



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO DOS CANAIS IÔNICOS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA GELÉIA DE WHARTON DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO

ALUNO: WILLIAMIS DO NASCIMENTO
ORIENTADOR: PROF. DR. OLEG V. KRASILINIKOV
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. REGINALDO P. SILVA

Recife, março de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO DOS CANAIS IÔNICOS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA GELÉIA DE WHARTON DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO

WILLIAMIS DO NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do título de mestre em ciências biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Oleg V. Krasilnikov

Co-orientador: Prof. Dr. Reginaldo P. Silva

Recife, março de 2011

Nascimento, Williamis do

Estudo eletrofisiológico dos canais iônicos das células-tronco mesenquimais da geléia de Wharton do cordão umbilical humano/
Williamis do Nascimento. – Recife: O Autor, 2011.

70 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Oleg V. Krasilnikov

Coorientador: Reginaldo P. Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2011.

Inclui bibliografia e anexos

1. Células-tronco 2. Cordão umbilical 3. Citoquímica I. Título.

616.02774

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-225

WILLIAMIS DO NASCIMENTO

ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO DOS CANAIS IÔNICOS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA GELÉIA DE WHARTON DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas na Universidade Federal de Pernambuco pela banca examinadora:

Prof. Dr. Oleg V. Krasilnikov - Orientador
(Departamento de Biofísica e Radiobiologia, UFPE)

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia – 1º Membro
(Departamento de Bioquímica, UFPE)

Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa – 2º Membro
(Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFPE)

Recife, 31 de março de 2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que durante todo este tempo me apoiaram e incentivaram na finalização deste trabalho.

Ao meu orientador professor Oleg pela oportunidade de fazer parte de um grande grupo de pesquisa.

Ao meu co-orientador professor Reginaldo pelo todo aprendizado na metodologia da técnica do Patch-clamp e pelo incentivo nos momentos mais difíceis da pesquisa.

Aos meus colegas de laboratórios: Jéssica, Betinho, Laíse, Érica, Janilson, Djanah, Darlene, Lizandra, Gisele, Sheila, Diego, Nina, Juliana, e todos que me ajudaram direta ou indiretamente.

Aos professores: Claudio, Carlos, Márcia, Liliya pelos ensinamentos passados.

A Kelma uma pessoa essencial na minha vida, pelas nossas histórias, de muitas lutas e muitas vitórias alcançadas, Obrigado por tudo. “Tudo posso naquele que me fortalece”.

A minha filha Maria Heloisa pelos sorrisos angelicais.

A minha mãe Lourdes meus irmãos: Katia e Luis, meus sobrinhos Lael, Lisa e Lú.

A todos meus amigos e colegas de trabalho.

Agradeço a todos por mais esta conquista em minha vida.

**“O educador deve ser não um sábio,
mas sim um homem diferenciado por sua educação,
pela força de seus costumes,
pela naturalidade de seus modos,
jovial, dócil, acessível, franco, enfim,
em quem se encontre muito que imitar e pouco que corrigir”**

SIMON BOLIVAR

RESUMO

A caracterização de canais iônicos em células tronco é importante pelo fato destas estruturas atuarem no controle da proliferação e diferenciação destas células. Há poucos trabalhos focados nos canais iônicos presentes nas membranas plasmáticas das células tronco e nenhum deles trata das células tronco mesenquimais da geléia de Wharton do cordão umbilical humano (whMSC). O cordão umbilical é uma fonte importante de células tronco para tão esperada terapia celular. Estes fatos motivaram o estudo dos canais iônicos das whMSC como objetivo maior do presente trabalho. Foi utilizada a técnica de “patch-clamp” na configuração “whole-cell” e a atuação de inibidores específicos para identificar os canais iônicos presentes nas whMSC. Os inibidores escolhidos foram: tetraetilamonio (TEA) e 4-aminopiridina (4-AP) como inibidores de canais de potássio dependentes de voltagem e de Ca^{2+} , Glibenclamida (GB) – um inibidor de canais de potássio dependentes de ATP, canais aniônicos dependentes de volume celular e CFTR e 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) ácido benzóico (NPPB) – um potente bloqueador dos canais de cloreto, mas que também é capaz de bloquear os canais de potássio dependentes de Ca^{2+} de condutância intermediária. Os resultados mostraram que as correntes iônicas ativadas por voltagem das whMSC podem ser bloqueadas consideravelmente por TEA (10 mM), 4-AP (5 mM) e NPPB (100 μM) indicando a presença dos canais de K^+ dependentes de voltagem e de Ca^{2+} e de canais de Cl^- dependentes de voltagem conforme descrito para células tronco de outras origens. Utilizando GB (100 μM) observamos um aumento (estimulação) significativo da corrente. Este é um resultado inédito, pois estudos anteriores demonstram que o GB atua inibindo a corrente iônica transmembrana. Em todos os casos, com todos os inibidores testados, os efeitos foram reversíveis. Estes resultados demonstram que as membranas citoplasmáticas das whMSC possuem canais de K^+ dependentes de voltagem e de Ca^{2+} e canais de Cl^- dependentes de voltagem. O surpreendente efeito da glibenclamida indica a presença de canais iônicos desconhecidos nas membranas das whMSC.

Palavras chaves: Geléia de Wharton; células tronco mesenquimais; Canais iônicos; Patch-clamp; Tetraetilamônio (TEA); 4-Amonopiridina (4-AP); Glibenclamida (GB); 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino) ácido benzóico (NPPB).

ABSTRACT

The knowledge about diversity of ion channels in stem cells is important because these structures can participate in controlling their proliferation and differentiation. However, few studies focused on ion channels presented in the plasma membranes of stem cells. Moreover, there is not a study of ion channels presented in the plasma membranes of mesenchymal stem cells in Wharton's jelly of human umbilical cord (whMSC) although umbilical cord is one of important sources of stem cells for cell therapy. These facts predetermined the aim of the present study – looking for types of ion channels presented in whMSC. Patch-clamp technique in whole-cell configuration and specific inhibitors of ion transport were used to identify type of ion channels presented in whMSC. Inhibitors chosen were: tetraethylammonium (TEA) and 4-aminopyridine (4-AP) - inhibitors of voltage-gated and Ca^{2+} - dependent potassium channels; glibenclamide (GB) - an inhibitor of ATP-dependent potassium channels, volume and cAMP sensitive anion channels; and 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) - a potent blocker of chloride channels, which is able to block Ca^{2+} - dependent potassium channels of intermediate conductance. We observed that the voltage-activated ionic currents of whMSC could be significantly blocked by TEA (10 mM), 4-AP (5 mM) and NPPB (100 mM). The results indicate the presence of voltage- and Ca^{2+} - dependent potassium channels and voltage-dependent Cl^- -channel as it was described for stem cells isolated from other adult tissues. Using GB (100 mM) we have expected to observe the similar inhibitory action or lack of effect, but unexpectedly found that GB significantly increased (stimulated) the voltage dependent transmembrane current. Such effect was not reported before. In all cases the effects of used inhibitors were reversible. These results demonstrate that the cytoplasmic membrane of Wharton's jelly mesenchymal stem cells of human umbilical cord possesses of voltage-gated and Ca^{2+} -dependent K^+ channels and voltage dependent Cl^- channels. The surprising effect of glibenclamide indicates the presence of unknown ion channels in the membranes of whMSC. Other experiments are needed to identify them.

Key words: Wharton's jelly; mesenchymal stem cells; ion channels; Patch-clamp; tetraethylammonium (TEA); 4-aminopyridine (4-AP); glibenclamide (GB); 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB).

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas (CTMs)	17
Figura 2: Compartimentos do cordão umbilical contendo células-tronco mesenquimais	17
Figura 3: Estrutura do canal de potássio controlado por voltagem.	22
Figura 4: Transmissão da informação dentro do sistema nervoso	23
Figura 5: Representação da fórmula estrutural do TEA	24
Figura 6: Bloqueio intracelular do canal de potássio pelo TEA	24
Figura 7: Representação da fórmula estrutural da 4-AP.	26
Figura 8: Representação da fórmula estrutural da glibenclamida.	27
Figura 9: Representação da fórmula estrutural do NPPB	28
Figura 10: Formação do giga – selo e possíveis configurações de registros da técnica “patch clamp”.	29
Figura 11: Ilustração das quatro configurações básicas de “patch clamp”.	30
Figura 12: Imagens do Setup experimental.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

4-AP – 4- Aminopiridina

AMPC – Adenosina monofosfato cíclico

BK – Canais de potássio de grande condutância

CaCCs - canais de cloreto ativado por cálcio

CD - Antígenos – do inglês, Cluster of Differentiation

CFTR - regulador da condutância transmembrana da Fibrose cística

CT – células – Tronco

CTM – células - Tronco Mesenquimais

CUH – Cordão Umbilical Humano

GMPc – Guanina monofosfato cíclico

IBTX – Iberiotoxina

KATP – Canais de potássio dependentes de ATP

VDCC – canais de cálcio dependentes de voltagem

Kv – Canais de potássio dependentes de voltagem

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

QAS – Amônio Quaternário

SFB – Soro Fetal Bovino

SP – Sangue Periférico

TEA – Tetraetilamônio

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina bovina sérica

Cav – canais de cálcio ativados por voltagem

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

ClCs – Canais de cloreto ativados por voltagem

CTHs – Células – Tronco Humanas

CTS – Células – Tronco Somáticas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

HLA- Antígeno Leucocitário Humano

IK – Canais de potássio de condutância intermediária

KCa – Canais de potássio ativados por cálcio

Kir – Canais de potássio retificador interno

MO – Medula Óssea

Nav – Canais de sódio ativados por voltagem

SCU – Sangue de Cordão Umbilical

SK – Canais de potássio de pequena condutância

SUR – Receptor de sulfoniluréias

GB - Glibenclamida

LISTA DE TABELA

	Página
Tabela 1: Classificação das células – tronco.	15

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	11
1.1 Considerações iniciais	11
2. Objetivos	13
2.1 Geral	13
2.2 Específico	13
3. Justificativa	14
4. Revisão da Literatura	15
4.1 Células-tronco	15
4.2 Canais iônicos	18
4.2.1 Canais de potássio retificadores de entrada (Kir)	19
4.2.2 Canais de potássio dependente de voltagem (KV)	20
4.2.3 Canais de potássio ativados por cálcio	20
4.2.4 Canais de cloreto dependentes de voltagem (CIC)	21
4.3 Modulação de canais iônicos	22
4.3.1 Ligantes dos canais de potássio dependentes de voltagem (KV)	24
4.3.2 Ligantes de canais de potássio dependente de cálcio (KCa)	26
4.3.3 Ligantes de canais de potássio dependente de ATP (KATP)	27
4.3.4 Ligantes de canais de cloreto (Cl⁻)	28
4.4 A técnica de “patch clamp”	28
5. Referências bibliográficas	31
6. Artigo científico	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

A grande diversidade de células que podem ser reconhecidas em tecidos adultos deriva de uma única célula-ovo, após a fecundação de um óvulo com um espermatozóide, que irá se dividir e diferenciar-se em mais de 250 tipos diferentes de tecidos existentes no organismo humano. As células-tronco diferem de outras células do organismo por apresentarem três características: são células indiferenciadas e não especializadas; são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes e são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular. (Zago, 2006).

Todas as células possuem mecanismos fisiológicos para manter sua homeostasia, entre os quais destacamos os canais iônicos, que são proteínas presentes nas membranas biológicas. Estas proteínas têm transições entre diferentes estados conformacionais que permitem abertura e fechamento de vias para o transporte de íons entre o interior e o exterior das células, ou vice-versa.

A passagem de íons específicos através da membrana desenvolve atividade elétrica cuja função pode variar de um tipo celular para outro. Nas células eletricamente excitáveis que compõem as fibras musculares cardíacas ou esqueléticas, a atividade elétrica dispara a contração individual de cada célula que, por sua vez, promove a contração das fibras produzindo o batimento cardíaco ou o movimento de um membro, respectivamente. Já nas células nervosas (neurônios), a atividade elétrica desempenha a função de levar e trazer sinais de controle para todo o organismo.

O controle da passagem dos íons através da membrana é feito pela abertura e fechamento dos canais iônicos que, por sua vez, podem depender do potencial elétrico através da membrana. Estudos iniciais utilizando fixação artificial do potencial de membrana (técnica de voltage clamp) conduziram a idéia básica de que a atividade elétrica celular é gerada em função da dependência de tensão e do tempo da condutância da membrana, principalmente aos íons sódio e potássio (Hodgkin et al., 1952).

Com o advento da técnica de “patch clamp” (Neher & Sakmann, 1976; Neher *et al.*, 1978; Neher & Sakmann, 1992), os experimentos possibilitaram estudos quantitativos bastante precisos das características elétricas dos canais iônicos, tais como: condutância do canal, cinética de abertura e fechamento e dependência do potencial elétrico.

O potencial terapêutico das células-tronco e as perspectivas de uma medicina regenerativa são altamente promissores. A caracterização cada vez mais detalhada de novos tipos de células tronco/progenitoras em tecidos adultos e a exploração de fontes alternativas destas células, como o

sangue de cordão umbilical, traz consigo muitos avanços. Neste trabalho caracterizamos os canais iônicos das células tronco da geléia de Warthon do cordão umbilical humano (whMSC). Não se sabe a significância das mudanças no funcionamento dos canais iônicos na diferenciação ou proliferação destas células, o que limita as aplicações terapêuticas. Por isso, desvendar seus mecanismos moleculares e principalmente caracterizar os canais iônicos participantes pode fornecer informações importantes sobre a regulação da proliferação e diferenciação celular, possibilitando a utilização da modulação dos canais iônicos no controle destes fenômenos.

2 OBJETIVOS

2.1 *Geral:*

Caracterizar os canais iônicos das membranas das células-tronco mesenquimais da geléia de Warthon do cordão umbilical humano (whMSC) através da técnica de Patch-Clamp.

2.2 *Específicos:*

- Estudar o efeito do tetraetilamônio sobre as correntes transmembrana das whMSC para identificar canais de potássio ;
- Caracterizar o efeito da 4-aminopiridina sobre as correntes presentes nas whMSC para identificar canais de potássio ;
- Observar como a glibenclamida afeta os transportadores da membrana das whMSC ;
- Verificar o efeito do NPPB sobre o comportamento eletrofisiológico da membrana das whMSC para identificar canais de cloreto.

3 JUSTIFICATIVA

A caracterização de canais iônicos em células tronco é importante pelo desdobramento que estas estruturas podem ter no controle da proliferação e diferenciação destas células. Há poucos trabalhos focados nos canais iônicos presentes nas membranas plasmáticas das células tronco, e, nenhum deles trata das células tronco mesenquimais da geléia de Wharton do cordão umbilical humano (whMSC). O cordão umbilical é uma fonte importante de células tronco para a tão esperada terapia celular com células-tronco. Estes fatos determinaram o estudo dos canais iônicos das whMSC como objetivo maior deste trabalho.

Neste estudo procurou-se estudar os canais iônicos presentes naquelas células-tronco e para isto foi utilizada a técnica de “patch-clamp” na configuração “whole-cell” e inibidores específicos para identificar os canais iônicos presentes nas whMSC. Os inibidores escolhidos foram: o tetraetilamônio (TEA) e a 4-aminopiridina (4-AP) como inibidores de canais de potássio dependentes de voltagem e de Ca^{2+} , a Glibenclamida (GB) – um inibidor de canais de potássio dependentes de ATP, canais aniônicos dependentes de volume celular e CFTR e o 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) ácido benzóico (NPPB) – um potente bloqueador dos canais de cloreto, mas que também é capaz de bloquear os canais de potássio dependentes de Ca^{2+} de condutância intermediária.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Células-tronco

Por definição, células-tronco (CT) são capazes tanto de se auto-renovar como se diferenciar em uma grande variedade de linhagens de células do organismo adulto. As células tronco são classificadas baseando-se em sua espécie de origem, tecido de origem e seu potencial de diferenciação em um ou mais tipos de células adultas (ver Tabela 1), no entanto algumas células-tronco têm uma capacidade de diferenciação, em tipos celulares diferentes, maior que outras. Pode-se classificar as células-tronco quanto à origem em duas classes principais: as embrionárias e as adultas. Considerando a capacidade de se diferenciar em outros tipos de células (plasticidade), as CT podem ser classificadas como: 1 - totipotentes, cada célula pode se desenvolver e originar qualquer tipo de célula do organismo, incluindo os tecidos extra-embrionários; 2 - pluripotentes, podem originar e desenvolver todas as células do embrião ; 3 - multipotentes, podem ser diferenciadas apenas em tipos específicos de células de uma linhagem; ou unipotentes, dão origem a apenas um tipo de célula. Por exemplo, o zigoto que pode se diferenciar em qualquer tipo de célula, incluindo todas as células do embrião e tecidos extras embrionários. (Herzog et al., 2003).

Quanto à origem:	Quanto à plasticidade:
Embrionárias	Toti- ou pluripotente
Adultas	Pluri-, multi- ou unipotente

Tabela 1: Classificação das células-tronco. Quanto à origem, existem duas classes principais: as embrionárias e as adultas. Considerando a plasticidade (capacidade em se diferenciar) são qualificadas como: totipotentes, pluripotentes, multipotentes, e unipotentes.

