, being initially subjected to a shock hypoosmotic (300mOsm → 200mOsm) perfusion. The dynamics of change in volume was monitored for 30 minutes and images before (300 mOsm) and during the shock hypoosmotic (200 mOsm) were obtained every minute and analyzed using ImageJ software. Specific inhibitors of cellular anion (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid, NPPB) (Cl-channel) and cation (tetraethylammonium, TEA (Kv channel); glibenclamide, GB (Kir6.x channel); and 4-aminopyridine, 4-AP (channel K<sub>v1</sub>, KCNA)) permeability were used as molecular tools. In addition, hwMSCs (5x10<sup>6</sup> cells / ml, viability > 85%) in the absence and presence of TEA and GB, was monitored using a cell counter. The hwMSCs in isotonic conditions were grouped according to their cross-sectional area, considering that they are spherical and that its volume is correlated with the phases of the cell cycle (smaller, G0/G1, and higher in G2 / M). The results shown that hMSC hold the RVD process. The process was abolished in presence of all inhibitors TEA (10 mM), GB (100 µM), 4-AP (5 mM) and NPPB (100 µM). The maximum volume (V<sub>máx</sub>) was decreased by the inhibitors, suggesting also that they have influence in aquaporins.

*Conclusion:* hwMSCs possess mechanisms of volume regulation and various ion channels are involved, including ATP-and voltage-dependent potassium channels and chloride channels.

**Key words:** Cell volume, ion channel, mesenchymal stem cells, inhibitors.

## INTRODUCTION

The maintenance of a constant volume in the face of extracellular and intracellular osmotic perturbations is a critical problem faced by all cells. Most cells respond to swelling or shrinkage by activating specific membrane transport and/or metabolic processes that serve to return cell volume to its normal state. The cell volume is not only a consequence of cellular functions, but functions as a marker present in several physiological processes. This process has attracted a special way the interest of some scientists because of its importance in regulation of cell volume, control of membrane potential, pH homeostasis and transport of organic osmolytes and amino acids. It is also important in cell differentiation, cell proliferation, apoptosis and cell metabolism (LI GR, DENG XL., 2011; PASSANTES-MORALES H & MORALES-MULIA SM. 2007; KURBANNAZAROVA et al., 2003; WANG J, et al 2002; OKADA & MAENO, 2001; LANG et al., 2000; LANG et al., 1998). Cell proliferation is a fundamental property of tissue growth and cell reproduction; central in cell proliferation is the cell cycle. There are growing numbers of observations that show that progression through the cell cycle is linked to ion permeability of the plasma membrane and that pharmacological blockage of ion channels may lead to inhibition of cell proliferation (VILLAZ M, et al., 1995; CHEN LX, et al., 2007; LANG F, 2007; BURG ED, et al., 2008; DA SILVA, MB., et al, 2010).

Data indicate that the effect may be caused by disruption of cell volume control. The most experimental data about the role of ion channels in cell physiology were obtained from the study of immortal tumor cells (NILIUS, 2001; LANG F, 2007; OKADA, 2006; WEHNER, 2006; DA SILVA et al., 2010). It was established that the concurrent activation of potassium and chloride channels occurs during cell cycle progression (NILIUS, 2001; LANG et al., 1998; LANG et al., 2000; SHEN et al., 2000) while their block can interrupt this process in various cell types (ULLRICH and SONTHEIMER, 1997; LI et al., 2008; MIYAZAKI et al., 2008; DA SILVA et al., 2010; NILIUS and WOHLRAB, 1992; ROUZAIRE-DUBOIS and DUBOIS, 1998; WANG et al., 2008; BEETON et al., 2008). However, there is not information about mechanisms of volume regulation in mesenchymal stem cells. Analysis of osmotic cell shrinkage and/or swelling provoked by osmotic challenger is called as a regulatory volume increase (RVI) and a regulatory volume decrease (RVD), and used for study of underlining mechanisms. One of the mechanisms by which a cell can hold the RVD involves the loss of potassium and chloride by ion channels through their (OKADA, Y., 2004, HOFFMAN et al.,

2009), as well as the loss of large zwitterionic organic solutes such as glutamate, aspartate and taurine (KIRK, 1997, LANG et al., 2007).

The mesenchymal stem cells (MSCs) chosen as a model for this work, are targets of intense research currently, and believed to help to future cell therapy. In this case is essential the deep study of stem cell biology, including the mechanisms of proliferation and differentiation. The MSCs can be grown and expanded with high efficiency *in vitro* and induced to differentiate into multiple lineages: mesenchymal (adipocytes, osteocytes, chondrocytes) and other cell types such as neurons, hepatocytes (PARK et al., 2006; LEE et al., 2004; PURPURA et al., 2004), myocytes (POUNTOS & GIANNOUDIS, 2005, DENG et al., 2001), cardiomyocytes, neurons and astrocytes (BEYER NARDI N & DA SILVA MEIRELLES L, 2006; WANG et al., 2004; BIANCO P & GEHRON ROBEY P, 2000), endothelial cells (KESTENDJIEVA et al., 2008), insulin-producing cells (WU et al., 2009), germ-like cells (HUANG et al., 2010) under defined conditions.

The human umbilical cord (HUC) has been widely explored in recent years as alternative source of MSCs because they are functionally similar to stem cells derived from bone marrow (BM), regarded as a classic source. HUC collection is not invasive and less expensive than cells obtaining from the BM aspirate (where the method may cause infection, bleeding and chronic pain), moreover it is free from the ethical issues being an extra-embryonic organ usually discarded after birth without harm to mother or baby (WEISS AND TROYER, 2006; CAN and KARAHUSEYINOGLU, 2007; SECCO et al., 2008b).

The aim of this study was contribute to understanding of relationships between ion channels and RVD, by investigating study RVD in mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of human umbilical cord (hwMSC) and effects of ion channel inhibitors on amplitude of cell swelling under osmotic challenger and distribution the cells between phases of the cycle.

In here we demonstrated that the MSCs were able to undergo RVD and found that cation and anion channels blockers inhibition the RVD process, maintained swollen cells. Additionally the rate of initial cell swelling and maximal volume was influence by the type inhibitors channels, suggesting participation of aquaporins in swelling of the cells.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Collect of human umbilical cord**

The research protocol for all procedures was approved by the Ethics Committee (CONEP: n. 420-2007) at Federal University of Pernambuco, Brazil. There are numerous methods of isolation of hWJMSCs depending on both the origin of the tissue and the procedures adopted by laboratories (WANG ET AL., 2004; WEISS AND TROYER., 2006; WEISS ET AL., 2006; CAN AND KARAHUSEYINOGLU., 2007; PARK ET AL., 2007B; SECCO ET AL., 2008A; KANG ET AL., 2010; YANG ET AL., 2010)

Here, the fresh human umbilical cords from both sexes were obtained from mothers on programmed Caesarean sections (38-40 weeks). The cords were transported to the cell culture laboratory in sterile recipient with cold (4°C) PBS (pH 7.2) containing 2 mM EDTA, 150 µg/mL streptomycin, 150 U/mL penicillin and 5 µg/mL amphotericin (Sigma, St. Louis, MO, USA)) before tissue processing to obtain mesenchymal cells. The cords were processed within 6 hours from partum.

### **2.2 Isolation and primary culture of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of the human umbilical cord (hWJMSCs)**

The isolation method was based on migratory capacity of MSCs. The cords were individually rinsed and the vessels were perfused in fresh PBS. Then, the cord was cut into small pieces (approx. 2 cm length), and sectioned longitudinally. The vessels and arteries were removed, the Wharton's jelly tissue was exposed, minced into small fragments to expose a wider area of tissue to contact with the culture medium and transferred to a 75 cm<sup>2</sup> sterile flask containing DMEM low-glucose (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum (LGC Biotecnology), 20% Ham's F-12 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 50 U/ml and 50 µg/ml penicillin-streptomycin, respectively. Wharton's jelly tissue cultures were maintained in 37° C incubator with humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After 24 hours the medium was completely replaced. Approximately after 21 days of contact with plastic surface, the cord segments and non-adherent cells were completely removed. At this time, we observed some colonies of cells with fibroblastic-like morphology. The subconfluence process (70-80%) was monitored by phase-contrast microscopy (Leica DMIL; Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany). Adherent cells were trypsinized, harvested, counted and were then expanded by successive passages. The third passage (P3) hWJMSCs were used for analysis of their phenotype, differentiation capacities and subsequent studies of regulation volume.

### **2.3 Phenotypic analysis by flow cytometry**

For cell surface antigen phenotyping, third passage cells were detached and stained with various combinations of saturating amounts of monoclonal antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE). Standard flow cytometry techniques were used to determine the typical cell surface epitope profiles and to characterize them as mesenchymal stem cell. At least  $5 \times 10^6$  cells/mL (in 100  $\mu$ L) were incubated with the respective isotype monoclonal antibodies CD90-FITC PE (San Jose, CA, USA), CD44-FITC or CD29-FITC (Southern Biotech, Alabama, USA); CD45-PE, CD34-PE, CD31-PE (FK Biotec, RS, Brazil) (1/2000 diluted, 4° C, 60 min). The cells incubated with PBS instead fluorescence-labeled monoclonal antibodies were used as negative control. Antibodies associated with different fluorochromes (fluorescein isothiocyanate (FITC) and phycoerythrin (PE) were used to simultaneous analysis of two cell-specific antigens. At least 10000 events were acquired on flow cytometer (FACSCalibur with CellQuest software; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) in triplicate for each sample and the results were analyzed using FlowJo software (Version 7.6.1, Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) based on the mean percentage of positive cells and standard deviation from multiple experiments.

### **2.4 *In vitro* differentiation of hWJMSCs**

Osteogenic differentiation was induced by culturing sub-confluent (P3) hWJMSCs populations in growth medium DMEM-LG supplemented with 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate (Fluka-Sigma-Aldrich, MO, USA), 0.1  $\mu$ M dexamethasone (Medley S/A, SP, Brazil), and 200  $\mu$ M ascorbic acid (LAFEPE, PE, Brazil). Cells were fed with complete replacement of the medium in alternate days for 3 weeks.

Adipogenic differentiation was induced by DMEM-LG supplemented with 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 0.2 mM indometacin, and 10  $\mu$ g/ml insulin. The medium was replaced on alternate for 2 weeks or chondrogenic induction were cultures under chondrogenic medium containing 15% FBS, 1% ITS (BD), 100 nM dexamethasone, 2 mM pyruvate (SIGMA), and 10ng/ml transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1) in DMEM (Invitrogen, Carlsbad,CA) for 3 weeks.

After completion differentiation had been established by morphology, were used for the histochemical staining studies. Cells cultured maintained in growth medium without the factors of differentiation were used as control.

## 2.5 Histochemical staining

To assess the differentiation of **hWJMSCs** into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts *in vitro*, at the end of each specific protocol, the medium was removed and the cells were washed twice with PBS, fixed for 10 min at room temperature in 4% paraformaldehyde (PA), and washed twice again with PBS. Cells were fed with complete replacement of the medium on alternate days for 21 days. At days 7, 14, and 21, the cells were inspected under an optical microscope.

Cells treated with the osteogenic formula were stained with alkaline phosphatase and Von Kossa staining to reveal osteogenic differentiation.

To assay adipogenic differentiation, the fixed and washed cells were treated with Oil Red O (1%) for 30 minutes to observe the presence of lipid-rich vacuoles. The dyes were removed and the sample was washed several times with deionized water. Briefly, cells were fixed with methanol and stained with 1% silver nitrate (Sigma-Aldrich) for 45 minutes under ultraviolet light, followed by 3% sodium thiosulfate (Sigma-Aldrich) for 5 minutes, and then counterstained with hematoxylin-eosin. Analysis was made weekly to monitor better the timing of differentiation of cells.

Finally, the **hWJMSCs** were stained for collagen identification with alcian blue to demonstrate chondrogenic differentiation after this treatment.

## 2.6 Regulatory volume decrease (RVD)

### *Reagents*

Inhibitors of ion channels TEA, GB, NPPB and 4-AP and NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ATP, EGTA, DMSO, Tris and HEPES were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). 4-AP, NPPB and GB were dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide). Final concentrations of DMSO were always <0.1%. NPPB and GB were used at a concentration of 100 μM. Final concentration of TEA was 10 mM and 4-AP 5 mM. At used concentrations, these inhibitors did not affect cell viability and final osmolarity of the solution.

### *Measurement of RVD in individual cells*

**hWJMSCs** cultured in the flasks were harvested with 0.2% trypsin/1 mM EDTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) solution from passages P3 through P4, centrifuged and re-suspended in DMEM. The cell suspension was kept at 25°C and used the same day. For

optical recordings, an aliquot of the suspension was transferred to a chamber mounted on the inverted microscope (Leica DMIL; Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany) for 15–20 minutes. After that time, the cells attached to the bottom of the chamber, were subsequently perfused with the Ringer solution (mMol/l): (130 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2.8 KCl and 10 HEPES/TRIS, pH 7.4) mixed with solution of mannitol (300 mM) at the ratio of 2/1 (v/v). Final osmolarity of the mixture was ~300 mOsm/L. The hyposmotic solution used in RVD experiments was a mixture only of the control Ringer solution and water with final osmolarity of 200mOsm (DOROSHENKO et al., 2005). The osmolality of the solutions was measured with an Osmometer (*Fiske<sup>R</sup> Mark3, Fiske Associates, Massachusetts, USA*).

To study the cation and anion channels involvement in the mechanism of RVD, inhibitors of ion channels (TEA 10mM, GB 100μM, 4-AP 5 mM, NPPB 100μM) (Sigma-Aldrich, MO, USA) were placed in 200 mOsm - Ringer solution. Cell volume was measured using a video imaging system consisting of a CCD video camera (Moticam 2000, Quimis, Diadema, SP, Brazil) attached to inverted microscope.

Cell volume was measured using a video imaging system consisting of a CCD video camera (Moticam 2000, Quimis, Diadema, SP, Brazil) attached to Leica DMIL inverted microscope (Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany). Cell images were collected once per minute during the 30-minute recording. Each image was then analyzed off-line using a freeware image analysis program (ImageJ, NIH, USA). The cross-sectional area of single cells was measured and their volume approximated assuming spherical geometry. Cell volume was calculated using the below equation:

$$V = \frac{4}{3} S \sqrt{\frac{S}{\pi}}$$

Where, S is the area (μm<sup>2</sup>). The larger volume found in hypotonic solution was assigned as maximum volume (V<sub>máx</sub>). The cell volume was calculated about to the initial volume in isotonic medium as follows:

$$v = V/V_0$$

The mean values of *v* were indicated as percentages equal to 100% average in the first five minutes of recording.

### ***Measurement of RVD in cell Counter***

In separate experiments, cell Counter Vi-Cell<sup>®</sup> XR (Beckman Coulter, Inc.) was used to estimate change in volume of the population of large cells under osmotic stress. Method based on frequency of resistive pulse described by Coulter in 1956. For each experiment the suspension were used with approximately  $5 \times 10^6$  cells/ml and re-suspended in Ringer solution containing (mMol/l): 130 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2MgCl<sub>2</sub>, 2.8 KCl and 10 HEPES, with the pH adjusted to 7.4 with Tris-OH mixed with mannitol (300 mOsm/L) at the ratio of 2/1 (v/v). Cell viability measured by tripan blue exclusion assay was >85%; cell suspensions were kept at 25°C. The cells were analyzed as the average of the diameter. The experiments were performed in the absence and presence of inhibitors of potassium channels (100μM GB and 10 mM TEA). To study the RVD, cells were subjected to a shock hyposmotic (300mOsm → 200mOsm) and the process the change cell volume accomplished for 30min, with 10-12 readings.

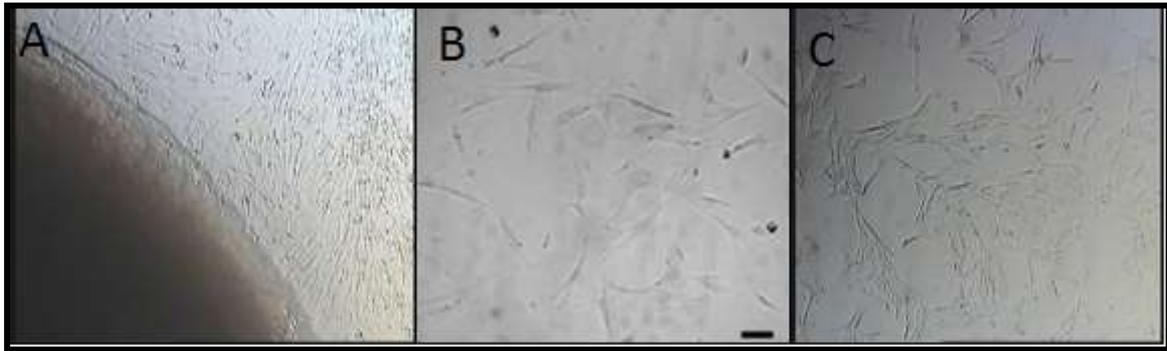
### ***Statistical analysis***

Data obtained with FACSCalibur flow cytometer were analyzed with the CellQuest Pro software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Unless otherwise indicated, data are presented as mean ± SEM of N experiments and, where appropriate, have been analysed using Student's t-test or one-way ANOVA followed by Tukey test. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1 Characterization of Mesenchymal Cells in Wharton' Jelly**

To determine whether stromal cells in Wharton's jelly of the umbilical cord have multipotent potential, we extracted cells from umbilical cords and cultured them in DMEM-Low supplemented 20% SFB and F-12. The reported are representative of the results obtained using 30 umbilical cords. By this approach, we regularly obtained cell populations elongated, spindle-shaped morphology with a single nucleus. Images of hwMSCs on the third passage a fibroblast-like phenotype are shown in **Figure 1**. The Wharton's Jelly of human umbilical cord contains mucoic connective tissue and fibroblast-like cells confirmed literature date (CAN A & KARAHUSEYINOGLU, S. 2007; CHEN Y., et al, 2007; WANG HS, et al., 2004; ROMANOV YA et al., 2003).

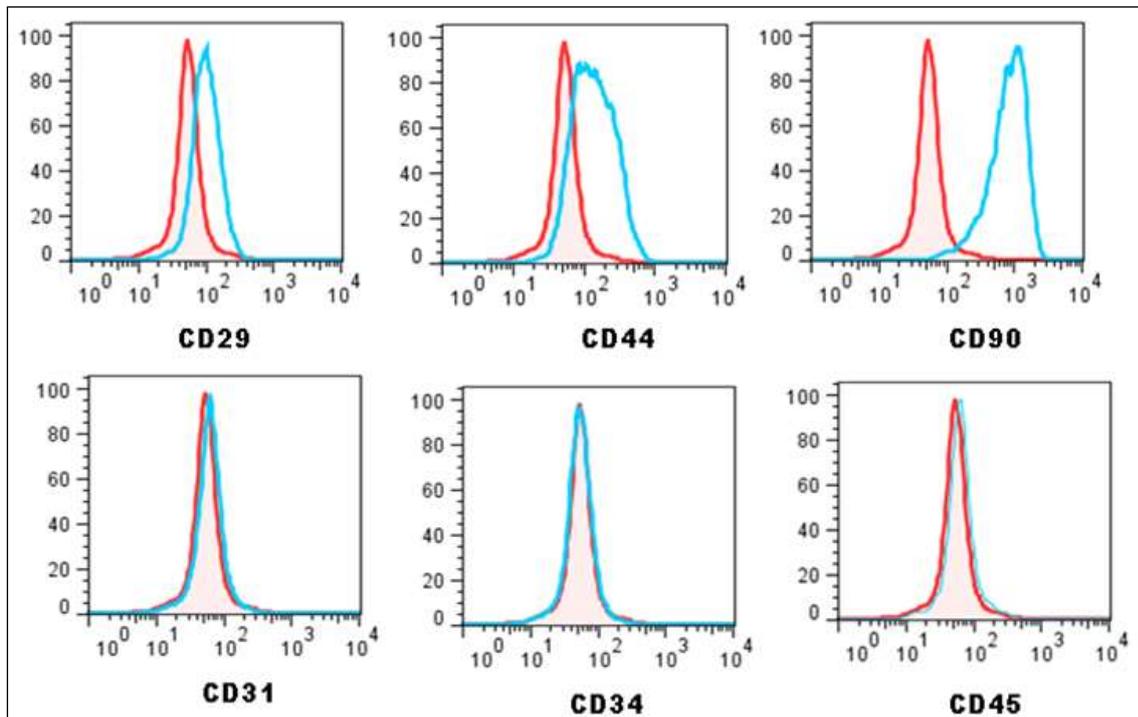


**Figure 1.** Representative sample of the typical fibroblastoid morphological aspect of MSC observed by phase microscopy. A: Tissue cell migration and adhesion to plastic. B: Cells expanding after 7 days. C: Cells after 14 days of expansion (Amplification, 100x).

In the cytometric analysis, hwMSCs that obtained from the homogeneous 70-80% confluent monolayers at passage 3 were positive for specific mesenchymal antigens such as adhesion molecules (CD44), integrin markers (CD29), and extracellular matrix protein (CD90), and were negative for hematopoietic line (CD34, CD45), endothelial (CD31) markers (**Figure 2**).

The experiments revealed the presence of two cells populations. The dominant pool of the cells ( $74.4 \pm 0.4\%$ ;  $n=3$ ) possessed high-density of these antigens (the fluorescent intensity increased almost twenty-folds,  $19.3 \pm 2.1$ ), in comparison with control level. Approximately a quarter of the cells ( $25.6 \pm 0.4\%$ ;  $n=3$ ) appeared to have a lower density of CD90 and CD44 with the fluorescent intensity of  $2.5 \pm 0.4$  folds above level. Integrin marker (CD29) was also presented and homogeneously distributed the control among these cells, albeit at low density, with the fluorescent intensity increase similar to that seen for subsidiary pools in case of CD90 and CD44.

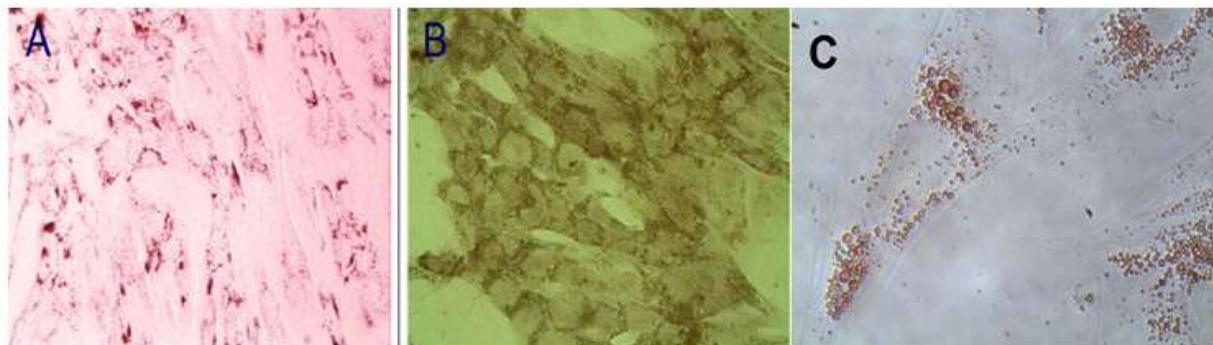
Thereby cell phenotype as assessed by FlowJo analysis could be defined as  $CD44^+$ ,  $CD90^+$ ,  $CD29^+$  and  $CD45^-$ ,  $CD34^-$ ,  $CD31^-$ . The symbol (-) indicates the negative expression for a marker while the symbol (+), positive expression. The cumulative results (Figure 3) suggest that stroma cells from Wharton's jelly are similar to MSCs and are in general agreement with the data available for mesenchymal stem cells isolated from other tissues (LA ROCCA et al., 2009; CAN & KARAHUSEYINOGLU, 2007; DOMINICI, 2006; HORWITZ E.M, et al., 2005).