Muitos tecidos adultos contêm populações de células tronco que tem a capacidade de se renovar após trauma, doenças, ou envelhecimento. Estas células podem ser encontradas no próprio tecido ou em outros tecidos que servem de reservatórios de células-tronco (Pittenger et al., 1999a). Por exemplo, na medula óssea são encontradas células que irão originar a linhagem hematopoiética e também, as células-tronco mesenquimais. As células-tronco mesenquimais (MSC), têm sido caracterizadas por seu crescimento e aderência no plástico e subsequente expansão em condições de cultura específica, pela exposição de antígenos de superfície e por seu potencial de diferenciação *in vivo* e *in vitro*. A Indução da diferenciação destas MSC em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, tem sido demonstrada extensivamente sob condições de cultura apropriadas. Fenotipicamente as MSCs têm sido definidas como positivas para os marcadores CD29, CD44, CD90 e CD105, e

negativa para os marcadores da linhagem hematopoiética como CD31, CD34, CD45, CD14 e CD19 e para o antígeno leucocitário humano DR (HLA-DR) (Wagner et al., 2005). Células tronco mesenquimais do estroma da medula óssea foram isoladas recentemente e expandidas *in vitro* a partir da medula óssea de diferentes espécies (camundongos, ratos e humanos), (Caplan & Bruder, 2001;Jiang et al., 2002;Pittenger et al., 1999a;Reyes et al., 2001;Reyes et al., 2002) .Após injeção sistêmica estas células apresentaram potencial multilinhagem para incorporar dentro de uma variedade de tecidos como osso, cartilagem, músculo, pulmão e baço (Deans & Moseley, 2000;Jiang et al., 2002;Pittenger et al., 1999a). Elas também foram capazes de formar outros tipos de tecidos ou células *in vitro* como hepatócitos, cardiomiócitos e células neuronais (Caplan & Bruder, 2001;Jiang et al., 2002;Reyes et al., 2001). Estudos em animais mostraram que transplante de MSCs para miocárdio infartado melhorou significativamente a função do coração (Orlic et al., 2001;Sussman, 2001;Tomita et al., 1999).

A medula óssea humana tem sido reconhecida como uma importante fonte de MSC para os estudos clínicos e experimentais (Heubach et al., 2004;Li et al., 2005;Orlic et al., 2001;Pittenger et al., 1999b;Theise et al., 2000). Estas MSCs humanas têm mostrado potencial para se diferenciar em vários tipos celulares (figura 1). Elas são caracterizadas pelo seu alto potencial de expansão, estabilidade genética e alta capacidade de reprodução em laboratórios. Elas também apresentam compatibilidade com a engenharia tecidual, e têm potencial para aumentar o reparo em muitos tecidos vitais (Caplan & Bruder, 2001;Gronthos et al., 2003;Jones et al., 2002;Lodie et al., 2002;Muraglia et al., 2000;Pittenger & Martin, 2004;Caplan & Bruder, 2001;Jiang et al., 2002;Pittenger et al., 1999b;Reyes et al., 2001;Reyes et al., 2002).

Porém, devido à frequência e a capacidade de diferenciação das MSCs diminuir com a idade (D'Ippolito et al., 1999), fontes alternativas de MSCs para uso autólogo e alogênico têm sido procuradas. MSCs foram identificadas no líquido amniótico humano, placenta,veias, sangue do cordão umbilical (SCU) (D'Ippolito et al., 1999;Erices et al., 2000;in 't Anker et al., 2003;Panepucci et al., 2004) , bem como em vários tecidos fetais, incluindo medula óssea, fígado, sangue, pulmão e baço (Campagnoli et al., 2001;in 't Anker et al., 2003).

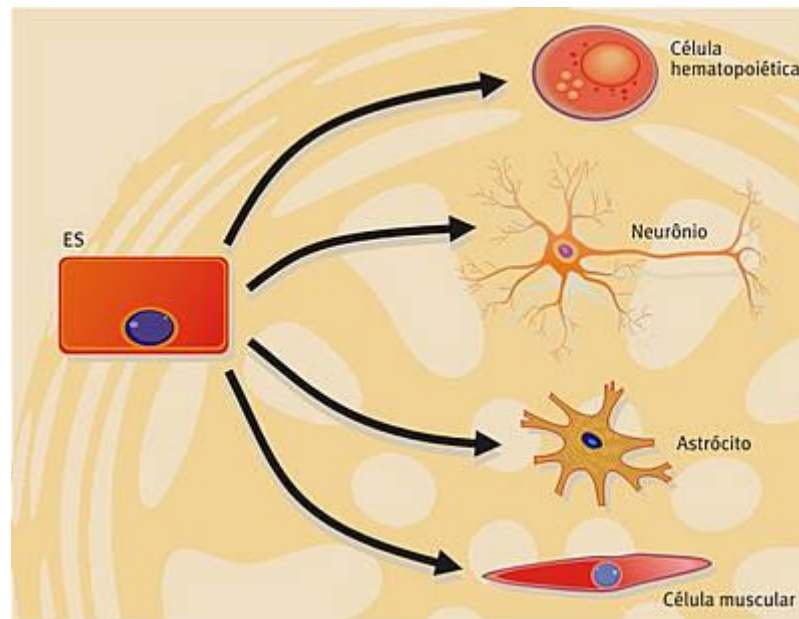


Figura 1: Diferenciação de células – tronco em células de tecidos específicos como: célula hematopoiética, neurônio, astrócito e célula muscular.

O cordão umbilical humano (CUH) contém duas artérias e uma veia, que são rodeados por tecido conjuntivo mucóide, e isso é chamado de geléia de Wharton (figura 2). O cabo é coberto por um epitélio derivado do âmnio envolvente. O cordão umbilical humano (CUH) tem sido utilizado como fonte alternativa desde 1988 (Gluckman et al., 1989). O sangue remanescente da veia umbilical após o nascimento, contém uma rica fonte de células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras, tem sido utilizadas com sucesso como uma fonte alternativa de doadores alogênicos para tratar uma variedade de doenças oncológicas pediátricas, imunológicas, hematológicas genéticas (Broxmeyer et al., 1989; Gluckman et al., 1997; Han et al., 2003; Kim et al., 2002). Células Primitivas do estroma podem ser isoladas de geleia de Wharton do cordão umbilical e podem ser diferenciadas em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, cardiomiócitos e neurócitos (Baksh et al., 2007; Wu et al., 2009a).

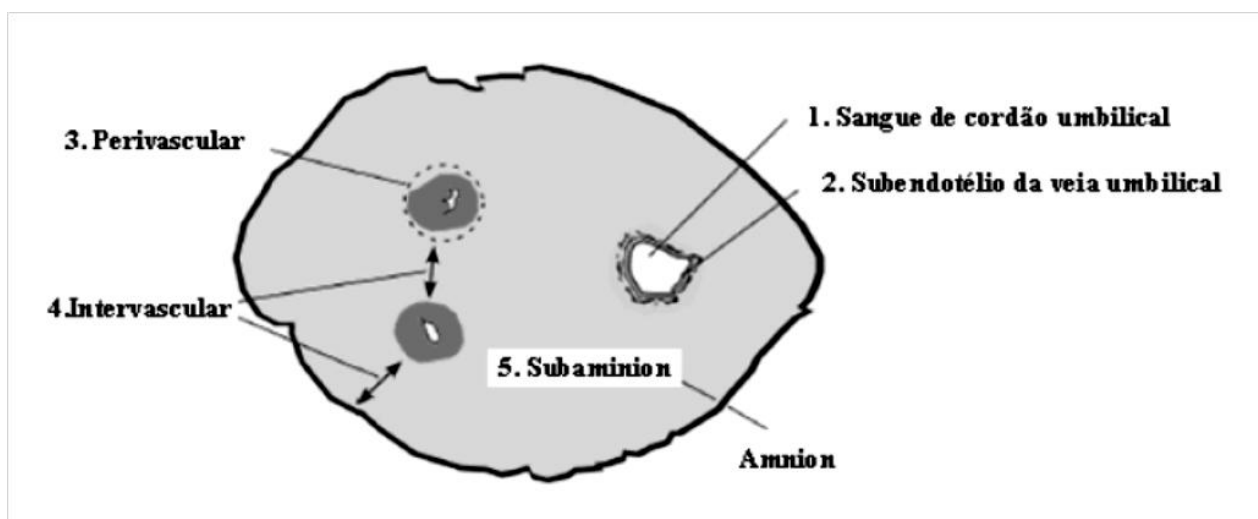


Figura 2: Compartimentos do cordão umbilical contendo MSC (representação de secção transversal).

As células tronco mesenquimais podem ser isoladas da camada subendotelial da veia, como também podem ser obtidas da geléia de Wharton, desta com maior frequência quando comparada com o sangue no cordão umbilical – local que compreende a geléia de Wharton: inclui as regiões perivascular, intervascular e subamion / zonas: 3-5. Adaptada de (Troyer & Weiss, 2008).

Na maioria das vezes CUH ainda é considerado como lixo hospitalar nas salas de parto, enquanto, em contraste com a aspiração de medula ossea (MO), é obtido por um procedimento simples, seguro e indolor. São muitas as vantagens do CUH como fonte de células-tronco humanas (CTHs) em relação a (MO) e ao sangue periférico (SP). Primeiro, o conjunto de unidades de sangue do cordão umbilical é fácil e não invasiva para o doador e, portanto, o número de potenciais doadores é maior do que no caso da medula (Wu et al., 2009b). Além disso, as MSCs de CUH são mais primitivas do que as MSCs isoladas de algumas fontes de outros tecidos, (Can & Karahuseyinoglu, 2007; Lu et al., 2006; Sarugaser et al., 2005; Wu et al., 2007). Portanto, sangue fresco do cordão umbilical também é uma fonte promissora de células-tronco não-hematopoiéticas, células endoteliais, MSCs e células tronco somáticas irrestrita (CTS), (Greschat et al., 2008; Kogler et al., 2004; Kogler et al., 2006; Sensken et al., 2007).

4.2 Canais iônicos

Organismos multicelulares complexos exigem uma rápida e precisa transmissão de informações entre as células e tecidos, e estreita coordenação das funções à distância. A membrana plasmática separa o meio intracelular do extracelular, diante disso a concentração iônica das células pode ser mantida em níveis consideravelmente diferentes entre o meio intracelular e os fluidos extracelulares. A permeabilidade seletiva da membrana mediada por canais, juntamente com a diferença de concentração iônica, gera um gradiente eletroquímico e uma diferença de potencial elétrico, entre o citoplasma e o meio externo. Este gradiente é bem utilizado pelas células em diversas funções, entre elas geração e propagação de potenciais de ação (Goldin et al., 2000).

Os canais iônicos são poros constituídos por proteínas integrais presentes nas membranas celulares e representam elementos fundamentais para o funcionamento das células excitáveis, tais como: neurônios, miócitos e células secretoras (Catterall et al., 2005). Estes poros são de grande importância, pois auxiliam no transporte rápido e seletivo de íons através da membrana celular, portanto estão relacionados a diversas funções fisiológicas. (Terlau & Stuhmer, 1998).

Os canais iônicos são divididos em três principais grupos, tendo sido levado em conta, o principal estímulo para sua ativação. No primeiro grupo estão os canais ativados por ligantes intracelulares, metabólitos ATP, AMPc, GMPc ou íons cálcio, como por exemplo os canais de

potássio e cloreto ativados por cálcio. No segundo grupo estão os canais ativados por ligantes extracelulares, são eles; receptores para neurotransmissores e canais sensíveis a ácidos. Por último, canal ativado por voltagem ou dependentes de voltagem (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-) (Terlau & Stuhmer, 1998).

Em vertebrados os sinais elétricos e a conseqüente transição de cálcio intracelular controla inúmeros processos biológicos, tais como: a contração muscular, secreção de hormônios, a sensibilidade ao estímulo do ambiente e processamento e saída da informação do cérebro para os tecidos periféricos. Nas células não excitáveis, o fluxo de cálcio é a chave de muitos eventos celulares, incluindo secreção de expressão gênica, e divisão celular. Todos esses processos fisiológicos são mediados em parte por membros da superfamília de proteínas de canais iônicos dependentes de voltagem. Esta superfamília de proteínas superior a 140 membros é um dos maiores grupos de proteínas de transdução de sinal, e muitos membros da família são alvos moleculares para toxinas e agentes terapêuticos (Yu & Catterall, 2004).

Devido a novas tecnologias utilizadas para o estudo de canais iônicos, hoje se conhece a grande participação destes componentes na membrana de células não-nervosas como as germinativas, glóbulos brancos e células de glândulas endócrinas, assim passamos a saber mais sobre importantes sinalizadores intracelulares que mantêm a homeostase fisiológica, a proliferação e a diferenciação celular (Park et al., 2007a) .

Dentre todos os tipos de canais iônicos conhecidos, os canais de potássio são os que apresentam o maior grupo e a maior diversificação, representado cerca de 70 locus no genoma de mamíferos (Gutman et al., 2005a). Estes canais incluem várias classes estruturalmente diferentes. Temos o canal de potássio retificador de entrada (K_{ir}), composto por 2 domínios transmembrana; o canal de potássio de dois poros (K_{2p}), com 4 domínios; o canal de potássio dependente de voltagem (K_v) e o canal de potássio ativado por cálcio (K_{Ca}), ambos com 6 domínios (Levitan et al., 2010).

4.2.1 Canais de potássio retificadores de entrada (K_{ir})

Estruturalmente os canais de potássio retificadores internos, são tetrâmeros, sendo constituídos por dois domínios transmembrana, poros e domínios citoplasmáticos N e C-terminal, sendo estes classificados em sete subfamílias Kir1 - Kir7 (Kubo *et al.*, 2005; Lopatin & Nichols, 1996).

Estes canais são um dos maiores subgrupos dentro do grupo de canais de potássio, estão diretamente relacionados na manutenção do potencial de membrana e na homeostase em diversos tipos celulares incluindo coração, cérebro, células vasculares e pâncreas (Bichet *et al.*, 2003; Kubo *et al.*, 2005; Nichols & Lopatin, 1997).

Dentre as subfamílias encontradas nos canais Kir, destacamos os canais de K⁺ dependentes de ATP (K⁺ ATP), são conhecidos por serem responsáveis pela conexão do metabolismo celular com a excitabilidade da membrana plasmática da célula, já que são bloqueados quando a relação citosólica ATP/ADP está elevada. Estes canais estão presentes em várias células e são relacionados a eventos celulares como secreção de insulina nas células beta pancreáticas, proteção contra eventos isquêmicos no coração e cérebro além de estarem envolvidos na regulação do tônus venoso (Teramoto, 2006). Os KATP em geral apresentam duas subunidades: a primeira é a unidade formadora do poro que pertence a família dos canais de K⁺ retificadores internos (Kir6.x); a segunda é a subunidade regulatória onde está localizado o receptor para as sulfoniluréias, fármacos que bloqueiam a atividade do canal (Sun e Hu, 2009).

4.2.2 Canais de potássio dependente de voltagem (K_v)

Este grupo de canais é o maior e mais diversificado dentro da família dos canais de potássio. Ele é composto por 40 membros, divididos em 12 subfamílias (Kv1-Kv12). A estrutura dos canais Kv são constituídas por tetrâmeros, com subunidades composta por seis hélices transmembrana (S1-S6) (Gutman et al., 2005b). Os canais Kv atuam em resposta a despolarização da membrana durante a fase de repolarização do potencial de ação para que a mesma retorne ao seu potencial de repouso. Além da presença destes canais em células excitáveis, estes também estão presentes em células não excitáveis, como diferentes tipos de células imunes, tendo importante função na resposta imunológica (Levitan et al., 2010).

4.2.3 Canais de potássio ativados por cálcio

Os canais de potássio ativados por cálcio são divididos em três grupos; Canais de potássio de pequena condutância (SK, KCa2), canais de potássio de condutância intermediária (IK, KCa3.1) e canais de potássio de grande condutância (BK, KCa1.1, maxi-K, ou Slo), podemos incluir ainda canais KCa4.1 e KCa4.2 ativados por Na (Slack and Slick, respectivamente) e KCa5.1 sensível a pH (Salkoff et al., 2006).

Estes canais acima podem ser encontrados em lugares diversos do organismo humano, citamos alguns exemplos; KCa1.1 o qual regula o tônus do músculo liso (Khan et al., 2001; Sprossmann et al., 2009), excitabilidade neuronal, atuação na atividade das glândulas secretoras de salivas e eletrólitos das glândulas salivares e eletrólitos (Perry & Sandle, 2009; Romanenko *et al.*, 2007); Kca4 encontrado no cérebro e em diversos tipos de miócitos (Bhattacharjee & Kaczmarek, 2005); a expressão do canal Kca5 é restrita aos testículos (Santi et al., 2009).

Os canais de condutância intermediária KCa3.1 são expressos principalmente em células não excitáveis, e são importantes na regulação do volume dos glóbulos vermelhos (Begenisich et al., 2004; (Vandorpe et al., 1998) e na ativação dos linfócitos T (Ghanshani et al., 2000; Logsdon et al., 1997).

Os canais de pequena condutância (SK) estão relacionados com a excitabilidade neuronal e a função do sistema nervoso central e periférico (Bond et al., 1999; Bond et al., 2005). Os canais de potássio ativados por Ca^{2+} são expressos no músculo liso e vasos, regulando assim as funções vasculares (Feletou, 2009; Ledoux et al., 2006).

4.2.4 Canais de cloreto dependentes de voltagem (ClC)

Os ClCs foram descobertos por clonagem utilizando a expressão de mRNA isolado do órgão elétrico do peixe *Torpedo marmorata*. As proteínas da família ClC são amplamente expressas em procariotas e eucariotas. Nos mamíferos, existem nove genes ClC que codificam canais de cloreto da membrana plasmática (ClC1 (CLCN1), ClC2 (CLCN2), ClCka (CLCNKA), ClCkb (CLCNKB)) e proteínas intracelulares (ClC3 (CLCN3), ClC4 (CLCN4), ClC5 (CLCN5), ClC6 (CLCN6), e ClC7 (CLCN7)).

Os canais de cloreto membros da família ClC estão amplamente distribuídos em várias espécies e desempenham importantes funções biológicas (Jentsch et al., 2002a).