**Figure 2.** Flow cytometry histograms showing the immunophenotype of hwMSCs for mesenchymal, endothelial and hematopoietic markers. Control is show in red.

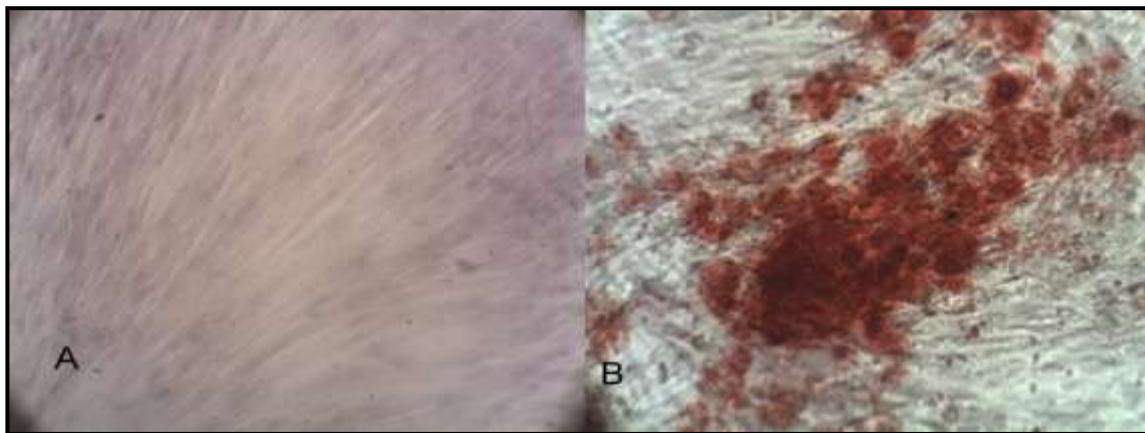
### 3.2 Osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal cells in Wharton’s Jelly

Differentiation potential is one of important characteristics of mesenchymal stem cells. Because this, the differentiation of hwMSCs to adipocytes and osteoblast was qualitatively assessed on the basis of cell morphology and cytochemistry. The presence of lipid-rich vacuoles stained with Oil Red, was used as a criterion to adipogenic differentiation. The induce hwMSCs during at 14 days are large, round shaped with lipid vacuoles (Figure 3).



**Figure 3.** Adipogenic differentiation A: Cells controls. B e C: Adipocytes, stained with Oil Red, where it is clear seen the lipid vesicles (Amplification, 40x).

hwMSCs were differentiated *in vitro* using osteogenic induction media. Three-four weeks after the osteogenic induction, the cells showed calcification and calcium crystal deposition stained Alizarin Red (Figure 4) that is not observed on the control conditions. The results confirmed the osteogenic differentiation which is characterized by the presence of mineralization of the extracellular matrix. Recently, under various culture conditions, the MSC have been found to able to differentiate into adipocytes and osteocytes in culture in according other autors (BYDLOWSKI SP et al 2009, WANG, H. et al., 2004; BARRY FP & MURPHY JM 2004; DE UGARTE, D.A., et al., 2003; COVAS D.T, et al 2003; PITTENGER M.F, et al. 1999).



**Figure 4.** Osteogenic differentiation. A: Cells controls. B: Mesenchymal cell differentiated in osteoblast, stained with Alizarin Red, due to calcium deposits (Amplification, 100x).

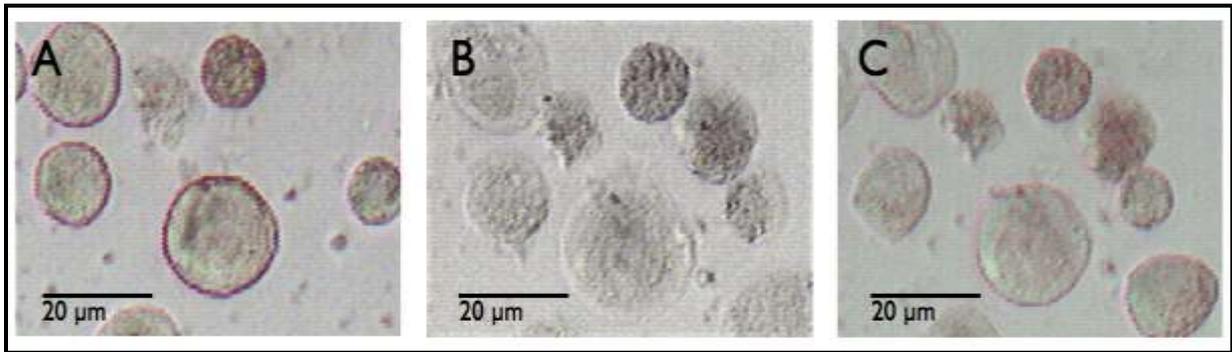
### 3.3 Regulatory Volume Decrease (RVD)

#### RVD of individual cells

It is known that several cell types function as miniature osmometers in response to stress osmotic caused by alteration of bath solution osmolality. To discover whether the hwMSCs exhibit this behavior, initially, submitted the cells to the RVD process (shock hypotonic) in the absence of inhibitors (Figure 5). The study was based on monitoring the kinetics of volume increase and recovery of these cells. The 67% hypotonic solution had osmolarity of isotonic solution.

There are growing numbers of observations showing that progression through the cell cycle is linked with ion permeability of the plasma membrane and that pharmacological blockage of ion channels may lead to inhibition of cell proliferation (DOROSHENKO P, et al 2001; OKADA Y 2004; OKADA Y 2006; ANDERSON EC. 1969). The data indicate that the effect may be caused by disruption of cell volume control. Participation of ion channels in cell

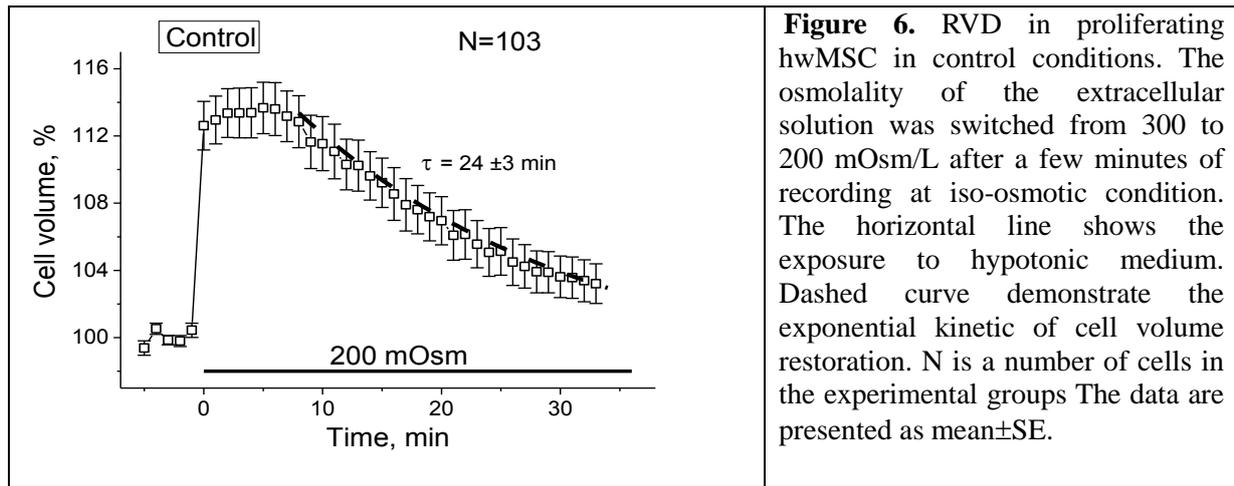
volume regulation is most prominent in the recovery of volume by swollen cells. It is believed that during this process, called regulatory volume decrease (RVD), swollen cells lose water by expelling intracellular solutes via  $\text{Cl}^-$  and  $\text{K}^+$  channels. Used the inhibitor of ion channels allow to identify functional ion channels involved in RVD and, therefore, presented in plasma membrane of the examined cells.



**Figura 5.** RVD in hwMSCs. A: Cells in isotonic solution (300 mOsm). B: Immediately after hyposmotic challenge (200 mOsm). C: Cells exposed to hypotonic solution after 30 minutes.

We for the first time demonstrated that hwMSC are able to undergo RVD. The examination of RVD was done with individual cells with simple geometry (N=103). To characterize RVD, we evaluated the following parameters: used the relative units to determine the maximal swollen volumes ( $V_{\text{máx}}$ ) (a few minutes after osmotic shift), the rates of cell shrinkage and final volumes ( $V_{\text{final}}$ ) attained by the end of the measuring period (30 min after the osmotic shift).

Under influence of 200mOsm hypotonic solution the cells initially became swollen to  $113 \pm 3\%$  ( $V_{\text{máx}}$ ) of its pre-swelling volume 1 minute after exposure hypotonic shock and then gradually recovered their volume reaching the  $V_{\text{final}}$  ( $104 \pm 1.3\%$ ). Characteristic time for this process was  $24 \pm 3$  min (Figure 6).



**Figure 6.** RVD in proliferating hwMSC in control conditions. The osmolality of the extracellular solution was switched from 300 to 200 mOsm/L after a few minutes of recording at iso-osmotic condition. The horizontal line shows the exposure to hypotonic medium. Dashed curve demonstrate the exponential kinetic of cell volume restoration. N is a number of cells in the experimental groups. The data are presented as mean $\pm$ SE.

We have found that 4-AP /TEA classical inhibitors of voltage-gated potassium channels (Kv) and Gb (Glibenclamide) inhibitor of ATP-dependent K<sup>+</sup> channels (Kir6.x) significantly altered hwMSCs response to hypotonic challenger. Results (Figure 7 A-C) show cells increased volume, but did not recovered during entire recording period (30min) compared with cells in the control condition (Figure 6), occurring completely blocked RVD process.

Interestingly, rate of swelling ( $\tau_{\text{swell}}$ ), and peak volume in hypotonic solution ( $V_{\text{m\acute{a}x}}$ ) were dependent on type of inhibitor. In the presence of 4AP the amplitude of the initial swelling reached  $\sim 60\%$  of the control value and then very slowly ( $\sim 0.1\%/min$ ) or considerably ( $\sim 1\%/min$ ) increased in the presence of 4AP and TEA, respectively. In the latter case, the increase in cell volume reached of  $\sim 150\%$  of the control at 20 min of action and continues to be at this level for the entire recording period.