Os canais ClC são proteínas transmembrana constituídas de duas subunidades idênticas que apresentam vários sítios de ligação para o Cl^- . Foram identificados até o momento 9 subtipos de canais que, em função da homologia estrutural, foram divididos em 3 subfamílias (Chen & Hwang, 2008). A primeira delas compreende os canais ClC-1, ClC-2, ClC-Ka e ClC-Kb. Eles estão presentes principalmente na membrana plasmática das células e são responsáveis pela estabilização do potencial transmembrana e pelo transporte transepitelial. A segunda família é composta pelos canais ClC-3, ClC-4 e ClC-5, os quais são expressos principalmente nas organelas intracelulares e estão relacionados com a regulação do pH vesicular (Chen & Hwang, 2008). Diferentemente dos demais membros da família, o ClC-3 está localizado tanto na membrana plasmática quanto em organelas intracelulares e está presente na maioria dos tecidos (Jentsch *et al.*, 2002b; Chen & Hwang, 2008). Relata-se que o influxo de Cl^- através dos canais ClC-3, estimula a exocitose em células de mamíferos (Barg et al., 2002). Os canais ClC-6 e ClC-7, membros da terceira subfamília, estão presentes em vários tecidos e a expressão destes canais ocorre preferencialmente nas organelas onde atuam na manutenção do pH. A atividade dos canais ClC é modulada principalmente pelo potencial transmembrana, porém, a regulação por ânions, pH, mensageiros intracelulares e proteínas cinases também foi relatada (Dutzler, 2006). Sabe-se que o ânion Cl^- está envolvido no processo de homeostase intracelular do Ca^{2+} . A ativação de canais e transportadores

de Cl^- mantém o potencial de membrana suficientemente negativo para facilitar o influxo de Ca^{2+} . Os bloqueadores de canais de Cl^- podem afetar a sinalização da concentração intracelular de Ca^{2+} através da modulação do fluxo de Cl^- . Dessa forma, o Cl^- aparece como um importante regulador de processos excitatórios estimulados pelo Ca^{2+} (Barg et al., 2002).

As estruturas de duas proteínas bacterianas ClC foram determinadas por cristalografia. As estruturas ClC dos eucariontes, embora ainda não tenham sido determinadas por esta técnica, foram modeladas por homologia dos ClC dos procariotas.

4.3 Modulação de canais iônicos

Os agentes que modulam canais de potássio controlados por voltagem (K_v) estão distribuídos em três categorias químicas: íons metálicos, moléculas orgânicas pequenas (PM 200-500 Da) e peptídeos derivados de veneno (PM 3-6 kDa) (Wulff et al., 2009).

Os canais iônicos dependente de voltagem têm grande importância em muitos aspectos na regulação celular e na transdução de sinais, por isso, são alvos moleculares para uma enorme escala de toxinas biológicas potentes. Entre estas se incluem as toxinas alcalóides hidrofóbicas e as toxinas solúveis em lipídeos que se ligam ao lado interno da membrana. Com isto, elas modificam o ativador do canal através da ligação com o domínio do sensor de voltagem ou das subunidades auxiliares que formam o canal (figura 3), e, como consequência, alteram a cinética, condutância e/ou a dependência de voltagem deste canal (Catterall et al., 2007; Wulff et al., 2009).

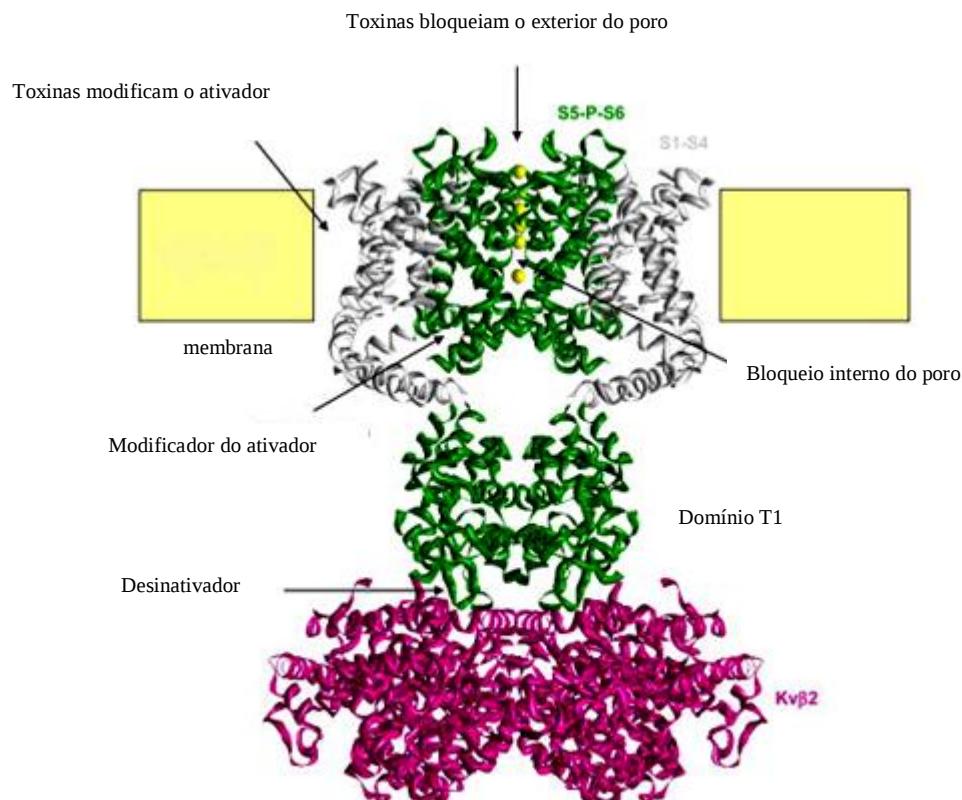


Figura 3: Estrutura do canal de potássio controlados por voltagem (K_v 1.2) com a região S5-P-S6 (verde), domínio do sensor de voltagem (cinza), domínio de tetramerização (verde) e a subunidade $K_v\beta 2$ intracelular (rosa). Apenas duas das quatro subunidades são mostradas (Wulff et al., 2009).

Tanto toxinas hidrofílicas de baixo peso molecular quanto toxinas polipeptídicas grandes atuam do lado extracelular e bloqueiam a passagem dos íons impedindo fisicamente o fluxo iônico através dos canais (Catterall et al., 2007).

Ativação farmacológica de canais de K^+ em células excitáveis reduz a excitabilidade destas células, enquanto a inibição do canal tem um efeito oposto e aumenta a sua excitabilidade (figura 4). (Wulff et al., 2009).

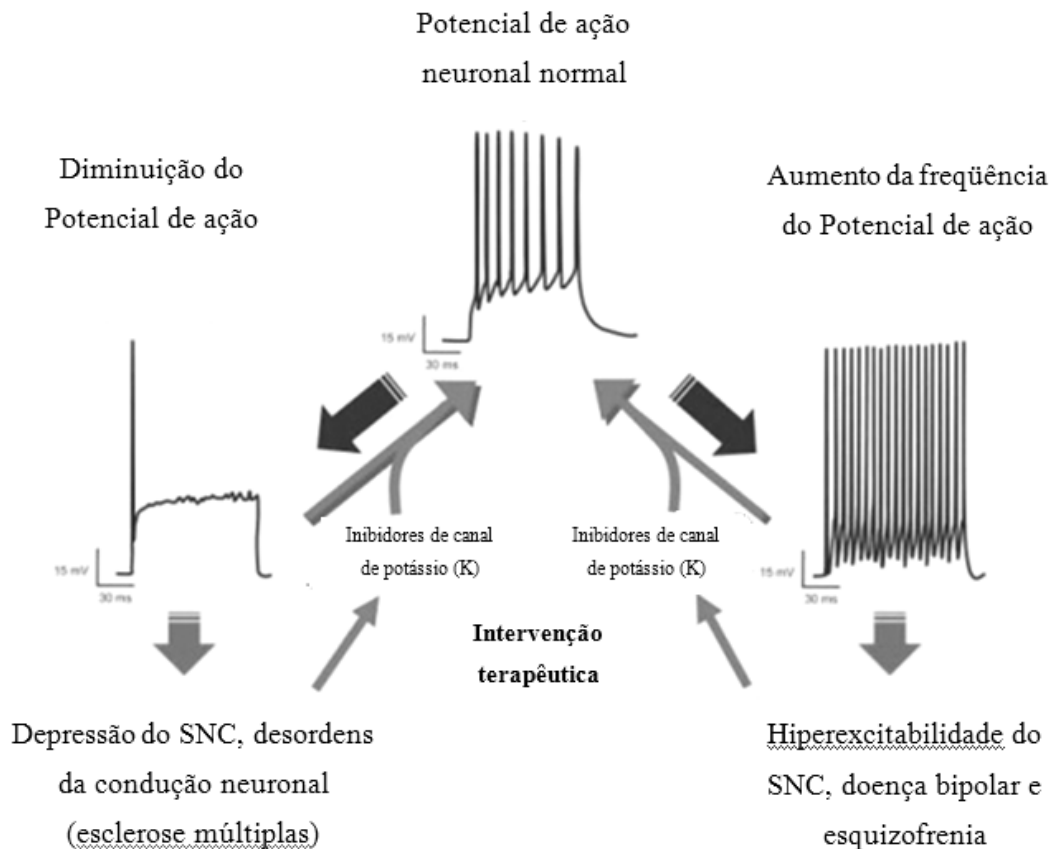


Figura 4: Transmissão da informação dentro do sistema nervoso. Essa transmissão está codificada na frequência do disparo do potencial elétrico em fibras nervosas. As alterações patológicas na frequência de disparo do potencial de ação podem levar a uma variedade de desordens neurológica e fisiológica. Canais K_v desempenham importantes papéis na definição do formato de onda do potencial de ação e os moduladores destes canais podem ter utilidade terapêutica (Wulff et al., 2009).

4.3.1 Ligantes dos canais de potássio dependentes de voltagem (K_v)

O tetraetilamônio (TEA, figura 5) e outros compostos de amônio quaternário (QAS) aplicado interna ou externamente bloqueiam vários canais de K^+ (Stanfield, 1983), cujo mecanismo de ação atua ocluindo fisicamente o poro interno inserindo seu grupo de amônio na via de permeação de íons, como demonstrado na (figura 6).

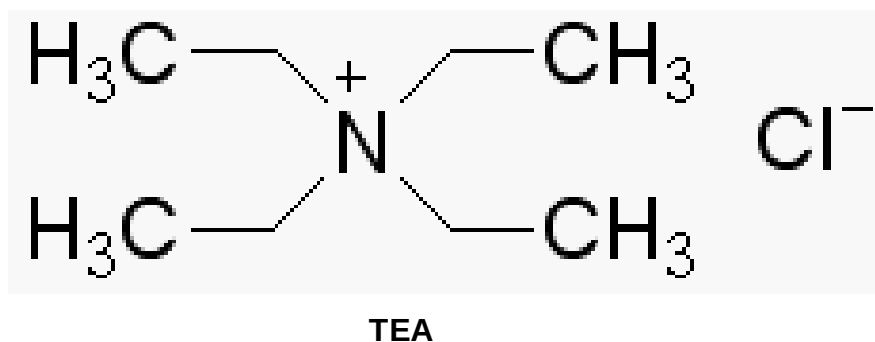


Figura 5: Representação da fórmula estrutural do tetraetilamônio (TEA)

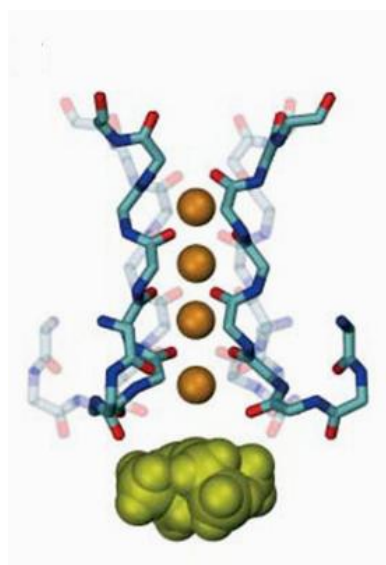


Figura 6: Bloqueio intracelular do canal de potássio (KcsA) pelo inibidor TEA. Ilustração gráfica do TEA no filtro de seletividade do canal K_{csA} (Kutluay et al., 2005).

Os dados eletrofisiológicos sugerem que QAS podem entrar e sair do canal somente quando ele estiver aberto, mas pode ser preso no canal fechado (ARMSTRONG, 1971; ARMSTRONG & Hille, 1972; ARMSTRONG, 1974a). Íons de amônio quaternários (QAS) têm sido ferramentas indispensáveis na análise de detalhes moleculares da ativação e condução dos canais de potássio ativados por voltagem (K_v) (ARMSTRONG, 1974b; French & Shoukimas, 1981; Liu *et al.*, 1997). Sua utilidade principal está relacionada com duas importantes características: sua diversidade

estrutural incluindo tanto moléculas simétricas como tetraetilamonio (TEA) e tetrabutilamonio bem como moléculas assimétricas e a localização em que eles se ligam.

Quase todos os canais de K_v são bloqueados por QAS no lado intracelular (Kutluay et al., 2005). Especificamente o bloqueio interno é largamente determinado pela hidrofobicidade da substância utilizada (ARMSTRONG, 1971; French & Shoukimas, 1981). De acordo com simples cenário, o processo de bloqueio pode ser visto como sendo completamente independente de permeação. Na realidade, no entanto, está claro que íons permeantes também julgam importante papel na ligação do bloqueio, outros por competição direta com o bloqueador pelo sitio de ligação, ou indiretamente através da repulsão eletrostática (Hille & Schwarz, 1978; Spassova & Lu, 1998; Spassova & Lu, 1999; Thompson & Begenisich, 2000; Thompson & Begenisich, 2001; Thompson & Begenisich, 2003).

Devido a estas complexidades de ligação da molécula bloqueadora, o entendimento da contribuição precisa de cada fator requer por fim o conhecimento da estrutura do canal e o ciclo de permeação. O QAS é amplamente aplicado em estudos experimentais, portanto é importante entender como essas moléculas interagem e se associam com os canais de potasio a nível microscópico.

Um outro tipo de QAS é o 4-aminopiridina (4-AP, figura 7), que é um lipídio solúvel composto por amônio quaternário, utilizado classicamente para bloquear seletivamente a condutância de potássio em nervos de barata, em axônio gigante de lula (Meves & Pichon, 1975; Yeh *et al.*, 1976), em nódulos de Ranvier (Ulbricht & Wagner, 1976) e em músculo esquelético de rã (Gillespie & Hutter, 1975). O efeito do 4-AP nas correntes de potássio de axônio de lula difere do efeito do TEA, um inibidor clássico da condutância de potássio (ARMSTRONG & BINSTOCK, 1965; ARMSTRONG, 1974b). O 4-AP atua igualmente nos lados interno e externo da membrana, enquanto o tetraetilamônio é somente efetivo do lado interno. O 4-AP não tem efeito em correntes de entrada de potássio. A mais interessante característica da ação do 4-AP é o efeito de pulsos de fixação repetitivos: o tamanho da corrente de potássio é muito lenta durante o primeiro pulso de despolarização, mas rápido durante o segundo pulso e pulsos posteriores. Este fenômeno tem sido observado em axônio de barata, em axônio gigante de lula (Meves & Pichon, 1975; Yeh *et al.*, 1976) e em nódulos de Ranvier e em músculo esquelético de rã (Ulbricht & Wagner, 1976). Isto é explicado pela remoção parcial do bloqueador 4-AP durante o primeiro pulso de despolarização.

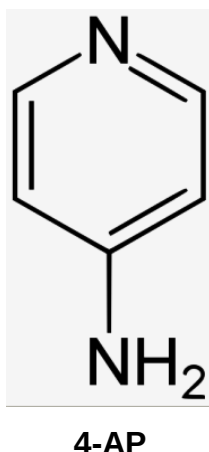


Figura 7: Representação da fórmula estrutural da 4-aminopiridina (4-AP)

4.3.2 Ligantes de canais de potássio dependente de cálcio (K_{Ca})

Iberiotoxina (IBTX) é capaz de bloquear canais de potássio ativado por cálcio de grande condutância (BK) ao se ligar a abertura externa do canal. O bloqueio é caracterizado pelo aparecimento dos estados de não condutância prolongada e separação da atividade do canal (Candia et al., 1992). Resultados similares têm sido relatados por (Giangiacomo et al., 1992) utilizando um $K(Ca)$, canal de músculo liso de aorta bovina.

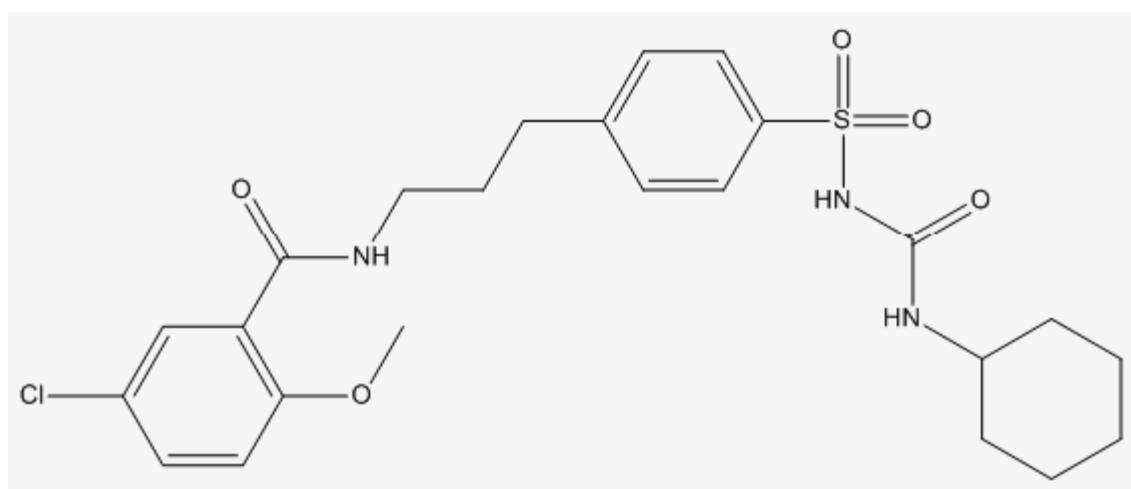
Clotrimazol, um imidazol antimicótico inibidor da P-450, tem sido utilizado em ensaios clínicos para a prevenção de desidratação celular na anemia falciforme (Brugnara et al., 1993) e para o tratamento de talassemia-b (De et al., 1996). A inibição induzida por Clotrimazole dos canais K_{Ca} nas hemácias falciformes parece ser independente da atividade da P-450 (Brugnara et al., 1995; Couprie et al., 1996). Nas células musculares lisas da veia porta de rato, clotrimazol também induziu uma ligeira inibição da $IK(Ca)$ (Edwards et al., 1996). Por outro lado, foi relatado que o clotrimazol pode efetivamente inibir a amplitude de $IK(Ca)$ em células musculares lisas e veia porta de furão (Rittenhouse et al., 1997b) células de eritroleucemia de murino (Rittenhouse et al., 1997a), células epiteliais do cólon (Devor et al., 1997; Rufo et al., 1997) e células pancreáticas b (Welker & Drews, 1997).