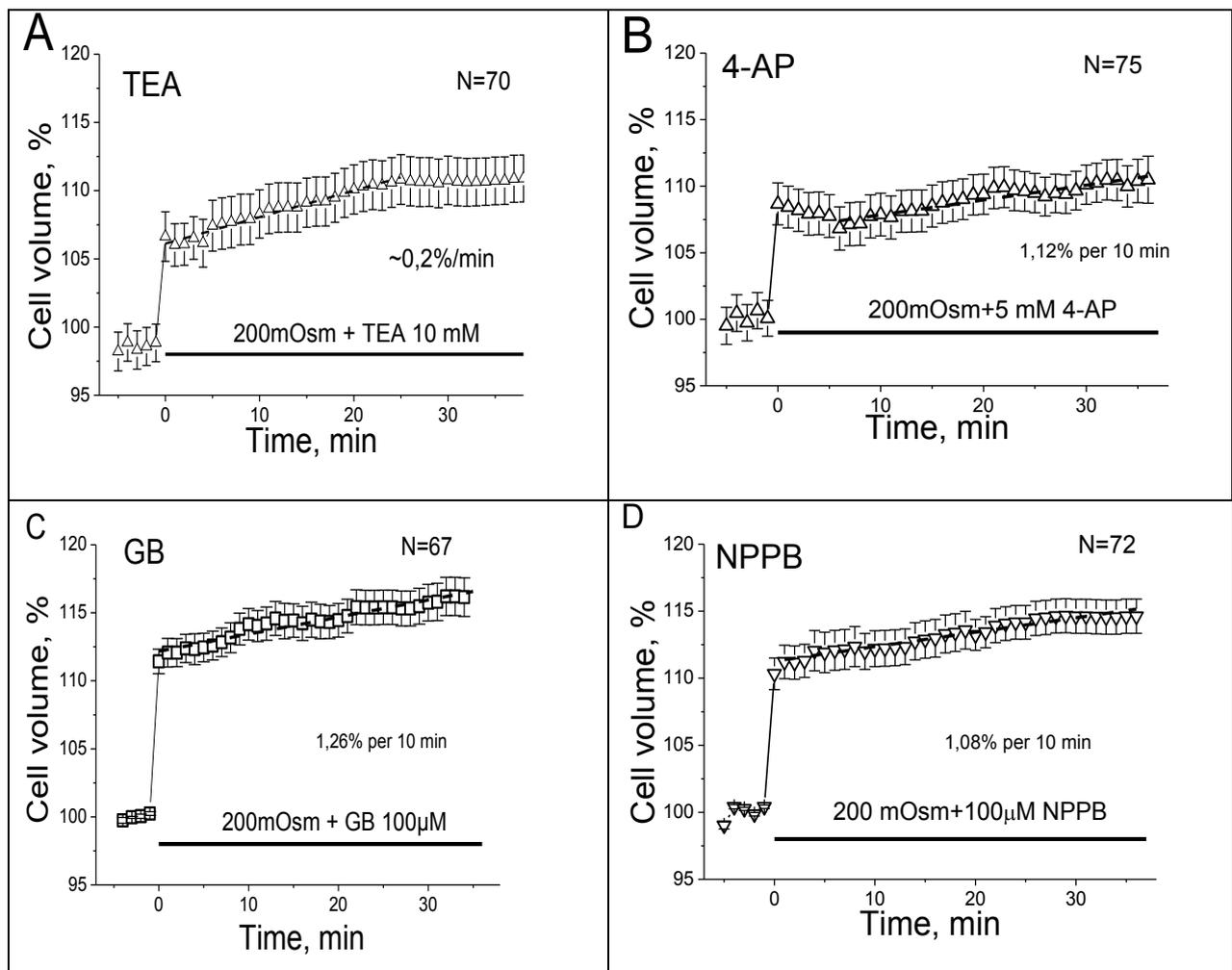
When 4-aminopyridine (4-AP) is in bath solution the cells show a reduction of percentage of the initial volume (volume after osmotic change),  $107\pm 0.7$ , showing a less of  $\sim 3\%$ , when compared with control. Reaching the  $V_{\text{m\acute{a}x}}$  ( $108\pm 2.6$ , N=75) in 30 minutes (still under the control  $V_{\text{m\acute{a}x}}$ ) and remained so during period observed.

In case of TEA added in hypotonic solution, the increase in the volume was  $108 \pm 0.7$ , N = 70, approximately 4% lower when compared to the control group, and the maximum volume ( $V_{\text{m\acute{a}x}}$ ) achieved slowly ( $110 \pm 2.6$ ) in 25 minutes.

Already in the presence the inhibitor Gb in bath solution, the  $V_{\text{m\acute{a}x}}$  was  $110 \pm 0,8$  of its pre-swelling volume, about 3% lower the control group. In this case (Gb) the  $V_{\text{m\acute{a}x}}$  ( $115 \pm 1,2$ ; N=67), still elevated.

The decrease in the amplitude of the initial cell swelling in the presence these three inhibitors may indicate the ability of the cation channels blockers to water influx. This

supposition is consistent with observation that GB and TEA can affect aquaporin function (YOOL AJ, et al., 2002; YOOL AJ 2007). However, GB, is not absolutely specific for cell-dependent  $K^+$  channels ATP-dependent as with practically all other ion channel blockers, can affect different types of ion channels including ATP-dependent  $K^+$  channels, CFTR,  $Ca^{2+}$  and swelling-activated  $Cl^-$  channels (LIU Y, et al., 1998). The other possible mechanism of such effect of the cation channel blockers is indirect one and based on the observation that water transport pathways may be structurally coupled to other membrane transport processes (BLANK ME., et al 2003).



**Figure 7.** RVD in proliferating hwMSC in the presence of specific inhibitor of cellular anion and cation permeability. Final concentration of TEA and 4-AP were 10mM and 5mM, respectively. GB and NPPB used at concentration of 100 $\mu$ M. Note the changes in RVD induced by pharmacological blockade of the cell membrane permeability. The data are presented as mean  $\pm$  SE.

In the presence the NPPB 5-nitro-2-(3-phenylpropyl-amino) benzoic acid ( $Cl^-$  channel blocker) was also able to inhibit RVD (Figure 7D). In this case the initial increase in cell

volume was practically equal ( $112 \pm 2\%$ ) to control ( $113 \pm 3\%$ ). However, the cells did not hold RVD and their volumes remained increased during the entire recording period (30min). The  $V_{final}$  ( $114 \pm 1.2$ ,  $N = 72$ ) was reached 30 min after solution changer

No volume restoration was established if TEA, GB, 4-AP or NPPB were introduced into bath solution. Thus, in the presence of inhibitors cells became swollen, but did not undergo regulatory volume decrease. Results show (Figure 7) the presence of (and participation in RVD)  $Cl^-$  and  $K^+$  channels,  $HCO_3^-/Cl^-$  transporter in plasma membrane of the cells mesenchymal stem cells of Wharton's jelly. These results in general agreement with studies of volume regulation in other cells types as Vero cells, cells of nasopharyngeal carcinoma, breast cells (DA SILVA, M.B et al., 2010; CHEN Y, et al., 2007; ROUZAIRE-DUBOIS & DUBOIS., 1998).

It seems that plasma membrane proteins involved in cell volume homeostasis of hWJMSC cells are assembled in a functional platform where ion channels can physically interact with each other and with important effectors of physiologically relevant processes as it has been suggested for some other cells (23-27).

Considering the averages of each group during the 30 min, we observed a regression of the control relative to inhibitors as shown in the table below.

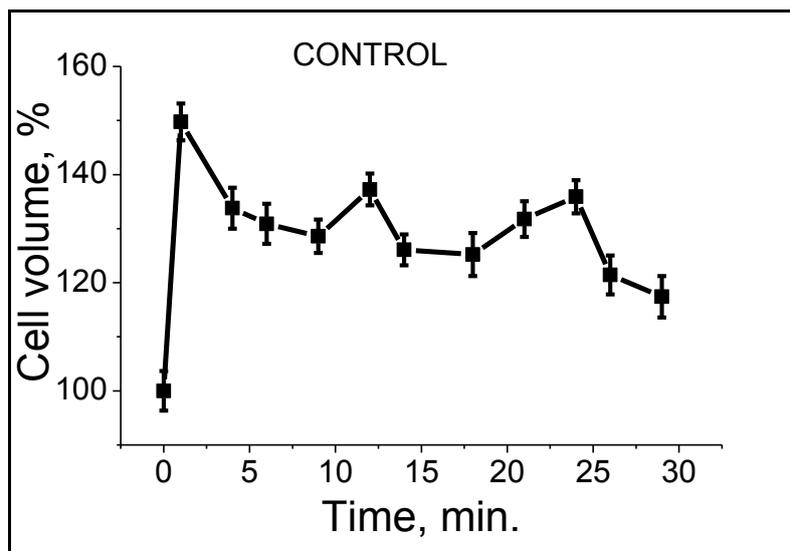
**Tabel 1** – Group means

Geral	N	Min	Máx	Média	Mediana	Desvio	Erro	p-valor
4 AP	2577	82	138	108,3	106,78	8,14	0,16	< 0,0001
Controle	2695	88	145	107,58	105,52	8,96	0,17	
GB	3545	80	154	111,3	109,92	10,7	0,18	
NPPB	2513	95	181	112,63	110,26	11,29	0,23	
TEA	2415	52	174	110,07	108,4	10,64	0,22	

Obs: Statistical difference between all groups (Anova e Tukey)

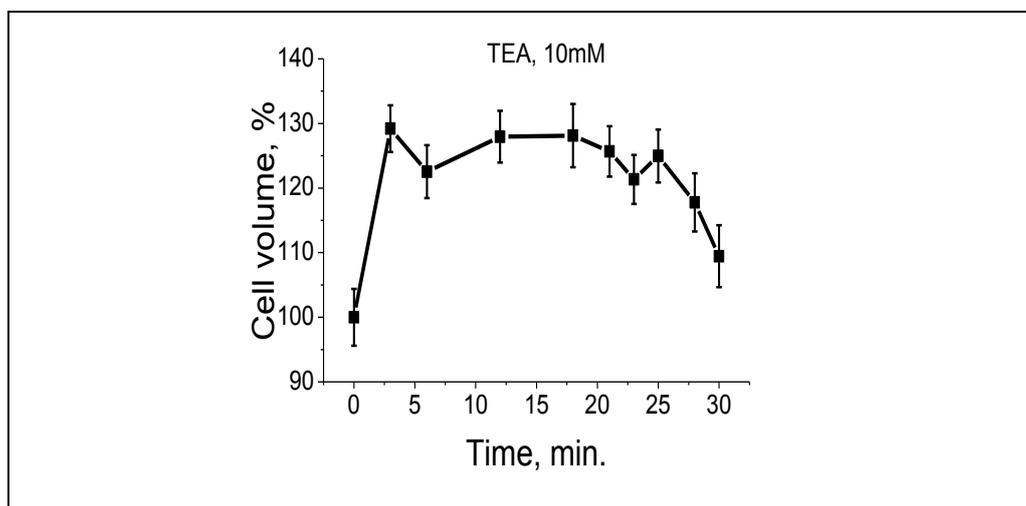
## RVD by Counter Cell

To confirm results in unit cells we analysed changes in volume of a large population of the cells ( $5 \times 10^6$  cells/ml) under osmotic challenges ( $300\text{mOsm} \rightarrow 200\text{mOsm}$ ) using Cell Counter. Cells submitted to hypotonic shock ( $200\text{mOsm}$ ) showed a frequency of large diameter those isotonic conditions ( $300\text{mOsm}$ ). Gradually restoring its size during time interval (30min) (Figure 8).



**Figure 8.** Kinetics of volume regulation in hwMSCs without inhibitors. (Ringer's solution + mannitol - Ringer) observed during 30 min ( $5 \times 10^5$  cells / ml, N = 4 experiments).