Apamina é uma neurotoxina do veneno de abelha, de 10 aminoácidos contendo duas pontes de dissulfeto. As experiências de fixação de voltagem e fixação de corrente têm mostrado que a apamina aplicada externamente bloqueia especificamente em baixa concentração ($0,1 \mu M$) canais de potássio dependentes de Ca^{+2} que medeiam a longa duração após a hiperpolarização em células de neuroblastoma e células musculares de ratos em cultura. Os canais de potássio dependentes de Ca^{+2} são insensíveis ao tetraetilamônio (TEA) (Lazdunski et al., 1985).

4.3.3 Ligantes de canais de potássio dependente de ATP (K_{ATP})

Os canais de K_{ATP} são alvos de duas maiores classes de compostos terapêuticos, inibidores como as sulfoniluréias e ativadores (KCOs), como bepridil (Ashcroft & Gribble, 2000; Gribble & Reimann, 2003). Destes, os mais importantes clinicamente são as sulfoniluréias. Elas são bloqueadores de K_{ATP} que são usadas para estimular a secreção de insulina em pacientes com diabetes mellitus tipo II (Gribble & Reimann, 2003). Os KCOs ativam canais K_{ATP} com uma grande escala de aplicações terapêuticas potenciais (Ashcroft & Gribble, 2000). Todas estas drogas afetam canais K_{ATP} via ação no receptor de sulfoniluréia (SUR). Sulfoniluréias tal como acetohexamida, tolbutamida, glipzida, glibenclamida, e glimepirida contêm uma estrutura s-fenilsulfonilureia (Doyle & Egan, 2003; Edwards & Weston, 1993). A estrutura da glibenclamida está mostrada na figura 8.

A ação antidiabética da sulfoniluréia foi primeiramente relatada em estudos para antibióticos sulfonamido que foram originalmente explorados como um tratamento efetivo para tifoide. O componente foi encontrado inesperadamente para induzir a hipoglicemia (Patlak, 2002). Sulfoniluréias ligam a SURx de canais K_{ATP} . Em células pancreáticas essa ligação inibe o efluxo de K^+ através dos canais K_{ATP} , causando despolarização da membrana celular pela abertura dos canais de cálcio dependente de voltagem (Ca_v), indução do influxo de Ca^{2+} e secreção de insulina.



Glibenclamida

Figura 8: Representação da fórmula estrutural da Glibenclamida

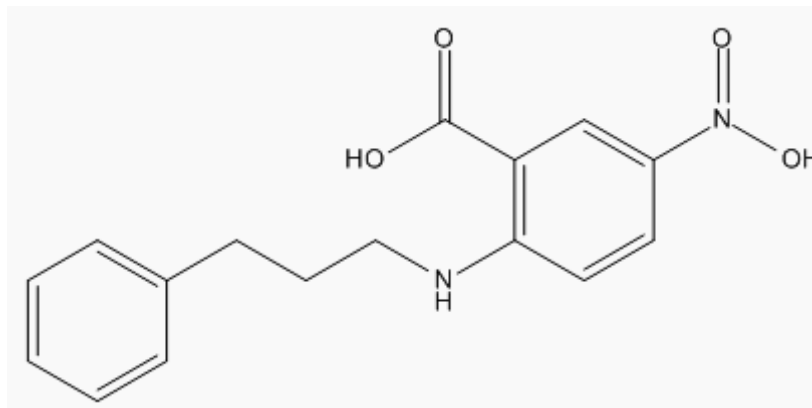
Sobre condições fisiológicas, um certo número de fatores adicionais estão envolvidos na ação da sulfoniluréia. Canais de K_{ATP} nativos, analisados eletrofisiologicamente na configuração “cell-attached”, são quase totalmente inibidos pela sulfoniluréias. Enquanto que nas membranas as drogas podem bloquear os mesmos canais em 50-70% (Gribble & Reimann, 2003). Essa diferença pode ser atribuída à presença de nucleotídeos difosfatados citoplasmáticos (NDPs), tais como Mg-ADP. Estes por sua vez influenciam Kir6.2/SUR1 através de dois mecanismos: forte ativação

através da inibição SUR1 e fraca inibição através do sítio de ligação do ATP em $K_{ir}6.2$, com a primeira contrabalanceada por sulfoniluréias. Portanto, o efeito inibitório de sulfoniluréias em canais K_{ATP} e canais $K_{ir}6.2/SUR1$ em células nativas é aparentemente reforçado através da supressão do efeito estimulatório de nucleotídeos difosfatados (Mg-NDP) (Babenko et al., 1999; Gribble et al., 1997).

4.3.4 Ligantes de canais de cloreto (Cl^-)

Estudos têm mostrado que correntes de Cl^- da veia porta de coelho podem ser reduzidas por compostos tais como 4-acetamido-4'-isothiocianato-2,2'-stilbenedisulfonic acid disodium salt (SITS), 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid disodium salt (DIDS), anthracene 9-carboxylate (9-AC) e ácido niflumico. No entanto, essas drogas também aumentaram a magnitude de correntes de potássio sensível ao Cálcio (Hogg et al., 1994a; Hogg et al., 1994b).

O ácido 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico (NPPB) é amplamente utilizado como um inibidor de diversos canais de cloreto. O NPPB é um inibidor da liberação de ATP mediada por canais de Cl^- (Hisadome et al., 2002; Sauer et al., 2000) e também é um potente inibidor da condutância do Cl^- epitelial (Wangemann et al., 1986). Além disso, esse agente bloqueia completamente canais de cloreto retificadores de saída presentes no epitélio da traquéia canina (Li et al., 1990) e enterócitos do cólon de ratos (Singh et al., 1991; Venglarik et al., 1994). Estudos recentes também demonstram que o NPPB inibiu correntes de Cl^- em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato (Tao et al., 2007). A estrutura do NPPB está presente na figura 9.



Ácido 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino)benzoico (NPPB)

Figura 9: Representação da fórmula estrutural do NPPB.

4.4 A técnica de “patch clamp”

A técnica de “patch clamp” originou-se de um esforço para registrar correntes iônicas em canais iônicos individuais em membranas biológicas. A idéia geral foi tentar isolar uma pequena área da membrana celular (“patch”) para efetuar medições elétricas locais. Para isto a ponta de um

eletrodo (micropipeta de vidro preenchida com solução fisiológica) era colocada na superfície da célula de modo que correntes iônicas do “patch” pudessem ser registradas em decorrência da fixação do potencial elétrico (“voltage clamp”).(Hamill *et al.*, 1981)

A análise destes registros levou à conclusão de que tais eletrodos permitiam o registro de correntes da ordem de picoampéres toda vez que a resistência do selo (resistência entre o interior da micropipeta e o meio extracelular) pudesse ser muito maior que a resistência interna do eletrodo. Otimização na geometria da micropipeta e a aplicação de uma pequena sucção dentro da micropipeta em contato com a célula conduziram a descoberta do fenômeno chamado “formação do giga-selo” (resistência do selo da ordem de dezenas de Mega-ohms) demonstrado na (figura 10). Esse fenômeno consiste de uma transição repentina da resistência de selo da ordem de dezenas de mega-Ohms. Embora as bases físicas para a formação do giga-selo ainda não estejam bastantes claras, sua formação certamente aumenta a resolução dos registros em uma ordem de grandeza e produz estabilidade mecânica do “patch” dentro da micropipeta. (Hamill *et al.*, 1981).

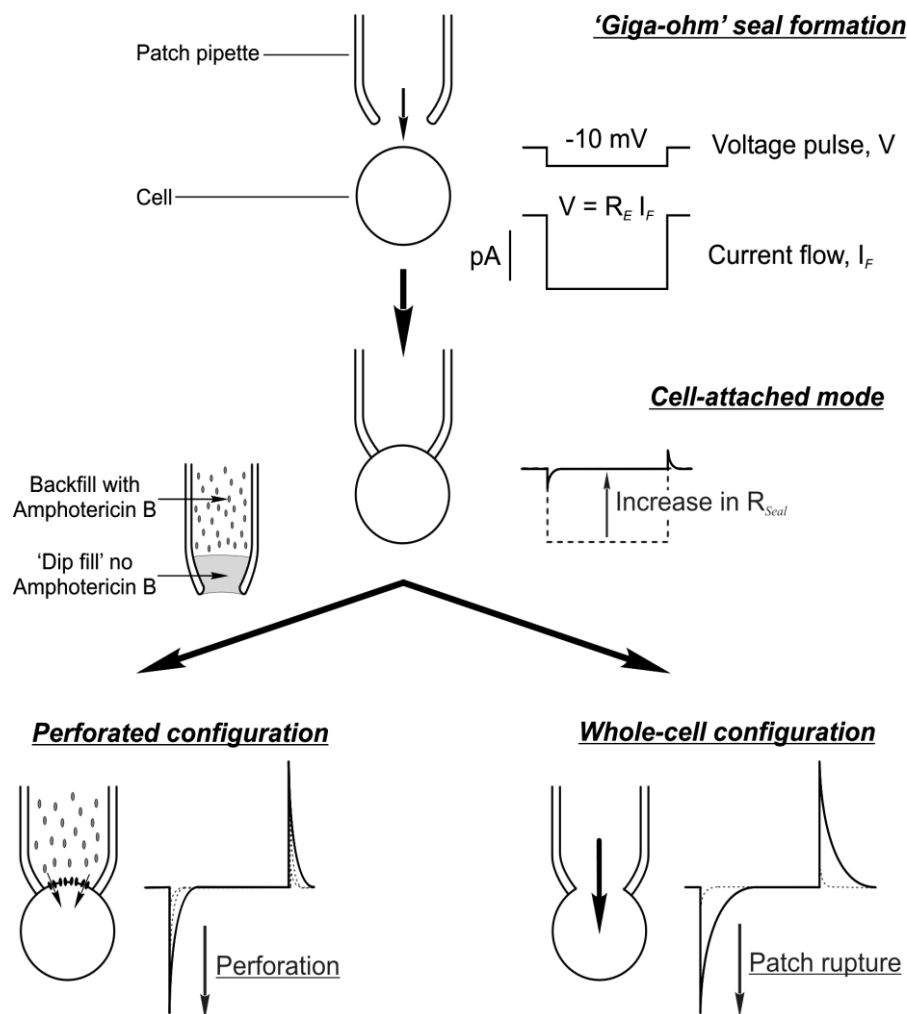


Figura 10: Formação do giga-selo e possíveis configurações de registro da técnica de “Patch clamp”.

Uma variedade de configurações de registros é possível após a formação do giga-selo. A (figura 11) ilustra quatro configurações básicas de “patch clamp”. Os números que aparecem na figura representam potenciais elétricos (em milivolts, “mV”) que foram escolhidos de modo que um potencial de -50 mV ficasse aplicado em todas as configurações representadas (assumindo um potencial de repouso da célula de -70 mV). O canto superior esquerdo representa a aproximação do eletrodo na célula para formação do giga-selo e a obtenção da configuração de “cell-attached patch clamp”. A partir desta configuração podem ser obtidas: 1- a configuração de “inside-out patch clamp” em decorrência do afastamento do eletrodo de modo a separar o “patch” de membrana da célula; 2- a configuração de “whole-cell patch clamp”, pela ruptura do “patch” usando pulso de sucção ou tensão; e 3- a configuração “outside-out patch clamp”.

Configurações

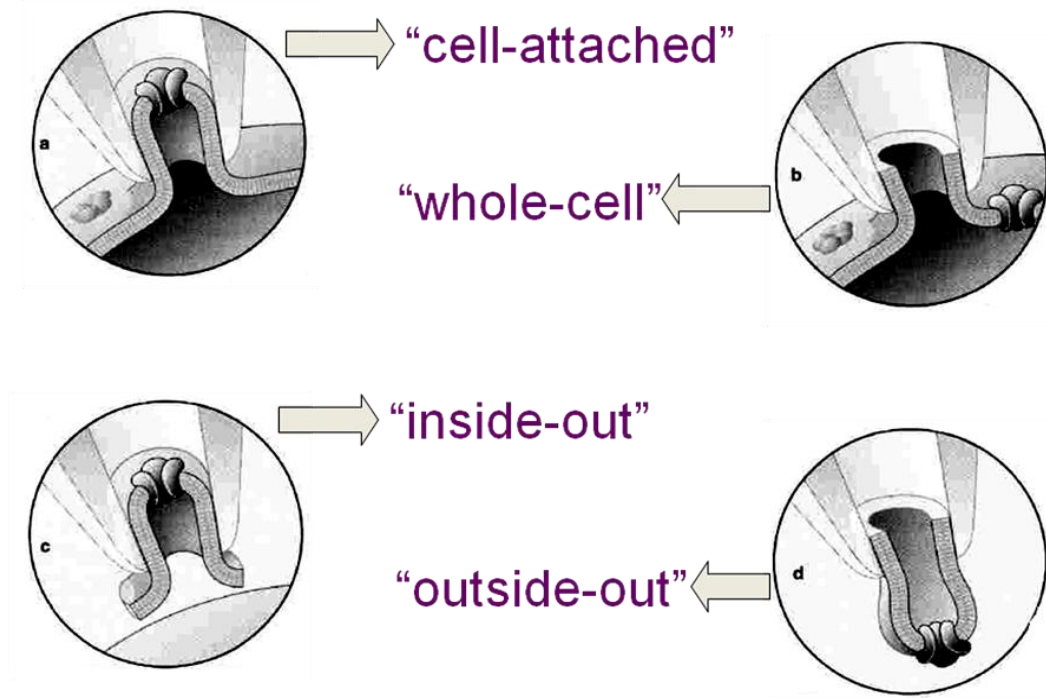


Figura 11: Ilustração das quatro configurações básicas em “Patch clamp”.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG CM. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol* **58**, 413-437 (1971).

ARMSTRONG CM. Ionic pores, gates, and gating currents. *Q Rev Biophys* **7**, 179-210 (1974a).

ARMSTRONG CM. Ionic pores, gates, and gating currents. *Q Rev Biophys* **7**, 179-210 (1974b).

ARMSTRONG CM & BINSTOCK L. ANOMALOUS RECTIFICATION IN THE SQUID GIANT AXON INJECTED WITH TETRAETHYLAMMONIUM CHLORIDE. *J Gen Physiol* **48**, 859-872 (1965).

ARMSTRONG CM & Hille B. The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier. *J Gen Physiol* **59**, 388-400 (1972).

Ashcroft FM & Gribble FM. New windows on the mechanism of action of K(ATP) channel openers. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 439-445 (2000).

Babenko AP, Gonzalez G, & Bryan J. The tolbutamide site of SUR1 and a mechanism for its functional coupling to K(ATP) channel closure. *FEBS Lett* **459**, 367-376 (1999).

Bai X, Ma J, Pan Z, Song YH, Freyberg S, Yan Y, Vykoukal D, & Alt E. Electrophysiological properties of human adipose tissue-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1539-C1550 (2007).

Baksh D, Yao R, & Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* **25**, 1384-1392 (2007).

Barg S, Eliasson L, Renstrom E, & Rorsman P. A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes* **51**, S74-S82 (2002).

Bhattacharjee A & Kaczmarek LK. For K⁺ channels, Na⁺ is the new Ca²⁺. *Trends Neurosci* **28**, 422-428 (2005).

Bichet D, Haass FA, & Jan LY. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat Rev Neurosci* **4**, 957-967 (2003).

Bond CT, Maylie J, & Adelman JP. Small-conductance calcium-activated potassium channels. *Ann N Y Acad Sci* **868**, 370-378 (1999).

Bond CT, Maylie J, & Adelman JP. SK channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 305-311 (2005).

Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, & Boyse EA. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3828-3832 (1989).

Brugnara C, Armsby CC, Sakamoto M, Rifai N, Alper SL, & Platt O. Oral administration of clotrimazole and blockade of human erythrocyte Ca^{++} -activated K^{+} channel: the imidazole ring is not required for inhibitory activity. *J Pharmacol Exp Ther* **273**, 266-272 (1995).

Brugnara C, De FL, & Alper SL. Inhibition of Ca^{2+} -dependent K^{+} transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest* **92**, 520-526 (1993).

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, & Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* **98**, 2396-2402 (2001).

Can A & Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* **25**, 2886-2895 (2007).

Candia S, Garcia ML, & Latorre R. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Biophys J* **63**, 583-590 (1992).

Caplan AI & Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* **7**, 259-264 (2001).

Catterall WA, Cestele S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, & Scheuer T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* **49**, 124-141 (2007).

Catterall WA, Goldin AL, & Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 397-409 (2005).

Chen TY & Hwang TC. CLC-0 and CFTR: Chloride channels evolved from transporters. *Physiological Reviews* **88**, 351-387 (2008).

Coupry I, Armsby CC, Alper SL, Brugnara C, & Parini A. Clotrimazole and efaroxan inhibit red cell Gardos channel independently of imidazoline I1 and I2 binding sites. *Eur J Pharmacol* **295**, 109-112 (1996).

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, & Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* **14**, 1115-1122 (1999).

De FL, Rouyer-Fessard P, Alper SL, Jouault H, Brugnara C, & Beuzard Y. Combination therapy of erythropoietin, hydroxyurea, and clotrimazole in a beta thalassemic mouse: a model for human therapy. *Blood* **87**, 1188-1195 (1996).

Deans RJ & Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* **28**, 875-884 (2000).

Deng XL, Sun HY, Lau CP, & Li GR. Properties of ion channels in rabbit mesenchymal stem cells from bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 301-309 (2006).

Devor DC, Singh AK, Gerlach AC, Frizzell RA, & Bridges RJ. Inhibition of intestinal Cl⁻ secretion by clotrimazole: direct effect on basolateral membrane K⁺ channels. *Am J Physiol* **273**, C531-C540 (1997).

Doyle ME & Egan JM. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev* **55**, 105-131 (2003).

Dutzler R. The CIC family of chloride channels and transporters. *Current Opinion in Structural Biology* **16**, 439-446 (2006).

Edwards G & Weston AH. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **33**, 597-637 (1993).

Edwards G, Zygmunt PM, Hogestatt ED, & Weston AH. Effects of cytochrome P450 inhibitors on potassium currents and mechanical activity in rat portal vein. *Br J Pharmacol* **119**, 691-701 (1996).

Erices A, Conget P, & Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* **109**, 235-242 (2000).

Feletou M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol* **156**, 545-562 (2009).

Fioretti B, Castigli E, Calzuola I, Harper AA, Franciolini F, & Catacuzzeno L. NPPB block of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Eur J Pharmacol* **497**, 1-6 (2004).

French RJ & Shoukimas JJ. Blockage of squid axon potassium conductance by internal tetra-N-alkylammonium ions of various sizes. *Biophys J* **34**, 271-291 (1981).

Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, & Chandy KG. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* **275**, 37137-37149 (2000).

Giangiacomo KM, Garcia ML, & McManus OB. Mechanism of iberitoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* **31**, 6719-6727 (1992).

Gillespie JI & Hutter OF. Proceedings: The actions of 4-aminopyridine on the delayed potassium current in skeletal muscle fibres. *J Physiol* **252**, 70P-71P (1975).

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, & .. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* **321**, 1174-1178 (1989).

Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chamard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, & Chastang C. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* **337**, 373-381 (1997).

Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, & Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **28**, 365-368 (2000).

Greschat S, Schira J, Kury P, Rosenbaum C, de Souza Silva MA, Kogler G, Wernet P, & Muller HW. Unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood can be differentiated into neurons with a dopaminergic phenotype. *Stem Cells Dev* **17**, 221-232 (2008).

Gribble FM & Reimann F. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia* **46**, 875-891 (2003).

Gribble FM, Tucker SJ, & Ashcroft FM. The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K^{+} channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol* **504** (Pt 1), 35-45 (1997).

Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, & Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* **116**, 1827-1835 (2003).

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, & Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 473-508 (2005a).

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, & Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 473-508 (2005b).

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, & Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100 (1981).

Han IS, Ra JS, Kim MW, Lee EA, Jun HY, Park SK, & Kwon BS. Differentiation of CD34+ cells from human cord blood and murine bone marrow is suppressed by C6 beta-chemokines. *Mol Cells* **15**, 176-180 (2003).

Herzog EL, Chai L, & Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* **102**, 3483-3493 (2003).

Heubach JF, Graf EM, Leutheuser J, Bock M, Balana B, Zahanich I, Christ T, Boxberger S, Wettwer E, & Ravens U. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J Physiol* **554**, 659-672 (2004).

Hille B & Schwarz W. Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J Gen Physiol* **72**, 409-442 (1978).

Hisadome K, Koyama T, Kimura C, Droogmans G, Ito Y, & Oike M. Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol* **119**, 511-520 (2002).

Hodgkin AL, Huxley AF, & KATZ B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* **116**, 424-448 (1952).

Hogg RC, Wang Q, & Large WA. Action of niflumic acid on evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br J Pharmacol* **112**, 977-984 (1994a).

Hogg RC, Wang Q, & Large WA. Effects of Cl channel blockers on Ca-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br J Pharmacol* **111**, 1333-1341 (1994b).

in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, & Fibbe WE. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* **88**, 845-852 (2003).

Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, & Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* **82**, 503-568 (2002a).

Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, & Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological Reviews* **82**, 503-568 (2002b).

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, & Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-49 (2002).

Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, & McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* **46**, 3349-3360 (2002).

Khan RN, Matharoo-Ball B, Arulkumaran S, & Ashford ML. Potassium channels in the human myometrium. *Exp Physiol* **86**, 255-264 (2001).

Kim SK, Koh SK, Song SU, Shin SH, Choi GS, Kim WC, Lee MH, Seoh JY, Park SK, & Fraser JK. Ex vivo expansion and clonality of CD34⁺ selected cells from bone marrow and cord blood in a serum-free media. *Mol Cells* **14**, 367-373 (2002).

Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, & Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* **200**, 123-135 (2004).

Kogler G, Sensken S, & Wernet P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Exp Hematol* **34**, 1589-1595 (2006).

Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, & Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature

and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 509-526 (2005).

Kutluay E, Roux B, & Heginbotham L. Rapid intracellular TEA block of the KcsA potassium channel. *Biophys J* **88**, 1018-1029 (2005).

Lazdunski M, Fosset M, Hughes M, Mourre C, Romey G, & Schmid-Antomarchi H. The apamin-sensitive Ca^{2+} -dependent K^{+} channel molecular properties, differentiation and endogenous ligands in mammalian brain. *Biochem Soc Symp* **50**, 31-42 (1985).

Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, & Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* **21**, 69-78 (2006).

Levitan I, Fang Y, Rosenhouse-Dantsker A, & Romanenko V. Cholesterol and ion channels. *Subcell Biochem* **51**, 509-549 (2010).

Li GR, Sun H, Deng X, & Lau CP. Characterization of ionic currents in human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells* **23**, 371-382 (2005).

Li M, McCann JD, & Welsh MJ. Apical membrane Cl^{-} channels in airway epithelia: anion selectivity and effect of an inhibitor. *Am J Physiol* **259**, C295-C301 (1990).

Liu Y, Holmgren M, Jurman ME, & Yellen G. Gated access to the pore of a voltage-dependent K^{+} channel. *Neuron* **19**, 175-184 (1997).

Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, Gleneck K, Shihabuddin L, & Tubo R. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng* **8**, 739-751 (2002).

Logsdon NJ, Kang J, Togo JA, Christian EP, & Aiyar J. A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem* **272**, 32723-32726 (1997).

Lopatin AN & Nichols CG. $[\text{K}^{+}]$ dependence of polyamine-induced rectification in inward rectifier potassium channels (IRK1, Kir2.1). *J Gen Physiol* **108**, 105-113 (1996).

Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, & Han ZC. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* **91**, 1017-1026 (2006).

Meves H & Pichon Y. Proceedings: Effects of 4-aminopyridine on the potassium current in internally perfused giant axons of the squid. *J Physiol* **251**, 60P-62P (1975).

Muraglia A, Cancedda R, & Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* **113** (Pt 7), 1161-1166 (2000).

Neher E & Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802 (1976).

Neher E & Sakmann B. The patch clamp technique. *Sci Am* **266**, 44-51 (1992).

Neher E, Sakmann B, & Steinbach JH. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch* **375**, 219-228 (1978).

Nichols CG & Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* **59**, 171-191 (1997).

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, & Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-705 (2001).

Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA, Jr., Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, Rocha V, Covas DT, & Zago MA. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **22**, 1263-1278 (2004).

Park KS, Jung KH, Kim SH, Kim KS, Choi MR, Kim Y, & Chai YG. Functional expression of ion channels in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord vein. *Stem Cells* **25**, 2044-2052 (2007a).

Park KS, Jung KH, Kim SH, Kim KS, Choi MR, Kim Y, & Chai YG. Functional expression of ion channels in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord vein. *Stem Cells* **25**, 2044-2052 (2007b).

Patlak M. New weapons to combat an ancient disease: treating diabetes. *FASEB J* **16**, 1853 (2002).

Perry MD & Sandle GI. Regulation of colonic apical potassium (BK) channels by cAMP and somatostatin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **297**, G159-G167 (2009).

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, & Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999a).

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, & Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999b).

Pittenger MF & Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* **95**, 9-20 (2004).

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, & Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* **109**, 337-346 (2002).

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, & Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **98**, 2615-2625 (2001).

Rittenhouse AR, Parker C, Brugnara C, Morgan KG, & Alper SL. Inhibition of maxi-K currents in ferret portal vein smooth muscle cells by the antifungal clotrimazole. *Am J Physiol* **273**, C45-C56 (1997a).

Rittenhouse AR, Vandompe DH, Brugnara C, & Alper SL. The antifungal imidazole clotrimazole and its major in vivo metabolite are potent blockers of the calcium-activated potassium channel in murine erythroleukemia cells. *J Membr Biol* **157**, 177-191 (1997b).

Romanenko VG, Nakamoto T, Srivastava A, Begenisich T, & Melvin JE. Regulation of membrane potential and fluid secretion by Ca^{2+} -activated K^{+} channels in mouse submandibular glands. *J Physiol* **581**, 801-817 (2007).

Rufo PA, Merlin D, Riegler M, Ferguson-Maltzman MH, Dickinson BL, Brugnara C, Alper SL, & Lencer WI. The antifungal antibiotic, clotrimazole, inhibits chloride secretion by human intestinal T84 cells via blockade of distinct basolateral K^{+} conductances. Demonstration of efficacy in intact rabbit colon and in an in vivo mouse model of cholera. *J Clin Invest* **100**, 3111-3120 (1997).

Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, & Wei A. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci* **7**, 921-931 (2006).

Santi CM, Butler A, Kuhn J, Wei A, & Salkoff L. Bovine and mouse SLO3 K^{+} channels: evolutionary divergence points to an RCK1 region of critical function. *J Biol Chem* **284**, 21589-21598 (2009).

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, & Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* **23**, 220-229 (2005).

Sauer H, Hescheler J, & Wartenberg M. Mechanical strain-induced Ca^{2+} waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C295-C307 (2000).

Sensken S, Waclawczyk S, Knaupp AS, Trapp T, Enczmann J, Wernet P, & Kogler G. In vitro differentiation of human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells towards an endodermal pathway. *Cytotherapy* **9**, 362-378 (2007).

Singh AK, Afink GB, Venglarik CJ, Wang RP, & Bridges RJ. Colonic Cl channel blockade by three classes of compounds. *Am J Physiol* **261**, C51-C63 (1991).

Spasova M & Lu Z. Coupled ion movement underlies rectification in an inward-rectifier K^+ channel. *J Gen Physiol* **112**, 211-221 (1998).

Spasova M & Lu Z. Tuning the voltage dependence of tetraethylammonium block with permeant ions in an inward-rectifier K^+ channel. *J Gen Physiol* **114**, 415-426 (1999).

Sprossmann F, Pankert P, Sausbier U, Wirth A, Zhou XB, Madlung J, Zhao H, Bucurenciu I, Jakob A, Lamkemeyer T, Neuhuber W, Offermanns S, Shipston MJ, Korth M, Nordheim A, Ruth P, & Sausbier M). Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder. *FEBS J* **276**, 1680-1697 (2009).

Stanfield PR. Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **97**, 1-67 (1983).

Sussman M. Cardiovascular biology. Hearts and bones. *Nature* **410**, 640-641 (2001).

Tao R, Lau CP, Tse HF, & Li GR. Functional ion channels in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1561-C1567 (2007).

Terlau H & Stuhmer W. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften* **85**, 437-444 (1998).

Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, & Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* **32**, 11-16 (2000).

Thompson J & Begenisich T. Interaction between quaternary ammonium ions in the pore of potassium channels. Evidence against an electrostatic repulsion mechanism. *J Gen Physiol* **115**, 769-782 (2000).

Thompson J & Begenisich T. Affinity and location of an internal K^+ ion binding site in shaker K channels. *J Gen Physiol* **117**, 373-384 (2001).

Thompson J & Begenisich T. External TEA block of shaker K⁺ channels is coupled to the movement of K⁺ ions within the selectivity filter. *J Gen Physiol* **122**, 239-246 (2003).

Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, & Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* **100**, 11247-11256 (1999).

Toro L, Wallner M, Meera P, & Tanaka Y. Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News Physiol Sci* **13**, 112-117 (1998).

Troyer DL & Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* **26**, 591-599 (2008).

Ulbricht W & Wagner HH. Block of potassium channels of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal on depolarization. *Pflugers Arch* **367**, 77-87 (1976).

Venglarik CJ, Singh AK, & Bridges RJ. Comparison of -nitro versus -amino 4,4'-substituents of disulfonic stilbenes as chloride channel blockers. *Mol Cell Biochem* **140**, 137-146 (1994).

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, & Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* **33**, 1402-1416 (2005).

Wang K, Xue T, Tsang SY, Van HR, Wong CW, Lai KW, Ye Z, Cheng L, Au KW, Zhang J, Li GR, Lau CP, Tse HF, & Li RA. Electrophysiological properties of pluripotent human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**, 1526-1534 (2005).

Wangemann P, Wittner M, Di SA, Englert HC, Lang HJ, Schlatter E, & Greger R. Cl(-)-channel blockers in the thick ascending limb of the loop of Henle. Structure activity relationship. *Pflugers Arch* **407 Suppl 2**, S128-S141 (1986).

Welker S & Drews G. Imidazole antimycotics affect the activity of various ion channels and insulin secretion in mouse pancreatic B-cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **356**, 543-550 (1997).

Wu KH, Zhou B, Lu SH, Feng B, Yang SG, Du WT, Gu DS, Han ZC, & Liu YL. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem* **100**, 608-616 (2007).

Wu LF, Wang NN, Liu YS, & Wei X. Differentiation of Wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* **15**, 2865-2873 (2009a).

Wu LF, Wang NN, Liu YS, & Wei X. Differentiation of Wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* **15**, 2865-2873 (2009b).

Wulff H, Castle NA, & Pardo LA. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 982-1001 (2009).

Yeh JZ, Oxford GS, Wu CH, & Narahashi T. Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. *Biophys J* **16**, 77-81 (1976).

Yu FH & Catterall WA. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* **2004**, re15 (2004).

ZAGO M.A., COVAS D.T. Células-Tronco, a Nova Fronteira da Medicina. Editora ATHENEU 1º reimpressão, 1º edição, (2007).

6 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo em forma de manuscrito a ser submetido na revista:

STEM CELL

ESTUDO ELETROFISIOLÓGICO DOS CANAIS IÔNICOS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA GELÉIA DE WHARTON DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO

Williamis do Nascimento¹, Aldenise Lizandra de Miranda Oliveira¹, Darlene Paiva Bezerra¹, Lindalva Layse de Lima Malagueta Vieira¹, Gisely Juliane Barbosa de Albertim¹, Jéssica Varão Vasconcelos¹, Reginaldo Pereira da Silva², Cláudio Gabriel Rodrigues¹, Liliya N. Yuldasheva¹, Márcia Bezerra da Silva¹ e Oleg V. Krasilnikov¹.

¹Departamento de Biofísica e radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE Brasil; ²Departamento de fisiologia e farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

ABSTRACT

The knowledge about diversity of ion channels in stem cells is important because these structures can participate in controlling their proliferation and differentiation. However, few studies focused on ion channels presented in the plasma membranes of stem cells. Moreover, there is not a study of ion channels presented in the plasma membranes of mesenchymal stem cells in Wharton's jelly of human umbilical cord (whMSC) although umbilical cord is one of important sources of stem cells for cell therapy. These facts predetermined the aim of the present study – looking for types of ion channels presented in whMSC. Patch-clamp technique in whole-cell configuration and specific inhibitors of ion transport were used to identify type of ion channels presented in whMSC. Inhibitors chosen were: tetraethylammonium (TEA) and 4-aminopyridine (4-AP) - inhibitors of voltage-gated and Ca^{2+} - dependent potassium channels; glibenclamide (GB) - an inhibitor of ATP-dependent potassium channels, volume and cAMP sensitive anion channels; and 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) - a potent blocker of chloride channels, which is able to block Ca^{2+} - dependent potassium channels of intermediate conductance. We observed that the voltage-activated ionic currents of whMSC could be significantly blocked by TEA (10 mM), 4-AP (5 mM) and NPPB (100 mM). The results indicate the presence of voltage- and Ca^{2+} - dependent potassium channels and voltage-dependent Cl^- -channel as it was described for stem cells isolated from other adult tissues. Using GB (100 mM) we have expected to observe the similar inhibitory action or lack of effect, but unexpectedly found that GB significantly increased (stimulated) the voltage dependent transmembrane current. Such effect was not reported before. In all cases the effects of used inhibitors were reversible. These results demonstrate that the cytoplasmic membrane of Wharton's jelly mesenchymal stem cells of human umbilical cord possesses of voltage-gated and Ca^{2+} -dependent K^+ channels and voltage dependent Cl^- channels. The surprising effect of glibenclamide indicates the presence of unknown ion channels in the membranes of whMSC. Other experiments are needed to identify them.

Key words: Wharton's jelly; mesenchymal stem cells; ion channels; Patch-clamp; tetraethylammonium (TEA); 4-aminopyridine (4-AP); glibenclamide (GB); 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB).