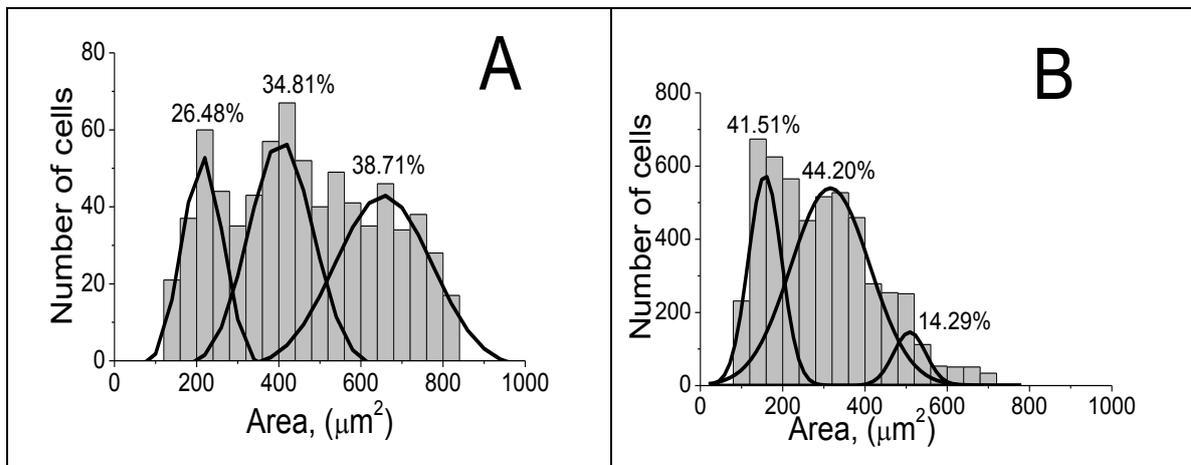
It could be seen that cells in absence of any pharmacological agents undergo RVD which is consistent with results obtained unit cells by microscopy. However, application of channel inhibitors TEA (10 mM) and Gb (100  $\mu$ M) in bath solution hypotonic, blockade of RVD process probably due to modification of potassium channels. Cell counter can be used as an excellent tool for analysis of RVD (Figure 9).



**Figure 9.** Influence of TEA (10 mM) on the response of hwMSCs to hypotonic shock (200 mOsm). Cell suspension ( $5 \times 10^5$  cells / ml) viability > 90%. (N = 2).

### 3.4 Size Distribution of hwMSCs

Cell size is a fundamental attribute impacting cell design, fitness and function. In cell cultures, the cell population normally was present in different phases of the cell cycle, independent of one another, or unsynchronized. In this paper, the knowledge about the correlation between cell size and cell cycle was used to determine cells at different cell cycle phase (HABELA & SONTHEIMER, 2007, DA SILVA et al., 2010; DENG, X. L., et al. 2001; UHAL, B. D., et al 1998). hwMSCs were grouped arbitrarily in 3(three) classes (A, B e C) according to their cross-sectional area of cells (a directly measured parameter of cell size) of the cells in isotonic conditions, assuming that they are spherical and that its volume is directly linked to its position in the cycle cell and by Cell Counter (ViCell) according to the frequencies of media diameters in unsynchronized cultures in isotonic osmolarity condition, which may indeed respectively match cells of G0/G1, S and G2M phases of the cell cycle. The advantage of this approach is in not using any chemical and hence in preserving the normal physiological conditions of the cells. The size distribution of unsynchronized hwMSCs is demonstrated in Figure 10.



**Figure 10.** The size distribution of hwMSCs. A. Method Manual. A (160-320  $\mu\text{m}^2$ ), B (321-520  $\mu\text{m}^2$ ) e C > 521  $\mu\text{m}^2$  (N= cell number; 744). B. Counter cell. A (100-220  $\mu\text{m}^2$ ), B (221-420  $\mu\text{m}^2$ ) e C > 421  $\mu\text{m}^2$ . (N= 5047). Maximal value of each Gaussian used to fit the histogram.

Our results indicated that individual cells under hypotonic challenge achieved much larger volumes than indicated by Cell counter (Table 2) According to this distribution based on your cell size we observed that the greater percentage of cells are found in phases G0/G1 and S the cell cycle.

Phases	Cell Size ( $\mu\text{m}^2$ )					
	N	Min	Max	Media	SD	%
<b>G0/G1</b>						
Manual	197	135.21	318.50	241.75	7.72	26.48
ViCell	2095	105.43	219.77	156.94	4.84	41.51
<b>S</b>						
Manual	259	321.50	519.40	405.10	12.01	34.81
ViCell	2231	245.83	432.86	316.06	13.81	44.20
<b>G2/M</b>						
Manual	288	523.05	820.37	655.18	25.80	38.71
ViCell	721	444.66	614.66	508.69	18.25	14.29

**Table 2.** Size distribution of hwmSCs and its relationship with the cell cycle.

#### 4. CONCLUDING REMARKS

In summary, we found that the ability of swollen mesenchymal stem cells of Wharton's jelly (hwmSCs) to restore volume by regulatory volume decrease (RVD) process.

Study the response of hwmSC to hypo-osmotic challenge revealed the presence of potassium large conductance calcium-activated channel ( $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ ) voltage-gated potassium channels ( $\text{K}_v$ ), in plasma membrane of mesenchymal stem cells of Wharton's jelly.

The importance of  $\text{Cl}^-$  and  $\text{K}^+$  channels in determining RVD in hwmSCs has been confirmed by showing that its pharmacological suppression (with four widely) resulted in practically complete inhibition of process. Then, hwmSCs possess mechanisms of volume regulation and various ion channels, including ATP-( $\text{Kir}6.x$ ) and voltage-dependent potassium channels ( $\text{K}_v$ ) and chloride channels are presented in their plasma membrane. Additionally the rate of initial cell swelling and  $V_{\text{máx}}$  was influenced by the type inhibitors suggesting the participation aquaporins.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE). We thank the Hospital DeÁvila (Recife, PE) for the assistance with the donation of umbilical cords. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FioCruz) for the assistance with citometry analysis of the cell.

## REFERENCES

1. ANDERSON, B. C. et al. Determination of volume growth rate and division probability. *Biophysical Journal*. 9: 246-263. 1969.
2. BARRY FP & MURPHY JM 2004. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*;36:568–584.
3. BEETON C., et al., 2008. The D-diastereomer of ShK toxin selectively blocks voltage-gated K<sup>+</sup> channels and inhibits T lymphocyte proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 283:988-997.
4. BEYER NARDI N & DA SILVA MEIRELLES L. 2006. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*;174:249-82.
5. BIANCO P, GEHRON ROBEY P. 2000. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest*;105:1663–1668.
6. BLANK M AND EHMKE H. 2003. Aquaporin-1 and HCO<sub>3</sub><sup>(-)</sup>-Cl<sup>-</sup> transporter-mediated transport of CO<sub>2</sub> across the human erythrocyte membrane. *J. PHYSIOL*, 550(Pt 2):419-429.
7. BURG ED, et al 2008. Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications. *Br. J. Pharmacol*. 153, S99–S111.
8. BYDŁOWSKI SP et al 2009. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev.Bras.Hematol.Hemoter*, São Paulo , v. 31, supl. 1.
9. CAN, A. AND S. KARAHUSEYINOGLU. 2007. Concise review: Human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* 25:2886-2895.
10. CHEN L.X, et al. 2007. Roles of volume activated Cl<sup>-</sup> currents and regulatory volume decrease in the cell cycle and proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Prolif*.40, 253–267.
11. CHOUMERIANOU, D. M., et al. 2008. Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Eng Part B Rev*. 14:53-60.
12. COVAS D.T, et al.2003. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* ;36:1179 –1183
13. DEANS RJ, MOSELEY AB. 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses, *Exp Hematol*; 28:875-884.
14. DENG, X. L., et al. 2001. Cell cycle-dependent expression of potassium channels and cell proliferation in rat mesenchymal stem cells from bone marrow. *Cell Prolif*. 40:656-670.
15. DE UGARTE, D.A., et al., 2003. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol. Lett*. 89, 267–270.
16. DOMINICI, M., et al. 2006 Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-7.
17. DOROSHENKO P, et al 2001. Cell cycle-related changes in regulatory volume decrease and volume-sensitive chloride conductance in mouse fibroblasts. *J. Cell. Physiol*. 187, 65–72.

18. FRIEDRICH, B. et al. 2006. Cell volume regulatory mechanisms. In: Florian Lang (Ed.). Mechanisms and significance of cell volume regulation. First edition. Basel: Karger. 152: 1-8.
19. FUCHS, E. AND J. A. SEGRE. 2000. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100:143-55.
20. HABELA, C. W. & SONTHEIMER, H. 2007. Cytoplasmic Volume Condensation is an Integral Part of Mitosis. *Cell Cycle*. 1; 6(13): 1613–1620.
21. HOFFMAN, E. K. et al. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiology Reviews*. 89: 193-277.
22. HORWITZ E.M, et al., 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
23. UHAL BD, et al. 1998. Cell size, cell cycle, and alpha-smooth muscle actin expression by primary human lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 19, L998–L1005.
24. HUANG P, et al., 2010. Differentiation of human umbilical cord Wharton Jelly –derived Mesenchymal stem cells into germ-like cells in vitro.
25. JANÁČEK, K. AND SIGLER, K. 2000. Osmosis: Membranes Impermeable and Permeable for Solutes , Mechanism of Osmosis across Porous Membranes. *Physiology Research*. 49: 191-195.
26. JORGENSEN, P. & M. TYERS. 2004. How cells coordinate growth and division. *Current Biology* 14: R1014-R1027.
27. KARAHUSEYINOGLU S., et al. 2007. Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. **STEM CELLS** 25:319–331.
28. KESTENDJIEVA S., et al 2008. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. **Cell Biology International** 32, 724-732.
29. KIRK, K. 1997. Swelling-activated organic osmolyte channels. *J. Membr. Biol.* 158:1-16.
30. KURBANNAZAROVA, R. S., et al. 2003. Osmotic water permeability and regulatory volume decrease of rat thymocytes. *Gen. Physiol Biophys.* 22:221-232.
31. LANG, F. 2007. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am. Coll. Nutr.* 26:613S-623S.
32. LANG, F., et al. 1998. Ion channels, cell volume, and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem.* 8:285-292.
33. LANG, F., et al. 2000. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem.* 10:417-428.
34. LA ROCCA, G., et al. 2009. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cordmatrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol* 131:267–282.
35. LEE O.K., et al. 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood** 103:1669-1675.
36. LI, G. R. AND D X. L. DENG. 2011. Functional ion channels in stem cells. *World Journal of Stem Cells* 3:19-24.

37. LI, M., et al. 2008. Cl-channel blockers inhibit cell proliferation and arrest the cell cycle of human ovarian cancer cells. *European Journal of Gynaecological Oncology* 29:267-271.
38. LIU Y, et al 1998. Glibenclamide blocks volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels by dual mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 44, C343–C351.
39. MIYAZAKI, H. A. et al. 2008. Chloride ions control the G(1)/S cell-cycle, checkpoint by regulating the expression of p21 through a p53-independent pathway in human gastric cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366:506-512.
40. NILIUS, B. 2001. Chloride channels go cell cycling. *J. Physiol* 532:581.
41. NILIUS, B. & W. WOHLRAB. 1992. Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J. Physiol* 445:537-548.
42. OKADA, Y. 2006. Cell volume-sensitive chloride channels: phenotypic properties and molecular identity. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *Contrib. Nephrol.* 152, 9–24.
43. OKADA, Y. 2004. Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and sensor mechanisms. *Cell Biochem. Biophys.* 41:233-258.
44. OKADA, Y. AND E. MAENO. 2001. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol* 130:377-383.
45. PARK, K. S., et al. 2006. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Journal of Veterinary Science* 7:343-348.
46. PASSANTES-MORALES, H. Amino Acids and Brain Volume Regulation: Contribution and Mechanisms. In: OJA, S. S. et al. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Third Edition. Heidelberg Berlin: Springer-Verlag. 10: 225-248. 2007.
47. PITTENGER M.F, et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
48. POUNTOS, I AND GIANNOUDIS, P.V. 2005. Biology of mesenchymal stem cells. **Injury**, New York, v.36, n.3, p.8-12.
49. PURPURA, K.A., et al., 2004. Sustained in vitro expansion of bone progenitors is cell density dependent. *Stem Cells* 22, 39–50.
50. QIAO, C, et al. 2007. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Int.* ; 32:8–15.
51. ROMANOV, Y.A., et al, 2003. Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. *Stem Cells*, v. 21, p. :105-110.
52. ROUZAIRE-DUBOIS, B. AND J. M. DUBOIS. 1998. K<sup>+</sup> channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *J. Physiol* 510 (Pt 1):93-102.
53. SALEM, H. K. AND C. THIEMERMANN. 2010. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 28:585-596
54. SECCO, M., E. et al., 2008b. Multipotent stem cells from umbilical cord: Cord is richer than blood! *Stem Cells* 26:146-150.

55. SHEN, M. R., et al. 2000. Volume-sensitive KCl cotransport associated with human cervical carcinogenesis. *Pflügers Arch.* 440:751-760.
56. STRANGE K et al., 2004. Cellular volume homeostasis. *Adv Physiol Educ* 28: 155–159.
57. TROYER, D. L. AND M. L. WEISS. 2008. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 26:591-599.
58. ULRICH, N. AND SONTHEIMER, H. Cell cycle-dependent expression of a glioma-specific chloride current: proposed link to cytoskeletal changes. **Am. Journal of Physiology Cell Physiology.** 273:1290-1297. 1997.
59. VILLAZ, M., J. C, et al. 1995. A voltage-gated chloride channel in ascidian embryos modulated by both the cell cycle clock and cell volume. *J. Physiol* 488 ( Pt 3):689-699.
60. WANG, J., et al, 2002. IK channels are involved in the regulatory volume decrease in human epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **284**, C77–C84.
61. WANG, H. S., et al., 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22:1330-1337.
62. WEISS, M. L. AND D. L. TROYER. 2006. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Reviews* 2:155-162.
63. WEHNER, F. 2006. Cell volume-regulated cation channels. *Contrib. Nephrol.* 152:25-53.
64. WU, L. F., et al. 2009. Differentiation of Wharton's Jelly Primitive Stromal Cells into Insulin-Producing Cells in Comparison with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A* 15:2865-2873.
65. YOOL, A. J. 2007. Functional domains of aquaporin-1: Keys to physiology, and targets for drug discovery. *Current Pharmaceutical Design* 13:3212-3221.
66. YOOL, A. J., et al. 2002. Tetraethylammonium block of water flux in Aquaporin-1 channels expressed in kidney thin limbs of Henle's loop and a kidney-derived cell line. *BMC Physiol* 2:4

## 5 CONCLUSÃO

- As hwMSCs apresentaram morfologia fibroblastóide (fusiforme) e foram positivas para os marcadores de superfície das células-tronco mesenquimais.
- As hwMSCs possuem mecanismos de regulação do volume (RVD) e vários canais iônicos estão envolvidos, incluindo canais de potássio dependentes de voltagem (Kv) e ATP (Kir6.x), e canais de cloreto (CLC e CFTR) e sugere o envolvimento de aquaporinas na membrana plasmática das células-tronco mesenquimais obtidas da géleia de Wharton do cordão umbilical humano.

## REFERÊNCIAS

- AGRE P, KOZONO D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. **FEBS Lett** 2003;555:72–78.
- AEJAZ, H. M., et al 2007. Stem cell therapy-present status. **Transplant. Proc.** 39:694-699.
- ALPER, S. L. Molecular physiology of SLC4 anion exchangers. **Experimental Physiology.** 91.1:153-161. 2006.
- ANDERSON, B. C. et al. Determination of volume growth rate and division probability. **Biophysical Journal.** 9: 246-263. 1969.
- AL-AWQATI, Q. AND J. A. OLIVER. 2002. Stem cells in the kidney. **Kidney Int.** 61:387-395.
- BAKSH D, et al. 2007. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. **Stem Cells;** 25:1384-92.
- BEYER NARDI N & DA SILVA MEIRELLES L. 2006. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Handb Exp Pharmacol;**174:249-82.
- BIANCO P, GEHRON ROBEY P. 2000. Marrow stromal stem cells. **J Clin Invest;** 105:1663–1668.
- BIEBACK K, et al. 2004. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem Cells.;** 22:625–634.
- BLUM B & BENVENISTY N. 2008. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. **Adv Cancer Res;** 100:133–158.4
- BITTENCOURT, R.A.C.; et al. 2006. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.14, n.1, p.22-24.
- BUSCH, A. E., & J. MAYLIE. 1993. MinK channels: a minimal channel protein with a maximal impact. **Cell. Physiol. Biochem.** 3: 270–276.
- BYDLOWSKI SP et al 2009. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev.Bras.Hematol.**Hemoter, editor.
- CAN, A. AND S. KARAHUSEYINOGLU. 2007. Concise review: Human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. **Stem Cells.** 25:2886-2895.
- CASTRO-MALASPINA H, et al. 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. **Blood** 56:289–301.
- CHEN, J. C. AND D. J. GOLDHAMER. 2003. Skeletal muscle stem cells. **Reprod. Biol. Endocrinol.** 1:101.
- CHOUMERIANOU, D. M., et al. 2008. Stem cells: promises versus limitations. **Tissue Eng Part B Rev.** 14:53-60.
- CLARKE D.L., et al. 2000. Generalized Potential of Adult Neural Stem Cells. **Science** Vol. 288. no. 5471, pp. 1660 – 1663, 2000.
- COOPER, S. 2003. Rethinking synchronization of mammalian cells for cell cycle analysis. **Cell Mol. Life Sci.** 60:1099-1106.
- DEANS RJ, MOSELEY AB. 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses, **Exp Hematol;** 28:875-884.

- DE BARI C, et al. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheum.** 2001 Aug;44 (8):1928-42.
- DENG, X. L., et al. 2001. Cell cycle-dependent expression of potassium channels and cell proliferation in rat mesenchymal stem cells from bone marrow. **Cell Prolif.** 40:656-670.
- DE COPPI PD, et al. 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nat Biotechnol;** 25:100-106.
- DEL CARLO R.J., et al. 2008. Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. **Ciênc. vet. tróp.**, v. 11 (1), p.167-169.
- DE UGARTE, D.A., et al., 2003. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. **Immunol. Lett.** 89, 267–270.
- DOROSHENKO, P., et al 2001. Cell cycle-related changes in regulatory volume decrease and volume-sensitive chloride conductance in mouse fibroblasts. **J. Cell Physiol** 187:65-72.
- DUTTA, A. K. et al. Regulation of an ATP-conductive large-conductance anion channel and swelling-induced ATP release by arachidonic acid. **Journal of Physiology.** 542.3: 803–816. 2002.
- EGGERMONT, J. et al. . 2001. Cellular function and control of volume-regulated anion channels. **Cell Biochemistry and Biophysics.** 35: 263-274.
- FERRARIS JD & BURG MB. 2006. Tonicity-dependent regulation of osmoprotective genes in Mammalian cells. **Contrib Nephrol** 152:125-141.
- FIDORRA, J., T. , et al. 1981. Cellular and Nuclear Volume of Human-Cells During the Cell-Cycle. **Radiation and Environmental Biophysics** 19:205-214.
- FRIEDENSTEIN AJ, et al.1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea- pig bone marrow and spleen cells, **Cell Tissue Kinet.**, **3**: 393-403.
- FRIEDRICH, B. et al. 2006. Cell volume regulatory mechanisms. In: Florian Lang (Ed.). Mechanisms and significance of cell volume regulation. First edition. **Basel: Karger.** 152: 1-8.
- FUCHS, E. and J. A. SEGRE. 2000. Stem cells: a new lease on life. **Cell** 100:143-55.
- FUCHS, E., T. TUMBAR, and G. GUASCH. 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell** 116:769-778.
- FÜRST, J. et al. 2002. Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells. **Eur. Journal of Physiology.** 444: 1-25.
- GAMBA, G. 2005. Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters. **Physiology Reviews.** 85: 423-493.
- GAO, J., et al., 2001. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. **Cells Tissues Org.** 169, 12–20.
- GUAN, K., et al. 2006. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. **Nature** 440:1199-1203.
- GUYTON, A. C. & HALL, J. E. Textbook of Medical Physiology. Eleventh Edition. Philadelphia: **Elsevier Saunders.** 1066 p. 2006.

- HABELA, C. W. & SONTHEIMER, H. 2007. Cytoplasmic Volume Condensation is an Integral Part of Mitosis. *Cell Cycle*. 1; 6(13): 1613–1620.
- HALLOWS, K. R., & P. A. KNAUF. 1994. Regulatory volume decrease in HL-60 cells: importance of rapid changes in permeability of Cl<sup>-</sup> and organic solutes. *Am. J. Physiol.* 267 (**Cell Physiol.** 36): C1045–C1056.
- HOFFMAN, E. K. Et al. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. **Physiology Reviews**. 89: 193-277.
- HOFFMANN, E. K. & SIMONSEN, L. O. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. **Physiology Reviews**. 69: 315-382. 1989.
- HORWITZ E.M, et al., 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. 2005;7(5):393-5
- HUANG P, et al., 2010. Differentiation of human umbilical cord Wharton Jelly –derived Mesenchymal stem cells into germ-like cells in vitro.
- HU, H., et al 2009. Characterization of Ion Channels in Human Preadipocytes. **Journal of Cellular Physiology** 218:427-435.
- INT ANKER P.S., et al. 2003. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. **Hematologica** Vol. 88, Issue 8, 845-852.
- JAHODA C.A.B, et al., 2003. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. **Exp. Dermatol.** 12, 849–859.
- JAENISCH R. & YOUNG R. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and nuclear Reprogramming. **Cell**, 132, 567–582, 2008
- JANÁČEK, K. & SIGLER, K. 2000. Osmosis: Membranes Impermeable and Permeable for Solutes , Mechanism of Osmosis across Porous Membranes. **Physiology Research**. 49: 191-195.
- JACKSON, J. G., S. M. Post, and G. Lozano. 2011. Regulation of tissue- and stimulus-specific cell fate decisions by p53 in vivo. **Journal of Pathology** 223:127-136.
- JENNINGS, M. L. & AL-ROHIL, N. 1990. Kinetics of Activation and Inactivation of Swellingstimulated K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> Transport . **Journal of Gen. Physiology**. 95: 1021-1040.
- JENTSCH, T. J. et al. 2002. Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. **Physiology Reviews**. 82:503-568.
- JIANG, P., ET al 2010. Electrophysiological properties of human induced pluripotent stem cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology** 298:C486-C495.
- JIANG, Y., et al 2002 Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, 418, 41–49.
- JONES, E.A., et al. 2002. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. **Arthritis e Rheumatism, New Jersey**, v.46, n.12, p.3349-3360, 2002.
- JONES, E.A., et al. 2004. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. **Arthritis Rheum.** 50, 817–827.
- JOHNSTON, N. 2004. Skin stem cells. *Drug Discov. Today* 9:994.