INTRODUÇÃO

Muitos tecidos adultos contêm populações de células tronco que tem a capacidade de se renovar após trauma, doenças, ou envelhecimento. Estas células podem ser encontradas no próprio tecido ou em outros tecidos que servem de reservatórios de células-tronco (Pittenger et al., 1999a). Por exemplo, na medula óssea são encontradas células que irão originar a linhagem hematopoiética e também, as células-tronco mesenquimais. As células-tronco mesenquimais (MSC), têm sido caracterizadas por seu crescimento e aderência no plástico e subsequente expansão em condições de cultura específica, pela exposição de antígenos de superfície e por seu potencial de diferenciação *in vivo* e *in vitro*. A Indução da diferenciação destas MSC em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, tem sido demonstrada extensivamente sob condições de cultura apropriadas. Fenotipicamente as MSCs têm sido definidas como positivas para os marcadores CD29, CD44, CD90 e CD105, e negativa para os marcadores da linhagem hematopoiética como CD31, CD34, CD45, CD14 e CD19 e para o antígeno leucocitário humano DR (HLA-DR) (Wagner et al., 2005). Células tronco mesenquimais do estroma da medula óssea foram isoladas recentemente e expandidas *in vitro* a partir da medula óssea de diferentes espécies (camundongos, ratos e humanos), (Caplan & Bruder, 2001;Jiang et al., 2002;Pittenger et al., 1999a;Reyes et al., 2001;Reyes et al., 2002) .Após injeção sistêmica estas células apresentaram potencial multilinhagem para incorporar dentro de uma variedade de tecidos como osso, cartilagem, músculo, pulmão e baço (Deans & Moseley, 2000;Jiang et al., 2002;Pittenger et al., 1999a). Elas também foram capazes de formar outros tipos de tecidos ou células *in vitro* como hepatócitos, cardiomiócitos e células neuronais (Caplan & Bruder, 2001;Jiang et al., 2002;Reyes et al., 2001). Estudos em animais mostraram que transplante de MSCs para miocárdio infartado melhorou significativamente a função do coração (Orlic et al., 2001;Sussman, 2001;Tomita et al., 1999).

A medula óssea humana tem sido reconhecida como uma importante fonte de MSC para os estudos clínicos e experimentais (Heubach et al., 2004;Li et al., 2005;Orlic et al., 2001;Pittenger et al., 1999b;Theise et al., 2000). Estas MSCs humanas têm mostrado potencial para se diferenciar em vários tipos celulares. Elas são caracterizadas pelo seu alto potencial de expansão, estabilidade genética e alta capacidade de reprodução em laboratórios. Elas também apresentam compatibilidade com a engenharia tecidual, e têm potencial para aumentar o reparo em muitos tecidos vitais (Caplan & Bruder, 2001;Gronthos et al., 2003;Jones et al., 2002;Lodie et al., 2002;Muraglia et al., 2000;Pittenger & Martin, 2004;Caplan & Bruder, 2001;Jiang et al., 2002;Pittenger et al., 1999b;Reyes et al., 2001;Reyes et al., 2002).

Porém, devido à frequência e a capacidade de diferenciação das MSCs diminuir com a idade (D'Ippolito et al., 1999), fontes alternativas de MSCs para uso autólogo e alogênico têm sido

procuradas. MSCs foram identificadas no líquido amniótico humano, placenta, veias, sangue do cordão umbilical (SCU) (D'Ippolito et al., 1999; Erices et al., 2000; in 't Anker et al., 2003; Panepucci et al., 2004), bem como em vários tecidos fetais, incluindo medula óssea, fígado, sangue, pulmão e baço (Campagnoli et al., 2001; in 't Anker et al., 2003).

O cordão umbilical humano (CUH) contém duas artérias e uma veia, que são rodeados por tecido conjuntivo mucóide, e isso é chamado de geléia de Wharton. O CUH tem sido utilizado como fonte alternativa desde 1988 (Gluckman et al., 1989). O sangue remanescente da veia umbilical após o nascimento, contém uma rica fonte de células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras, tem sido utilizadas com sucesso como uma fonte alternativa de doadores alogênicos para tratar uma variedade de doenças oncológicas pediátricas, imunológicas, hematológicas genéticas (Broxmeyer et al., 1989; Gluckman et al., 1997; Han et al., 2003; Kim et al., 2002). Células Primitivas do estroma podem ser isoladas de geleia de Wharton do cordão umbilical e podem ser diferenciadas em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, cardiomiócitos e neurócitos (Baksh et al., 2007; Wu et al., 2009a).

Os canais iônicos são poros constituídos por proteínas integrais presentes nas membranas celulares e representam elementos fundamentais para o funcionamento das células excitáveis, tais como: neurônios, miócitos e células secretoras (Catterall et al., 2005). Estes poros são de grande importância, pois auxiliam no transporte rápido e seletivo de íons através da membrana celular, portanto estão relacionados a diversas funções fisiológicas. (Terlau & Stuhmer, 1998).

O potencial terapêutico das células-tronco e as perspectivas de uma medicina regenerativa são altamente promissores. A caracterização cada vez mais detalhada de novos tipos de células tronco/progenitoras em tecidos adultos e a exploração de fontes alternativas destas células, como o sangue de cordão umbilical, traz consigo muitos avanços. Neste trabalho caracterizamos os canais iônicos das células tronco da geléia de Warthon do cordão umbilical humano (whMSC). Não se sabe a significância das mudanças no funcionamento dos canais iônicos na diferenciação ou proliferação destas células, o que limita as aplicações terapêuticas. Por isso, desvendar seus mecanismos moleculares e principalmente caracterizar os canais iônicos participantes pode fornecer informações importantes sobre a regulação da proliferação e diferenciação celular, possibilitando a utilização da modulação dos canais iônicos no controle destes fenômenos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento das células-tronco mesenquimais da geléia de Wharton do cordão umbilical humano (gW-CUH).

As células-tronco foram isoladas de cordão umbilical humano e imunofenotipadas de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE).

Para se obter as células do estroma de cordão umbilical, coletamos o cordão durante o parto. Este foi então depositado em solução fisiológica estéril mantida a 4° C (0.14 M de NaCl, 0.004 M de KCl, 0.001 M de tampão fosfato, 200 units/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomicina, 5µg/ml de anfotericina B e 10 mM de glicose, pH 7,4).

No laboratório, o cordão foi cortado em pedaços de 10 cm e lavado com uma solução estéril fisiológica. Em seguida adicionou-se uma solução enzimática. Depois disso os pedaços do tecido foram homogeneizados para liberar as células. As células foram isoladas dos tecidos por ação enzimática, sendo o intervalo entre a coleta do tecido e o seu processamento de até 3 horas.

A concentração das células foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer. O número de células viáveis foi determinado pela técnica de exclusão de células não viáveis coradas pelo azul de trypan. As células foram semeadas em garrafas de cultura de 25 ou 75cm³ com meios (α-MEM, DMEM, 199) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos penicilina e estreptomicina na concentração de 2,5 U/ml. As garrafas foram mantidas na estufa de CO₂ e a expansão das células foi monitorada diariamente. As células-tronco foram isoladas por seleção positiva com nanopartículas magnéticas com Kit Easy Sep de acordo com o fabricante (Stem Cell Technologies).

Medições eletrofisiológicas

As células cultivadas em placas de petri foram tratadas com tripsina-EDTA para removê-las do fundo da placa, logo após, inativou a tripsina usando meio de cultura (DMEM) contendo 10% soro fetal bovino (SFB) na proporção de 2:1 (DMEM:SFB), as células foram centrifugadas e ressuspendidas em meio DMEM. Aproximadamente 100 µL do meio, contendo células, foi adicionada em uma câmara de registro, contendo uma solução de perfusão, montada na platina de um microscópio invertido (Nikon TMS). O microscópio situava-se em uma mesa flutuante (air-table, Tecnical Manufacturing Corporation; MA, USA) contida em uma gaiola de Faraday. A

câmara tem um volume aproximado de 0,5 ml e foi perfundida, continuamente, usando-se um sistema de fluxo convencional baseado na gravidade (1 mL/ min) e removida por um aspirador ajustável à vácuo. As trocas de soluções foram feitas com válvulas manuais conectadas a mangueiras de condução próximas à câmara de registro. As correntes iônicas através da membrana celular foram registradas, como descrito por (Hamill ET AL.,1981), usando um amplificador de patch (List EPC8 – HEKA Eletronic). A aquisição dos dados foi feita por uma placa conversora A/D ITC- 18 com PatchMaster with Software Lock-In Amplifier (ambos de HEKA). O contato da ponta da micropipeta com as células foi realizado com a ajuda de um micromanipulador (MX3-Narishige). As micropipetas de patch foram confeccionadas com capilares borosilicado usando-se um puxador (Micropuller PP-830, Narishige). Foram usadas somente as micropipetas com resistência entre 2 e 5 MΩ. Na (Figura 13) ilustramos os equipamento básicos para realização dos experimentos citados anteriormente. Nos registros das correntes iônicas usamos uma taxa de amostragem de 5 kHz e aplicaremos um filtro passa baixa (Bessel) de 1kHz. Todos os experimentos foram executados na temperatura ambiente (22 a 26 °C). Os dados foram organizados como médias $\pm$ D.P. As diferenças foram consideradas significativas no nível de 0.05. Os experimentos foram realizados em modo “Whole-cell” Solução de perfusão (Ringer) (em mM):130NaCl, 2,8KCl, 2CaCl₂, 2MgCl₂,10 Hepes18,4 Manitol. pH 7,4 ajustado com NaOH. Solução da micropipeta (em mM):127 K-aspartato, 16KCl, 1MgCl₂, 2ATP-Na₂, 1EGTA, 20 Hepes. pH 7,2 ajustado com KOH ou KCl.

RESULTADOS

Famílias de correntes de canais iônicos

Nas células tronco mesenquimais de cordão umbilical humano de geléia de wharton isoladas e cultivadas, observamos na figura 1 (A e B) dois ensaios onde as correntes iônicas ativadas por pulsos de voltagens mostraram um componente de rápida ativação com oscilações de ruído em potenciais entre 30 a 60mV similar a correntes de potássio ativado por cálcio ($I_{K_{Ca}}$) e um componente que tem corrente de ativação lenta (B) em potenciais entre 20 a 60mV similar a corrente de potássio de retificação tardia ($I_{K_{DR}}$). Encontramos também em (A) outro tipo de corrente chamada de corrente de saída transitória (I_{to}) que apresenta uma ativação rápida acompanhado de inativação similar com I_{to} observada em células cardíacas e neuronais. Tanto I_{to} como $I_{K_{DR}}$ co-existiram com $I_{K_{Ca}}$.

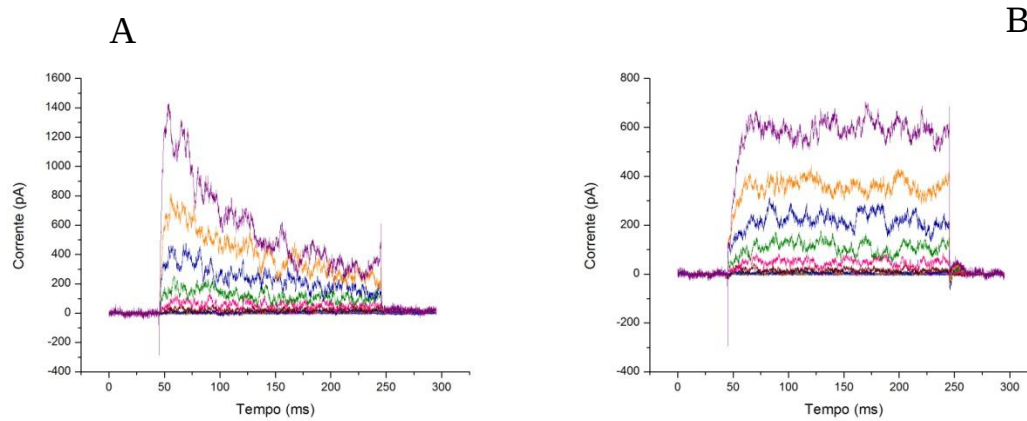


Figura 12: Diferentes padrões de correntes de membrana registradas em MSCs-CUH de geléia de Wharton. A- correntes de saída de ativação rápida apresentando redução de amplitude durante o pulso de voltagem, B – correntes de ativação lenta dependentes de voltagem.

A (figura 2) ilustra correntes de saída de membrana obtidas por intervalos de voltagem de 300 ms entre -60 e +60 mV de um potencial aplicado inicialmente de -40 mV. A figura (2-A) mostra traços de correntes registradas em condições controle na qual observamos uma corrente de saída ativada rapidamente com oscilação de ruído entre +30 e +60mV, semelhante a corrente de potássio ativado por cálcio (I_{KCa}), após aplicação de 10 mM de tetraetilamonio – TEA (2-B), um inibidor não específico de canais de potássio, observamos uma expressiva redução dessas correntes que retornou a valores aproximados de sua intensidade inicial após retirada do inibidor com lavagem de fluxo contínuo durante 5 min (2-C). em solução ringer isotônica. Em (2-D) temos a relação entre corrente e voltagem dos registros obtidos durante a aplicação dos diferentes pulsos de voltagem indicando as retificações de correntes de saída a partir de -10 até +60 mV. Comparando os registros controle (2-A) com aqueles após aplicação do TEA (2-B) nota-se uma progressiva redução do valor da intensidade da corrente de potássio, essa redução se inicia em voltagens despolarizantes a partir de +20 mV.

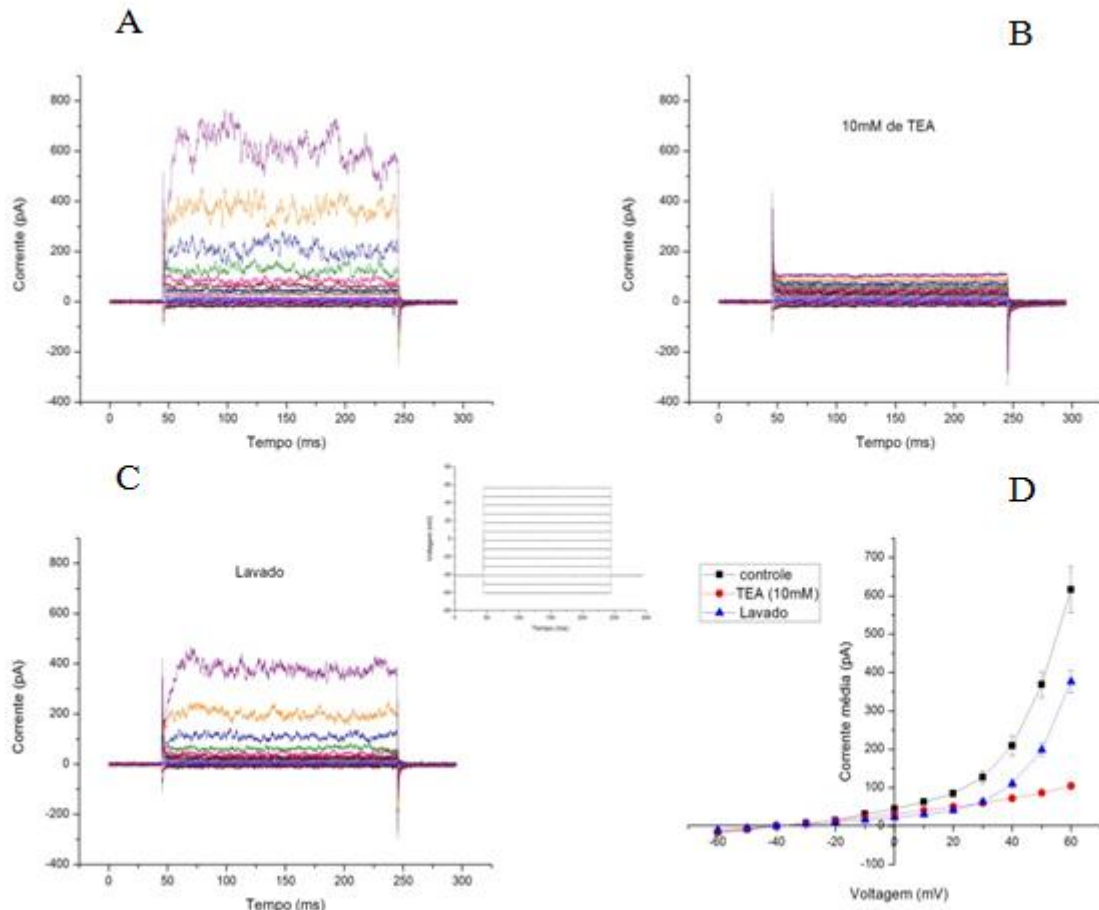


Figura 2: Correntes de potássio sensível ao inibidor Tetraetilamônio (TEA) em células tronco de cordão umbilical humano. Correntes de membrana foram registradas com intervalos de voltagem de 300-ms como apresentado dentro da figura: A - na ausência (controle), B - na presença de 10mM de TEA e C - após retirada do TEA (lavado) com solução ringer isotônica, D - Relação corrente x voltagem de correntes de potássio no controle, com TEA e lavado.

A (figura 3) apresenta o percentual médio de bloqueio do TEA em células tronco mesenquimais de cordão umbilical correspondendo aos pulsos de voltagens de 10 mV a 60 mV onde observamos expressiva redução de correntes de potássio sensíveis ao TEA em todas as voltagens registradas acima de 10 mV. Ao testarmos esta diferença com o teste T de Student pareado e bicaudal verificamos que ela era significativa ($p < 0,05$) para todas as voltagens registradas. Também observa-se na figura 3 que a inibição pelo TEA tem uma expressiva dependência de voltagem.

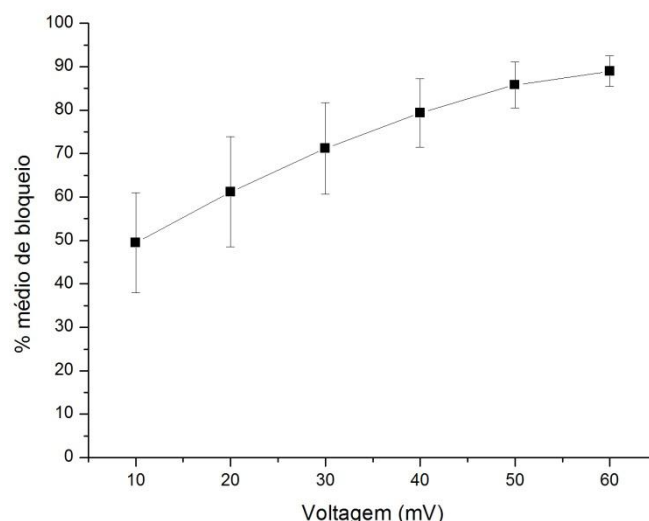


Figura 3: Percentual médio da ação do inibidor tetraetilamonio sobre as correntes de potássio relacionadas aos pulsos de voltagens entre 10mV e 60mV ($n=3$). Aproximadamente 80% ($\pm 13\%$) das correntes de potássio sensíveis ao TEA foram inibidos em +40mV.