- JORGENSEN, P. & M. TYERS. 2004. How cells coordinate growth and division. **Current Biology** 14: R1014-R1027.
- KANG, X. Q., 2006. Differentiating characterization of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells in vitro. **Cell Biol. Int.** 30:569-575.
- KARAHUSEYINOGLU S., et al. 2007. Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. **Stem Cells** 25:319–331.
- KERN S, et al. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem cells**; 24:1294 –1301.
- KESTENDJIEVA S., et al 2008. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. **Cell Biology International** 32, 724-732.
- KIRK, K. 1997. Swelling-activated organic osmolyte channels. **J. Membr. Biol.** 158:1-16.
- KIM, C. F., et al. 2005. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung Cancer. **Cell** 121: 823-835.
- KURBANNAZAROVA, R. S., et al. 2003. Osmotic water permeability and regulatory volume decrease of rat thymocytes. **Gen. Physiol Biophys.** 22:221-232.
- KRUSE C., et al 2006. Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratomas-like structures. **Ann Anat.** 188:503-517
- LAMBERT I. H., et al. (2008) Cell volume regulation: physiology and pathophysiology. **Acta Physiologica** 194, 255–282.
- LANG, F. 2007. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am. Coll. Nutr.* 26:613S-623S.
- LANG, F., et al. 1998. Ion channels, cell volume, and apoptotic cell death. **Cell Physiol Biochem.** 8:285-292.
- LANG, F., M., et al. 2000. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. **Cell Physiol Biochem.** 10:417-428
- LEE O.K., et al. 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood** 103:1669-1675.
- L'HOSTE, S. et al. 2007. Extracellular pH alkalization by Cl/HCO<sub>3</sub> exchanger is crucial for TASK2 activation by hypotonic shock in proximal cell lines from mouse kidney. **Am. Journal Physiology Renal Physiology.** 292: F628 –F638.
- LI, G. R. & D X. L. DENG. 2011. Functional ion channels in stem cells. **World Journal of Stem Cells** 3:19-24.
- LOCK, H. AND VALVERDE, M. A. 2000 Contribution of the Isk (MinK) potassium channel subunit to regulatory volume decrease in murine tracheal epithelia cells. **J. Biol. Chem.** 275, 34849–34852.
- MACFARLANE SN & SONTHEIMER H. 2000. Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. *Glia* 30: 39–48.
- MARGALIT A., et al., 1993. Initiation of RVD response in human platelets: mechanical-biochemical transduction involves pertussis-toxin-sensitive-G protein and phospholipase A<sub>2</sub>. **J Membr Biol** 136:303-311.
- MATTHEWS, V. B. AND G. C. YEOH. 2005. Liver stem cells. *IUBMB. Life* 57:549-553.
- MENG, X., T. E. et al. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell

population. *Ed. J. Transl. Med.* 5:57.

MESSINA E., et al., 2004. Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells from Human and Murine Heart. **Circulation Research** 95:911-921, 2004.

MIURA, M., S. et al. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 100:5807-5812.

MOORE, K. A. & I. R. LEMISCHKA. 2006. Stem cells and their niches. **Science** 311:1880-1885.

MOORE N. & S. LYLE. 2011. Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. **J Oncol.**

MORISHIMA, S. et al. 2000. Volume expansion sensitivity of swelling-activated Cl<sup>-</sup> channel in human epithelial cells. *Jpn. Journal of Physiology.* 50:277-280.

MOTAIS, R. et al. 1997. Association of the Band 3 protein with a volume activated, anion and amino acid channel: A molecular approach. **Journal of Experimental Biology.** 200:361-367.

MUELLER SM & GLOWACKI J. 2001. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. **J Cell Biochem;** 82:583-590.

MURAGLIA A., et al. 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **Journal of Cell Science** 113, 1161-1166.

NAKASHIMA, K. & DE CROMBRUGGHE, B., 2003. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. **Trends Genet.** 19, 458-466.

NILIUS, B. AND G. DROOGMANS. 2003. Amazing chloride channels: an overview. **Acta Physiol Scand.** 177:119-147.

NILIUS, B. 2001. Chloride channels go cell cycling. **J. Physiol** 532:581.

NILIUS, B., et al. 2000. The endothelial volume-regulated anion channel, VRAC. **Cell Physiol Biochem.** 10:313-320.

NILIUS, B., et al. Permeation properties and modulation of volume-activated Cl<sup>-</sup> currents in human endothelial cells. *Br. Journal of Pharmacology.* 112, 1049-1056. 1994.

NOTH U., et al. 2002. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells, **J. Orthop. Res.**, 20: 1060-1069.

ODORICO, J.S., et al. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cells lines. **Stem cells**, Basel, v.19, 3: 193-204.

OKADA, Y. 2004. Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and sensor mechanisms. **Cell Biochem. Biophys.** 41:233-258.

OKADA, Y. AND E. MAENO. 2001. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol* 130:377-383.

OKADA, Y., S, et al. 1997. Volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel in human epithelial cells: regulation by ATP and relation to P-glycoprotein. *Jpn. J. Physiol* 47 Suppl 1:S19-S20.

O'NEILL, W. C. 1999. Physiological significance of volume-regulatory transporters. **Am. J. Physiol.** 276, C995-C1011

- OUADID-AHIDOUCH, H. & A. AHIDOUCH. 2008. K<sup>+</sup> channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis. *J Membr. Biol.* 221:1-6.
- PALERMO A.T., et al. 2005. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol*; 279(2):336—44.
- PANEPUCCI RA, et al. 2004. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 22(7):1263-78
- PASSANTES-MORALES, H. Amino Acids and Brain Volume Regulation: Contribution and Mechanisms. In: OJA, S. S. et al. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Third Edition. Heidelberg Berlin: **Springer-Verlag**. 10: 225-248. 2007.
- PARK, K. S., et al. 2007. Functional expression of ion channels in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord vein. *Stem Cells* 25:2044-2052.
- PEDERSON S.F, et al. 2001. The cytoskeleton and cell volume regulation. *Physiol* 130:38-399.
- PEREIRA L.V. 2008. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Ciência & Saúde Coletiva*, 13(1): 7-14.
- PITTENGER M.F, et al. 1999. Multilineage potencial of adult human mesenchymal **Stem cells**. *Science* 284:143-147.
- POLLOCK, A. S. & ARIEFF, A. I. 1980. Abnormalities of cell volume regulation and their functional consequences. *Am. Journal of Physiology Renal Physiology*. 239: F195-F205.
- PREMACK BA & GARDER . Role of ion channels in lymphocytes. *J Clin Immunol* ; 11:225-238. 1991.
- PROCOPIO-ARAUJO, J. Transporte de água e osmose. In: Margarida de Mello Aires (Org.). Fisiologia. Segunda. Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 11: 81-X. 1999.
- POUNTOS, I & GIANNOUDIS, P.V. 2005. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury, New York*, v.36, n.3, p.8-12.
- PURPURA, K.A., et al., 2004. Sustained in vitro expansion of bone progenitors is cell density dependent. *Stem Cells* 22, 39–50.
- REBELATTO, C. K., A, et al 2008. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 233:901-913.
- REYA, T., et al. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111.
- REYES M., et al. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells, *Blood*, 98: 2615-2625.
- RITTER M, et al., 2003. Cell swelling stimulates cytosol to membrane transposition of ICln. *J Biol Chem* 278: 50163-50174.
- ROMANOV, Y.A.; et al, 2003. Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. *Stem Cells*, v. 21, p. :105-110.
- ROSSANT J. 2001. Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells*; 19:477–482.
- ROUZAIRE-DUBOIS, B. et al. 2000. Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 glioma cells. *Eur. Journal of Physiology*. 440:881–888.

- SABIROV, R. Z. et al. Volume-dependent ATP-conductive Large-Conductance Anion Channel as a Pathway for Swelling-induced ATP Release. *Journal Gen. Physiology*. 118: 251–266. 2001.
- SALEM, H. K. AND C. THIEMERMANN. 2010. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 28:585-596
- SARDINI, A. et al. Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1618:153– 162. 2003.
- SECCO, M., E. et al., 2008a. Mesenchymal stem cells from umbilical cord: Do not discard the cord! *Neuromuscular Disorders* 18:17-18.
- SECCO, M., E. et al., 2008b. Multipotent stem cells from umbilical cord: Cord is richer than blood! *Stem Cells* 26:146-150.
- SETHE S, et al. 2006. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev*; 5:91–116.
- SHEN, M. R., et al. 2002. Anion exchanger isoform 2 operates in parallel with Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 during regulatory volume decrease of human cervical cancer cells. *FEBS Letters*. 512: 52-58.
- SHEN, M. R., et al. 2000. Volume-sensitive KCl cotransport associated with human cervical carcinogenesis. *Pflugers Arch*. 440:751-760.
- SCHWINDT T.T., et al. 2005. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *J Bras Neurocirurg*, 16(1), 13-19.
- SHIMIZU, T. et al. Inhibition of Hypertonicity-Induced Cation Channels Sensitizes HeLa cells to Shrinkage-Induced Apoptosis. *Cell Physiology and Biochemistry*. 18:295-302. 2006.
- SILVA M.B., et al. 2010. Ion Channels In Volume Regulation And Cell Cycle Progression Of Clonal Kidney Cells. *Cell Proliferation*.
- STENDERUP, K., et al., 2001. Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 16, 1120–1129.
- STRANGE K et al., 2004. Cellular volume homeostasis. *Adv Physiol Educ* 28: 155–159.
- STRANGE, K. (Editor). 1994. *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. Boca Raton, FL: CRC.
- TAKAHASHI K., et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*; 131:861–872.
- TAO, R., et al 2008. Regulation of cell proliferation by intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium and volume-sensitive chloride channels in mouse mesenchymal stem cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 295:C1409-C1416.
- THOMSON J.A., et al. 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts *Science* 282, 1145-1147.
- TOMA JG., et al. 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 3:778-84.
- TOMINAGA, M., T. et al. 1995. Volume-sensitive chloride channel activity does not depend on endogenous P-glycoprotein. *J. Biol. Chem* 270: 27887–27893.

- TROYER, D. L. AND M. L. WEISS. 2008. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 26:591-599.
- UCHIDA, S., A. et al. 1989 Signal for induction of aldose reductase in renal medullary cells by high external NaCl. *Am. J. Physiol.* 256 (Cell Physiol. 25): C614–C620, 1989.
- ULRICH, N. & SONTHEIMER, H. 1997. Cell cycle-dependent expression of a glioma-specific chloride current: proposed link to cytoskeletal changes. *Am. Journal of Physiology Cell Physiology.* 273:1290-1297.
- VALVERDE, M. A. et al. 1995. Impaired cell volume regulation in intestinal crypt epithelia of cystic fibrosis mice. *Cell biology.* 92: 9038-9041.
- VAN DER GEER, P. et al. Hypertonic shock inhibits growth factor receptor signaling, induces caspase-3 activation, and causes reversible fragmentation of the mitochondrial network. *Am. Journal of Physiology Cell Physiology.* 288: C403-C415. 2005.
- VERFAILE, CM, et al. 2002. Adult stem cells. Assessing the case for pluripotency. *Trends in cell Biology, Cambridge,* v.12, 11:502-508.
- VILLAZ, M., J. C, et al. 1995. A voltage-gated chloride channel in ascidian embryos modulated by both the cell cycle clock and cell volume. *J. Physiol* 488 ( Pt 3):689-699.
- WALLER, E., et al. 1995. The “common stem cell” hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* 85, 2422–2435.
- WALKER, V. E., J., et al. 1999. Effect of coupling on volume-regulatory response of ciliary epithelial cells suggests mechanism for secretion. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 276:C1432-C1438.
- WANG, H. S., et al., 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22:1330-1337.
- WANG, J., et al, 2002. IK channels are involved in the regulatory volume decrease in human epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 284, C77–C84.
- WEISS, M. L. and TROYER, D. L. 2006. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev.* 2:155-162.
- WEHNER, F. 2006. Cell volume-regulated cation channels. *Contrib. Nephrol.* 152:25-53.
- WEHNER, F. et al., 2003. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport and signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148:1-80.
- WEXLER SA., et al.2003. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*;121:368–74.
- WEYLANDT, K. et al. 2001. Human CIC-3 Is Not the Swelling-activated Chloride Channel Involved in Cell Volume Regulation. *Journal of biological chemistry.* 276(20): 17461-17467.
- WILSON GF & CHIU SY. 1993. Mitogenic factors regulate ion channels in Schwann cells cultured from newborn rat sciatic nerve. *J Physiol (Lond)*; 470:501-520.
- WONDERGEM, R. et al. 2001. Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation. *Journal of Physiology.* 532.3: 661–672 661.

- YEN, B.L., et al. 2005. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*. 23:3-9.
- YOUNG, H.E., et al., 2001. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat. Rec.* 264, 51–62.
- YOUNG, H. E., 1995. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Developmental Dynamics*, 202: 137–144.
- ZHAO Y., et al. 2003 A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *PNAS*, Vol. 100, no. 5, 2426–2431.
- ZHIVOTOVSKY, B. AND S. ORRENIUS. 2010. Cell cycle and cell death in disease: past, present and future. *J Intern. Med.* 268:395-409
- ZUK PA, et al., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*; 13:4279-4295.
- ZVAIFLER NJ., et al.2000. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2:477–488.