Correntes de saída transitória (I_{to}) foram detectadas juntamente com IK_{Ca} em hMSCs. A (figura 4) mostra traços de I_{to} registrados sob condições controle (4-A) e após a aplicação 5mM do inibidor 4-aminopiridina - 4-AP (4-B). I_{to} foi inibida consideravelmente, enquanto IK_{Ca} foi levemente suprimido por 4-AP. A inibição de I_{to} foi reversível quando foi exposto novamente as condições do controle (4-C) sendo comprovado ao observarmos a figura (4-D) que relaciona corrente e voltagem dos registros obtidos.

A (figura 5) apresenta o percentual médio de bloqueio do 4-AP em células tronco mesenquimais de cordão umbilical correspondendo ao pulso de voltagem de 10 a 60 mV onde observamos expressiva redução de correntes de potássio sensíveis ao 4-AP que em 40 mV corresponde a aproximadamente 57% ($\pm 12\%$) de bloqueio uma amostra de três células. Apesar disto ao fazermos o teste T observamos que esta diferença não era significativa ($p>0,15$ para 60 mV e $p>0,2$ para as outras voltagens). Isto observou-se porque houve uma grande variância das correntes de resposta nos experimentos controle. Provavelmente isto poderá ser melhorado com a execução de mais experimentos.

Os experimentos com o inibidor glibenclamida (GB) utilizado para identificar correntes de potássio ativados por ATP (IK_{ATP}) mostraram resultados diferentes do esperado, pois os traços de correntes registradas em condições controle figura (6-A) são de amplitudes menores que as observadas após a aplicação do GB (6-B) caracterizando-o como um ativador de correntes de saída. Após a remoção do GB (6-C), as correntes retornaram ao perfil expresso no controle confirmado a

ação reversível do GB em MSC-CUHs. O gráfico (6-D) mostra claramente a ação ativadora do Gb através do aumento da intensidade das correntes de saída.

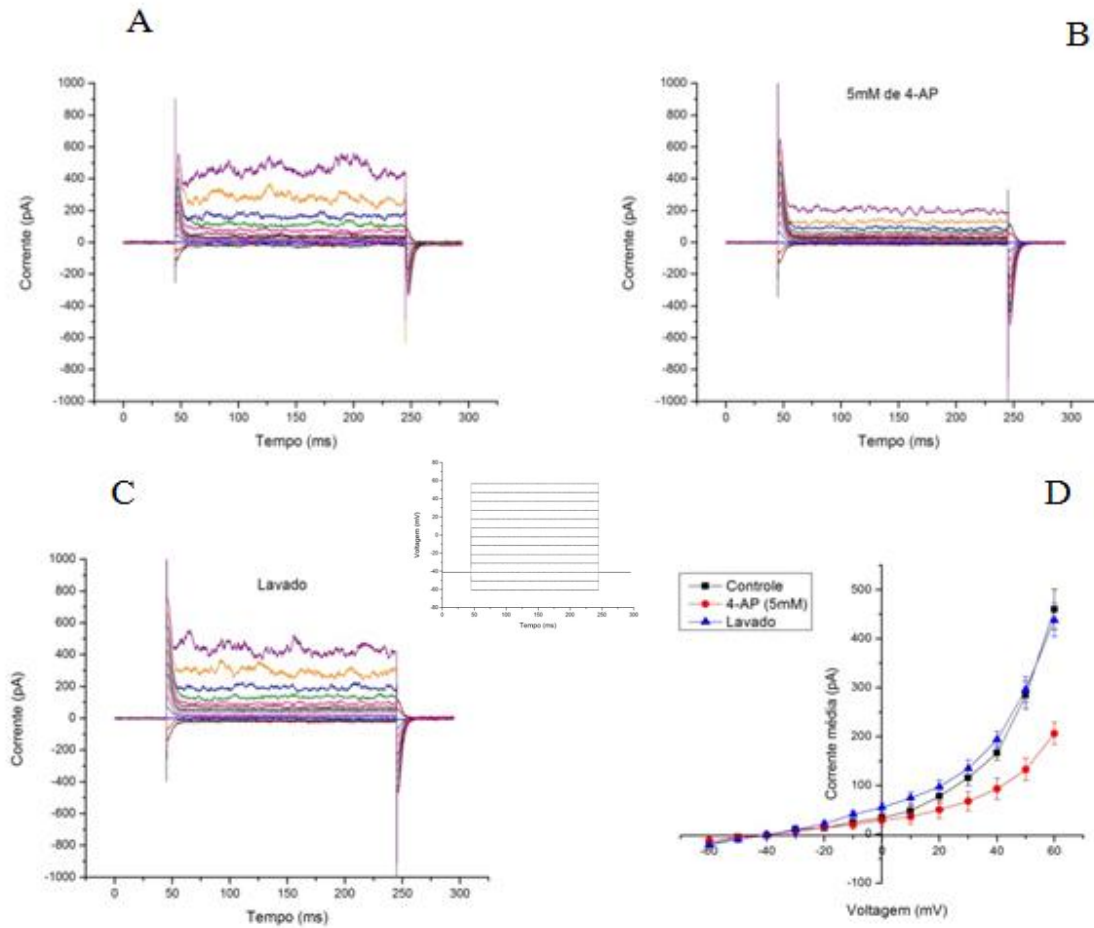


Figura 4: Correntes de potássio sensível ao inibidor 4-Aminopiridina (4-AP) em células tronco de cordão umbilical humano. Correntes de membrana foram registradas com intervalos de voltagem de 300-ms como apresentado dentro da figura: A - na ausência do 4-AP (controle), B - na presença de 5mM do 4-AP, C - após retirada do 4-AP (lavado) com solução ringer isotônica, D - Relação corrente x voltagem de correntes de potássio no controle, com 4-AP e lavado.

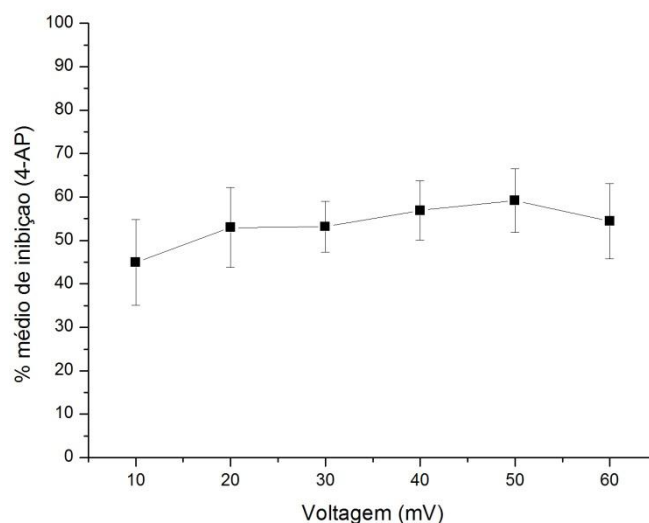


Figura 5: Percentual da ação do inibidor 4 - Aminopiridina sobre as correntes de potássio relacionadas aos pulsos de voltagens entre 10mV e 60mV (n=3). Aproximadamente 57% (+/- 12%) das correntes de potássio sensíveis ao 4-AP foram inibidos em + 40 mV .

Correntes de cloreto foram observadas em MSC – CUH após o uso de 100 μ M do inibidor 5-nitro-2-3- fenilpropilamino (NPPB), um inibidor específico desses tipos de correntes, verificamos que houve uma diminuição considerável das correntes de saída em presença desse inibidor (fig. 7-B) quando comparada com os resultados do experimento controle (fig. 7-A), após lavagem (fig.7-C) observamos a ação reversível do inibidor, pois as correntes de saída comportaram-se semelhantemente as condições de ausência do inibidor. A figura 7-D relaciona a intensidade de corrente x voltagem dos experimentos nas condições: ausência (controle) e presença do NPPB, e após lavado com solução ringer isotônica.

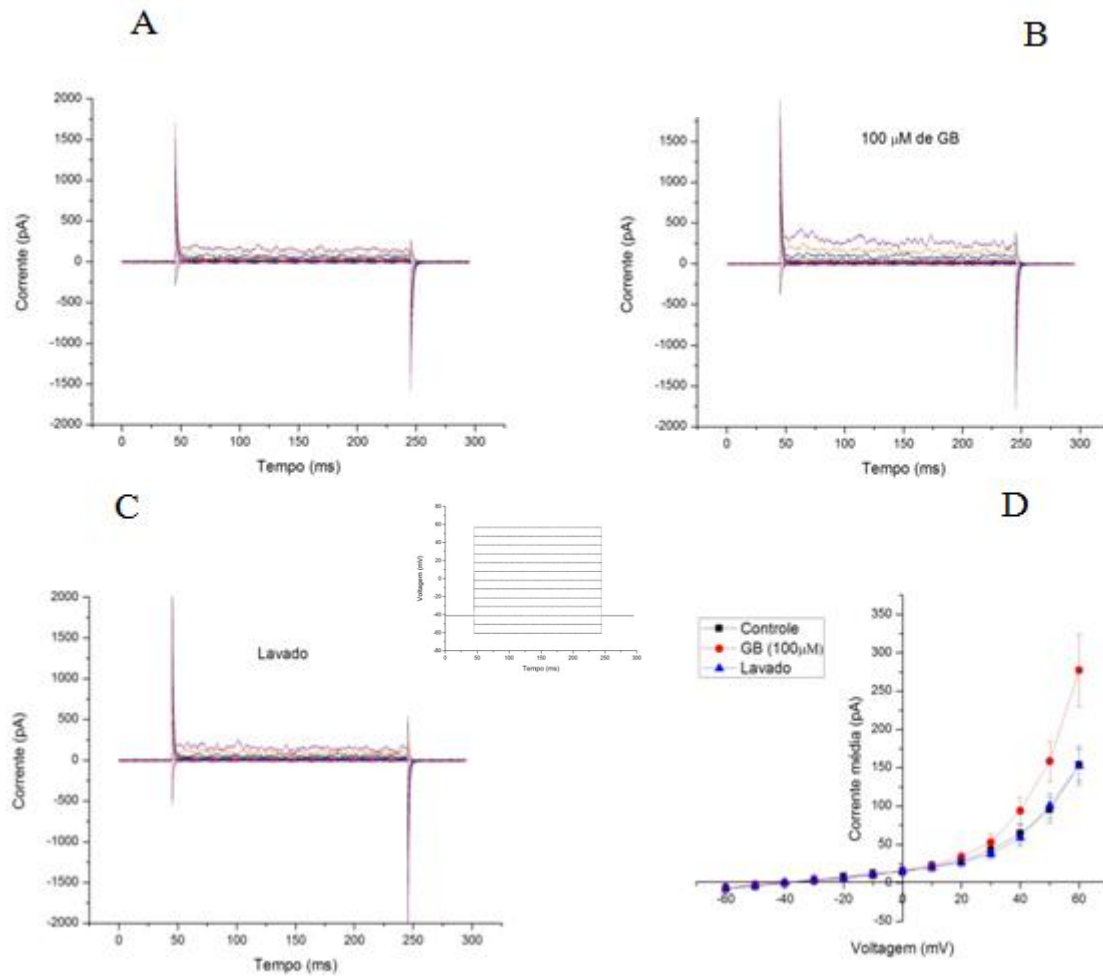


Figura 6: Correntes de potássio sensível ao inibidor Glibenclamida (GB) em células tronco de cordão umbilical humano. Correntes de membrana foram registradas com intervalos de voltagem de 300-ms como apresentado dentro da figura: A - na ausência do GB (controle), B - na presença de 100 μ M do GB, C - após retirada do GB (lavado) com solução ringer isotônica, D - Relação corrente x voltagem de correntes de potássio no controle, com GB e lavado.

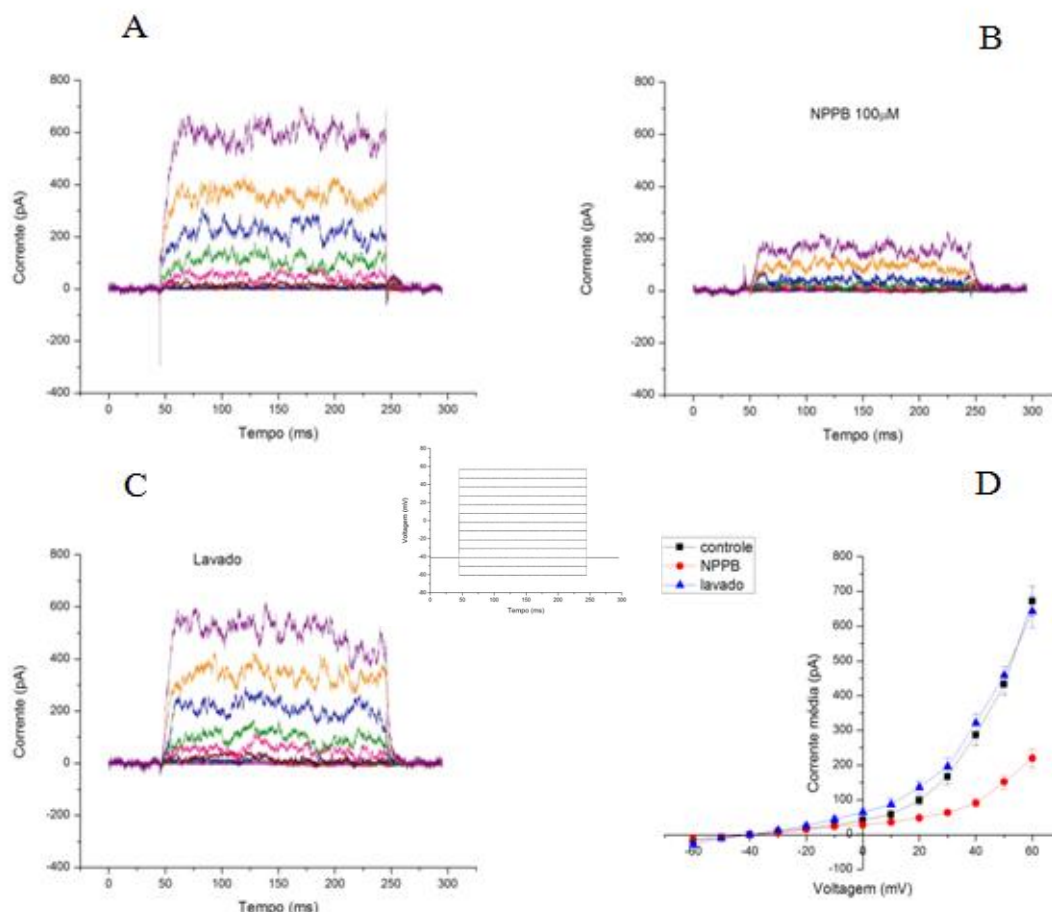


Figura 7: Correntes de cloreto sensível a 100 μ M do inibidor 5-nitro-2-3- fenilpropilamino (NPPB) em células tronco de cordão umbilical humano. Correntes de membrana foram registradas com intervalos de voltagem de 300-ms como apresentado dentro da figura: A - na ausência do NPPB (controle), B - na presença de 100 μ M do NPPB, C - após retirada do NPPB (lavado) com solução ringer isotônica, D - Relação corrente x voltagem de correntes de cloreto no experimento controle, com NPPB e lavado.

DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos que vários canais de K especializados e também canais de cloreto foram encontrados em MSC-CUH de geléia de wharton entre a 2^a-5^a passagem. Todas as correntes registradas nestas células foram de saída e apresentaram uma cinética de ativação e inativação de três tipos diferentes: uma de ativação lenta em pulsos de voltagens entre (-10mV a 20mV), não apresentando inativação semelhante as correntes de retificação tardia ($I_{K_{DR}}$); uma de rápida ativação apresentando picos de correntes iniciais seguidos de inativação semelhantes as correntes de saída transitoria (I_{to}) (40mV a 60mV) e outra de rápida ativação com grandes oscilações de ruídos entre (30mV a 60mV) não sendo inativadas de modo semelhante as correntes de potássio ativada por Calcio ($I_{K_{Ca}}$). Estas foram observadas na maioria das células estudadas.

Os diferentes tipos de cinética de ativação citados anteriormente foram identificados concomitantemente nos registros dos ensaios realizados.

Utilizando moduladores de canais iônicos observamos correntes de potássio que foram inibidas pela ação do TEA ($I_{K_{TEA}}$), um bloqueador não específico de canais de potássio; correntes inibidas pela ação do 4-AP, um bloqueador de I_{TO} ; correntes ativadas pelo GB e correntes que foram inibidas pelo NPPB.

O percentual médio de correntes inibidas pelo TEA aumentou concomitantemente com os pulsos de voltagem. Deste modo, sugerimos que a ação do TEA foi mais significativa nos canais de potássio dependentes de voltagem. Ao relacionarmos o percentual médio de inibição do TEA com o 4-AP inferimos que a inibição de correntes entre 10 e 60mV não apresentou alteração significativa durante o aumento dos pulsos de voltagens.

Correntes inibidas pelo TEA ($I_{K_{TEA}}$)

Está amplamente descrito na literatura que o TEA atua inibindo canais de potássio. Estudos recentes identificaram que correntes sensíveis ao TEA foram observadas em células tronco mesenquimais de veia de cordão umbilical humano (Park et al., 2007a), medula óssea (Li et al., 2005), e células tronco derivada de tecido adiposo (Bai et al., 2007), no entanto o TEA não atua em todos os canais de potássio, como observados nos resultados obtidos por (Park et al., 2007b) o qual mostra que a aplicação desse inibidor não teve efeito sobre I_{TO} .