## ANEXOS

### Anexo A: Parecer do comitê de ética em pesquisa da UFPE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 100/2007 - CEP/CCS

Recife, 14 de maio de 2007

Registro CONEP: 13473

Registro do SISNEP FR – 82101

CAAE – 1467.0.172.000-06

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 001/06

**Título: “Canais Iônicos na Regulação da Proliferação e Diferenciação de Células-Troncos”**

Pesquisador Responsável: Oleg Vladimirovich Krasilnikov

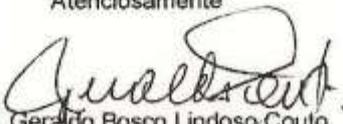
Senhor Pesquisador:

Informamos que a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, analisou o protocolo em epígrafe e emitiu o seguinte parecer: **PROTOCOLO APROVADO.**

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório anual da pesquisa.

ANEXO: Parecer CONEP Nº: 420/2007

Atenciosamente

  
Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto  
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Ao  
Prof. Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov  
Dep. de Biofísica e Radiobiologia – CCB /UFPE



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 420/2007

Registro CONEP: 13473 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 1467.0.172.000-06

Processo nº 25000.172291/2006-61

Projeto de Pesquisa: "Canais iônicos na regulação da proliferação e diferenciação de células-troncos".

Pesquisador Responsável: Dr. Oleg Vladimirovich Krasilnikov

Instituição: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco

CEP de Origem: Centro de Ciências da Saúde – CCS/UFPE

Área Temática Especial: Novos procedimentos.

Patrocinador: CNPq

**Sumário Geral do Protocolo**

Trata-se de estudo que buscará investigar o papel dos canais iônicos na regulação da proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais de veias de cordão umbilical humano.

Serão usados 40 cordões umbilicais com 30 a 40 semanas de gestação. O processamento dos cordões ocorrerá 12 horas após o parto normal. Os critérios de inclusão e exclusão são bem explicitados. Há descrição das técnicas de laboratório a serem empregadas.

**Considerações**

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 1371/2006, cabem as seguintes considerações:

- a) O pesquisador apresentou cronograma atualizado e Folha de Rosto com as informações completas.
- b) Informações sobre as técnicas descritas no protocolo com as respectivas referências foram adicionadas.
- c) Não haverá armazenamento de material biológico, mas guarda provisória até o seu descarte.
- d) A nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido contempla as informações necessárias à participação voluntária do sujeito da pesquisa.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 10 de maio de 2007.

Gyselle Saddi Tannous  
Coordenadora Interina da CONEP/CNS/MS

## Anexo B: Termo de consentimento livre e esclarecido:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título da pesquisa:** Canais iônicos na Regulação da Proliferação e Diferenciação de Células-tronco.

**Local do estudo:** Laboratório de Biofísica das Membranas do Departamento de Biofísica e Radiobiologia /CCB da Universidade Federal de Pernambuco.

Av. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife, PE. 50670-901. Fone: 2126 8535

**Coordenador da pesquisa:** Professor Dr. Oleg Vlademirovich Krasilnikov.

**Parturiente convidada:** você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa que tem como objetivo estudar e descrever as mudanças de tamanho das células de cordão-umbilical humano (células-tronco) e se estas mudanças influenciarão na divisão e formação de novas células. Sua participação, caso seja concedida será a de doadora do cordão umbilical após o parto.

**Descrição do trabalho:** o cordão umbilical doado será coletado no Setor da Obstetrícia do Hospital D'Ávila–Recife. Após a coleta do cordão umbilical, o mesmo será transportado de forma adequada para o Laboratório de Cultura de células do Depto. de Biofísica, onde será processado para a retirada das células. Os restos do cordão serão levados para o sistema rotineiro de descartes de excedentes biológicos do Hospital das Clínicas. As células retiradas serão depositadas em garrafas de cultura. Alíquotas destas células serão analisadas individualmente em um equipamento específico (citômetro de fluxo) do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Recife. Paralelamente no Departamento de Biofísica estas células serão analisadas quanto às mudanças de volume em soluções fisiológicas com diferentes concentrações do soluto.

**Riscos e benefícios:** A doação do cordão umbilical não trará quaisquer complicações para a paciente visto que o cordão é normalmente descartado e incinerado como lixo biológico. Depois da retirada das células o processo de incineração (queimado) será realizado no Hospital das Clínicas por tratar-se do Hospital mais próximo.

Na condição de doadora de cordão umbilical você não terá benefícios diretos com essa pesquisa, mas estará contribuindo para os estudos científicos que visam no futuro próximo, utilizar células-tronco para tratar pacientes que precisam utilizar esta terapia na tentativa de uma vida saudável.

**A sua participação como paciente doadora de cordão umbilical é voluntária:** Você é livre para escolher se quer fazer a doação e também pode a qualquer momento pedir para parar de participar da pesquisa; será necessário apenas fazer uma comunicação verbal ou escrita ao responsável pela pesquisa.

**Termo de Confidencialidade:** As informações obtidas através desta pesquisa serão tratadas com rigoroso sigilo. Os resultados obtidos poderão ser utilizados para fins de ensino e pesquisa, no entanto, sua identidade como doadora do cordão umbilical será preservada.

**Consentimento da Paciente:** Este termo de consentimento tem duas (02) vias assinadas pela doadora do cordão umbilical e pela pesquisadora responsável pela coleta do cordão umbilical. Uma das vias ficará com a doadora do cordão umbilical.

**Este termo de consentimento convida-me como parturiente, a participar de uma pesquisa na qual doarei o cordão umbilical para retirada de células. Sinto-me devidamente esclarecida em relação ao seu conteúdo. Decido por livre e espontânea vontade participar desta pesquisa, assinando o presente documento. Reservo-me o direito de a qualquer momento que julgar conveniente, interromper a minha participação na pesquisa sem qualquer penalização.**

---

Nome do Paciente

LETRA DE FORMA

Assinatura do Paciente

Data

---

Nome do Responsável

Assinatura do Responsável

Data

---

Nome da Testemunha

Assinatura da Testemunha

Data

---

Data

Assinatura da Testemunha

Nome da Testemunha

---

Assinatura da Testemunha

Nome da Testemunha

Data

---

Nome do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador

Data

**Anexo C:** Trabalho enviado ao Congresso Nacional de Células-tronco e Terapia Celular 2010.

**Estudo da participação de canais de potássio no processo de RVD das células-tronco mesenquimais obtidas do cordão umbilical humano**

Gisely Juliane Barbosa de Albertim, Darlene Bezerra Paiva, Thauan Fernandes Moraes, Aldenise Lizandra de Miranda-Oliveira, Elga Bernardo Bandeira de Melo, Márcia Bezerra da Silva, Liliya N. Yuldasheva, Reginaldo Pereira da Silva, Cláudio Gabriel Rodrigues, Oleg Vladimirovich Krasilnikov

Departamento de Biofísica e Radiobiologia (UFPE)

E-mail: [kras@ufpe.br](mailto:kras@ufpe.br); [giselybiom@hotmail.com](mailto:giselybiom@hotmail.com)

**Introdução:** A regulação do volume celular tem atraído um profundo interesse devido a sua importância na homeostasia celular incluindo a proliferação, diferenciação, apoptose e o próprio metabolismo. Todavia, até o momento não há relatos de estudo dos mecanismos da regulação do volume em células-tronco mesenquimais. O processo do reestabelecimento do volume celular após seu aumento sob a um choque hipoosmótico tem sido chamado de **RVD** (*Regulatory Volume Decrease*) (Walker et al., 1999). No presente estudo, objetivamos estudar a participação dos canais de potássio em RVD em células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano (hMSCs). **Métodos:** As hMSCs foram isoladas de acordo com um protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE, por meio de migração espontânea. As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 20% de soro fetal bovino e F-12 (fator de crescimento), 100U/mL de penicilina e 100µg de estreptomicina (300 mOsm), mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. O processo de RVD foi registrado pelo sistema de vídeo-imagem que consiste de uma câmara de vídeo CCD acoplada a um microscópio invertido (Leika). As imagens das células antes e depois de induzido o choque hipoosmótico (200 mOsm) foram adquiridas em um computador e analisadas posteriormente no ImageJ software. O tetraetilamônio (TEA) um bloqueador clássico dos canais do potássio dependentes de voltagem (**K<sub>v</sub>**), e Glibenclamida (GB) um bloqueador dos canais do potássio dependentes do ATP (Kir6.x) foram utilizados como instrumentos moleculares. **Resultados:** Estabelecemos que células-tronco mesenquimais realizam o RVD. No entanto, na presença dos inibidores TEA (10 mM) ou GB (100 µM) o processo não foi observado. As células permaneceram com seus volumes aumentados durante todo período de observação (30 min). **Conclusão:** Os canais de potássio dependentes de voltagem e dependentes do ATP estão fortemente envolvidos no RVD das células tronco mesenquimais.

**ResumoID:** 1418-1

**ION CHANNELS IN MESENCHYMAL STEM CELLS OF WHARTON'S JELLY HUMAN UMBILICAL CORD: RVD STUDY.**

ALBERTIM, G. J. B.1; MORAES, T. F. 1; YULDASHEVA, L. N1; SILVA, R. P. 2; RODRIGUES, C. G. 1; SILVA, M. B. D. 1; KRASILNIKOV, O. V. 1  
1 Biophysics and Radiobiology Department, CCB, UFPE, PE, Brazil, UFPE  
2 Physiology and Pharmacology Department, CCB, UFPE, PE, Brazil, UFPE

**Objectives:** Control of cell volume is essential for the survival of animal cells. It is important for various cell functions including proliferation. Using cancer cell lines it was shown that ion channels play a key role in cell volume regulation. However, there is not information about mechanisms of volume regulation in stem cells. Analysis of osmotic cell shrinkage and/or swelling provoked by osmotic challenger is called as a regulatory volume increase (RVI) and a regulatory volume decrease (RVD), and used for study of underlining mechanisms. This work was aimed to study ion channels involved in RVD of mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of human umbilical cord (hWMSC). **Methods and Results:** The hWMSCs were isolated by spontaneous migration according to the protocol approved by the institutional Ethics Committee (Federal University of Pernambuco). The protocol is based uniquely on the capacities of MSCs to adhere to a plastic surface without enzymatic treatment. The cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with 20% bovine fetal serum (LGC) and 10% F-12 (Invitrogen), 100 U/ml of penicillin and 100 µg of streptomycin. Cultures were maintained in a humidified (80%) atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. RVD was performed with single cells with simple geometry, which did not develop blebs after a hyposmotic challenge (300 mOsm → 200 mOsm). The process was recorded using the video imaging system consisting of CCD video camera Moticam 2000; Quimis) attached to the Leica DMIL inverted microscope (Leica Microsystems GmbH). The images of cells before (300 mOsm) and after the hyposmotic shock (200 mOsm) were obtained once per minute and analysed off-line using a freeware image analysis program (ImageJ, NIH, USA). Specific inhibitors of cellular anion (5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid, NPPB) and cation (tetraethylammonium, TEA; glibenclamide, GB; and 4-aminopyridine, 4-AP) permeability were used as molecular tools. The results shown that hMSC hold the RVD. The process was practically abolished in presence of TEA (10 mM), GB (100 µM), 4-AP (5 mM) and NPPB (100 µM). **Conclusions:** There are various ion channels involved in RVD of hWMSCs, including ATP- and voltage-dependent potassium channels and chloride channels.

**Keywords:** Ion channels, Volume regulation, Mesenchymal Stem Cells, Regulatory Volume Decrease