Correntes inibidas pelo 4-AP

Os resultados observados da cinética de ativação e inativação e da modulação em I_{to} com o inibidor 4-AP em células tronco de cordão umbilical (Park et al., 2007b), células troncos derivadas de tecido adiposo (Bai et al., 2007) e células tronco de medula óssea (Li et al., 2005) mostraram uma clara inibição do pico destas correntes em pulsos de voltagens mais despolarizantes. A figura (1- A)

demonstra traços de correntes típicos de I_{TO} . A modulação obtida pelo 4-AP em nossos experimentos reduziu a amplitude das correntes de saída que apresentou uma cinética de ativação diferente, figura (4-A). Resultados semelhantes ocorreram em células tronco embrionárias de ratos (Wang et al., 2005) e em células tronco mesenquimais de medula óssea de coelho (Deng et al., 2006) indicando uma possível ação do 4-AP em outros tipos de canais iônicos.

Correntes de potássio ativados por cálcio (I_{KCa})

Canais de potássio ativados por cálcio são seletivos ao potássio e ativados pela despolarização da membrana e aumento da $[Ca^{2+}]$ (Toro et al., 1998). Os traços de correntes que surgem em pulsos de voltagem entre 30mv a 60mv com oscilações de ruídos intensos em nossos ensaios sugerem que correntes de potássio ativadas por cálcio (I_{KCa}) estão presentes nas células estudadas. A ação de moduladores clássicos como a iberiotoxina, um inibidor de I_{KCa} foi observado em diferentes células tronco (Bai et al., 2007; Li et al., 2005; Wang et al., 2005) identificando I_{KCa} e o perfil de traços de correntes semelhantes ao obtido em nossos experimentos.

Correntes ativadas por GB

Sulfonureias, como a glibenclamida, tem sido usada para tratar de diabetes mellitus não dependente de insulina (tipo II). Estas drogas aumentam a liberação de insulina das células β pancreáticas via inibição da atividade de canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) na membrana plasmática (Ashcroft & Gribble, 2000). Nas MSCs-CUH de geléia de Wharton observamos que ao ser aplicado o GB houve um aumento na amplitude das correntes de saída, sugerindo que esse modulador teve uma ação contrária da esperada ou pode ter ativado outras correntes de canais iônicos presentes na membrana da célula. A alteração na amplitude das correntes teve ação reversível quando retirado o modulador GB da solução a qual as células estavam inseridas. Este resultado pode ser considerado inédito, pois não há até o presente momento relatos na literatura sobre o uso do GB como ativador de canais iônicos em células tronco.

Correntes inibidas pelo NPPB

Observamos em um ensaio que as correntes de saída foram inibidas pelo modulador NPPB que atua inibindo diferentes canais de cloreto e também bloqueiam correntes de potássio ativado por cálcio de condutância intermediária (I_{KCa}) em linhagens celulares HL-60 e GL-15, a corrente foi bloqueada por NPPB de maneira reversível (Fioretti et al., 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG CM. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol* **58**, 413-437 (1971).
- ARMSTRONG CM. Ionic pores, gates, and gating currents. *Q Rev Biophys* **7**, 179-210 (1974a).
- ARMSTRONG CM. Ionic pores, gates, and gating currents. *Q Rev Biophys* **7**, 179-210 (1974b).
- ARMSTRONG CM & BINSTOCK L. ANOMALOUS RECTIFICATION IN THE SQUID GIANT AXON INJECTED WITH TETRAETHYLAMMONIUM CHLORIDE. *J Gen Physiol* **48**, 859-872 (1965).
- ARMSTRONG CM & Hille B. The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier. *J Gen Physiol* **59**, 388-400 (1972).
- Ashcroft FM & Gribble FM. New windows on the mechanism of action of K(ATP) channel openers. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 439-445 (2000).
- Babenko AP, Gonzalez G, & Bryan J. The tolbutamide site of SUR1 and a mechanism for its functional coupling to K(ATP) channel closure. *FEBS Lett* **459**, 367-376 (1999).
- Bai X, Ma J, Pan Z, Song YH, Freyberg S, Yan Y, Vykoukal D, & Alt E. Electrophysiological properties of human adipose tissue-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1539-C1550 (2007).
- Baksh D, Yao R, & Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* **25**, 1384-1392 (2007).
- Barg S, Eliasson L, Renstrom E, & Rorsman P. A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes* **51**, S74-S82 (2002).
- Bhattacharjee A & Kaczmarek LK. For K⁺ channels, Na⁺ is the new Ca²⁺. *Trends Neurosci* **28**, 422-428 (2005).
- Bichet D, Haass FA, & Jan LY. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat Rev Neurosci* **4**, 957-967 (2003).

Bond CT, Maylie J, & Adelman JP. Small-conductance calcium-activated potassium channels. *Ann N Y Acad Sci* **868**, 370-378 (1999).

Bond CT, Maylie J, & Adelman JP. SK channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 305-311 (2005).

Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, & Boyse EA. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3828-3832 (1989).

Brugnara C, Armsby CC, Sakamoto M, Rifai N, Alper SL, & Platt O. Oral administration of clotrimazole and blockade of human erythrocyte Ca^{++} -activated K^{+} channel: the imidazole ring is not required for inhibitory activity. *J Pharmacol Exp Ther* **273**, 266-272 (1995).

Brugnara C, De FL, & Alper SL. Inhibition of Ca^{2+} -dependent K^{+} transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest* **92**, 520-526 (1993).

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, & Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* **98**, 2396-2402 (2001).

Can A & Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* **25**, 2886-2895 (2007).

Candia S, Garcia ML, & Latorre R. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Biophys J* **63**, 583-590 (1992).

Caplan AI & Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* **7**, 259-264 (2001).

Catterall WA, Cestele S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, & Scheuer T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* **49**, 124-141 (2007).

Catterall WA, Goldin AL, & Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 397-409 (2005).

Chen TY & Hwang TC. CLC-0 and CFTR: Chloride channels evolved from transporters. *Physiological Reviews* **88**, 351-387 (2008).

Coupry I, Armsby CC, Alper SL, Brugnara C, & Parini A. Clotrimazole and efaroxan inhibit red cell Gardos channel independently of imidazoline I1 and I2 binding sites. *Eur J Pharmacol* **295**, 109-112 (1996).

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, & Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* **14**, 1115-1122 (1999).

De FL, Rouyer-Fessard P, Alper SL, Jouault H, Brugnara C, & Beuzard Y. Combination therapy of erythropoietin, hydroxyurea, and clotrimazole in a beta thalassemic mouse: a model for human therapy. *Blood* **87**, 1188-1195 (1996).

Deans RJ & Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* **28**, 875-884 (2000).

Deng XL, Sun HY, Lau CP, & Li GR. Properties of ion channels in rabbit mesenchymal stem cells from bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 301-309 (2006).

Devor DC, Singh AK, Gerlach AC, Frizzell RA, & Bridges RJ. Inhibition of intestinal Cl⁻ secretion by clotrimazole: direct effect on basolateral membrane K⁺ channels. *Am J Physiol* **273**, C531-C540 (1997).

Doyle ME & Egan JM. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev* **55**, 105-131 (2003).

Dutzler R. The CIC family of chloride channels and transporters. *Current Opinion in Structural Biology* **16**, 439-446 (2006).

Edwards G & Weston AH. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **33**, 597-637 (1993).

Edwards G, Zygmunt PM, Hogestatt ED, & Weston AH. Effects of cytochrome P450 inhibitors on potassium currents and mechanical activity in rat portal vein. *Br J Pharmacol* **119**, 691-701 (1996).

Erices A, Conget P, & Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* **109**, 235-242 (2000).

Feletou M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol* **156**, 545-562 (2009).

Fioretti B, Castigli E, Calzuola I, Harper AA, Franciolini F, & Catacuzzeno L. NPPB block of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Eur J Pharmacol* **497**, 1-6 (2004).

French RJ & Shoukimas JJ. Blockage of squid axon potassium conductance by internal tetra-N-alkylammonium ions of various sizes. *Biophys J* **34**, 271-291 (1981).

Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, & Chandy KG. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* **275**, 37137-37149 (2000).

Giangiacomo KM, Garcia ML, & McManus OB. Mechanism of iberitoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* **31**, 6719-6727 (1992).

Gillespie JI & Hutter OF. Proceedings: The actions of 4-aminopyridine on the delayed potassium current in skeletal muscle fibres. *J Physiol* **252**, 70P-71P (1975).

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, & .. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* **321**, 1174-1178 (1989).

Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, & Chastang C. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* **337**, 373-381 (1997).

Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, & Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **28**, 365-368 (2000).

Greschat S, Schira J, Kury P, Rosenbaum C, de Souza Silva MA, Kogler G, Wernet P, & Muller HW. Unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood can be differentiated into neurons with a dopaminergic phenotype. *Stem Cells Dev* **17**, 221-232 (2008).

Gribble FM & Reimann F. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia* **46**, 875-891 (2003).

Gribble FM, Tucker SJ, & Ashcroft FM. The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K^{+} channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol* **504** (Pt 1), 35-45 (1997).

Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, & Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* **116**, 1827-1835 (2003).

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, & Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 473-508 (2005a).

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, & Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 473-508 (2005b).

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, & Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100 (1981).

Han IS, Ra JS, Kim MW, Lee EA, Jun HY, Park SK, & Kwon BS. Differentiation of CD34+ cells from human cord blood and murine bone marrow is suppressed by C6 beta-chemokines. *Mol Cells* **15**, 176-180 (2003).

Herzog EL, Chai L, & Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* **102**, 3483-3493 (2003).

Heubach JF, Graf EM, Leutheuser J, Bock M, Balana B, Zahanich I, Christ T, Boxberger S, Wettwer E, & Ravens U. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J Physiol* **554**, 659-672 (2004).

Hille B & Schwarz W. Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J Gen Physiol* **72**, 409-442 (1978).

Hisadome K, Koyama T, Kimura C, Droogmans G, Ito Y, & Oike M. Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J Gen Physiol* **119**, 511-520 (2002).

Hodgkin AL, Huxley AF, & KATZ B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* **116**, 424-448 (1952).

Hogg RC, Wang Q, & Large WA. Action of niflumic acid on evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br J Pharmacol* **112**, 977-984 (1994a).

Hogg RC, Wang Q, & Large WA. Effects of Cl channel blockers on Ca-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br J Pharmacol* **111**, 1333-1341 (1994b).

in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, & Fibbe WE. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* **88**, 845-852 (2003).

Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, & Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* **82**, 503-568 (2002a).

Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, & Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological Reviews* **82**, 503-568 (2002b).

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, & Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-49 (2002).

Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, & McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* **46**, 3349-3360 (2002).

Khan RN, Matharoo-Ball B, Arulkumaran S, & Ashford ML. Potassium channels in the human myometrium. *Exp Physiol* **86**, 255-264 (2001).

Kim SK, Koh SK, Song SU, Shin SH, Choi GS, Kim WC, Lee MH, Seoh JY, Park SK, & Fraser JK. Ex vivo expansion and clonality of CD34⁺ selected cells from bone marrow and cord blood in a serum-free media. *Mol Cells* **14**, 367-373 (2002).

Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, & Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* **200**, 123-135 (2004).

Kogler G, Sensken S, & Wernet P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Exp Hematol* **34**, 1589-1595 (2006).

Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, & Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature

and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 509-526 (2005).

Kutluay E, Roux B, & Heginbotham L. Rapid intracellular TEA block of the KcsA potassium channel. *Biophys J* **88**, 1018-1029 (2005).

Lazdunski M, Fosset M, Hughes M, Mourre C, Romey G, & Schmid-Antomarchi H. The apamin-sensitive Ca^{2+} -dependent K^{+} channel molecular properties, differentiation and endogenous ligands in mammalian brain. *Biochem Soc Symp* **50**, 31-42 (1985).

Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, & Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* **21**, 69-78 (2006).

Levitan I, Fang Y, Rosenhouse-Dantsker A, & Romanenko V. Cholesterol and ion channels. *Subcell Biochem* **51**, 509-549 (2010).

Li GR, Sun H, Deng X, & Lau CP. Characterization of ionic currents in human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells* **23**, 371-382 (2005).

Li M, McCann JD, & Welsh MJ. Apical membrane Cl^{-} channels in airway epithelia: anion selectivity and effect of an inhibitor. *Am J Physiol* **259**, C295-C301 (1990).

Liu Y, Holmgren M, Jurman ME, & Yellen G. Gated access to the pore of a voltage-dependent K^{+} channel. *Neuron* **19**, 175-184 (1997).

Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, Gleneck K, Shihabuddin L, & Tubo R. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng* **8**, 739-751 (2002).

Logsdon NJ, Kang J, Togo JA, Christian EP, & Aiyar J. A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem* **272**, 32723-32726 (1997).

Lopatin AN & Nichols CG. $[\text{K}^{+}]$ dependence of polyamine-induced rectification in inward rectifier potassium channels (IRK1, Kir2.1). *J Gen Physiol* **108**, 105-113 (1996).

Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, & Han ZC. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* **91**, 1017-1026 (2006).

Meves H & Pichon Y. Proceedings: Effects of 4-aminopyridine on the potassium current in internally perfused giant axons of the squid. *J Physiol* **251**, 60P-62P (1975).

Muraglia A, Cancedda R, & Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* **113** (Pt 7), 1161-1166 (2000).

Neher E & Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802 (1976).

Neher E & Sakmann B. The patch clamp technique. *Sci Am* **266**, 44-51 (1992).

Neher E, Sakmann B, & Steinbach JH. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch* **375**, 219-228 (1978).

Nichols CG & Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* **59**, 171-191 (1997).

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, & Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-705 (2001).

Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA, Jr., Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, Rocha V, Covas DT, & Zago MA. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **22**, 1263-1278 (2004).

Park KS, Jung KH, Kim SH, Kim KS, Choi MR, Kim Y, & Chai YG. Functional expression of ion channels in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord vein. *Stem Cells* **25**, 2044-2052 (2007a).

Park KS, Jung KH, Kim SH, Kim KS, Choi MR, Kim Y, & Chai YG. Functional expression of ion channels in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord vein. *Stem Cells* **25**, 2044-2052 (2007b).

Patlak M. New weapons to combat an ancient disease: treating diabetes. *FASEB J* **16**, 1853 (2002).

Perry MD & Sandle GI. Regulation of colonic apical potassium (BK) channels by cAMP and somatostatin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **297**, G159-G167 (2009).

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, & Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999a).

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, & Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999b).

Pittenger MF & Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* **95**, 9-20 (2004).

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, & Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* **109**, 337-346 (2002).

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, & Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **98**, 2615-2625 (2001).

Rittenhouse AR, Parker C, Brugnara C, Morgan KG, & Alper SL. Inhibition of maxi-K currents in ferret portal vein smooth muscle cells by the antifungal clotrimazole. *Am J Physiol* **273**, C45-C56 (1997a).

Rittenhouse AR, Vandorpe DH, Brugnara C, & Alper SL. The antifungal imidazole clotrimazole and its major in vivo metabolite are potent blockers of the calcium-activated potassium channel in murine erythroleukemia cells. *J Membr Biol* **157**, 177-191 (1997b).

Romanenko VG, Nakamoto T, Srivastava A, Begenisich T, & Melvin JE. Regulation of membrane potential and fluid secretion by Ca^{2+} -activated K^{+} channels in mouse submandibular glands. *J Physiol* **581**, 801-817 (2007).

Rufo PA, Merlin D, Riegler M, Ferguson-Maltzman MH, Dickinson BL, Brugnara C, Alper SL, & Lencer WI. The antifungal antibiotic, clotrimazole, inhibits chloride secretion by human intestinal T84 cells via blockade of distinct basolateral K^{+} conductances. Demonstration of efficacy in intact rabbit colon and in an in vivo mouse model of cholera. *J Clin Invest* **100**, 3111-3120 (1997).

Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, & Wei A. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci* **7**, 921-931 (2006).

Santi CM, Butler A, Kuhn J, Wei A, & Salkoff L. Bovine and mouse SLO3 K^{+} channels: evolutionary divergence points to an RCK1 region of critical function. *J Biol Chem* **284**, 21589-21598 (2009).

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, & Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* **23**, 220-229 (2005).

Sauer H, Hescheler J, & Wartenberg M. Mechanical strain-induced Ca^{2+} waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C295-C307 (2000).

Sensken S, Waclawczyk S, Knaupp AS, Trapp T, Enczmann J, Wernet P, & Kogler G. In vitro differentiation of human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells towards an endodermal pathway. *Cytotherapy* **9**, 362-378 (2007).

Singh AK, Afink GB, Venglarik CJ, Wang RP, & Bridges RJ. Colonic Cl channel blockade by three classes of compounds. *Am J Physiol* **261**, C51-C63 (1991).

Spasova M & Lu Z. Coupled ion movement underlies rectification in an inward-rectifier K^+ channel. *J Gen Physiol* **112**, 211-221 (1998).

Spasova M & Lu Z. Tuning the voltage dependence of tetraethylammonium block with permeant ions in an inward-rectifier K^+ channel. *J Gen Physiol* **114**, 415-426 (1999).

Sprossmann F, Pankert P, Sausbier U, Wirth A, Zhou XB, Madlung J, Zhao H, Bucurenciu I, Jakob A, Lamkemeyer T, Neuhuber W, Offermanns S, Shipston MJ, Korth M, Nordheim A, Ruth P, & Sausbier M). Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder. *FEBS J* **276**, 1680-1697 (2009).

Stanfield PR. Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **97**, 1-67 (1983).

Sussman M. Cardiovascular biology. Hearts and bones. *Nature* **410**, 640-641 (2001).

Tao R, Lau CP, Tse HF, & Li GR. Functional ion channels in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1561-C1567 (2007).

Terlau H & Stuhmer W. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften* **85**, 437-444 (1998).

Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, & Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* **32**, 11-16 (2000).

Thompson J & Begenisich T. Interaction between quaternary ammonium ions in the pore of potassium channels. Evidence against an electrostatic repulsion mechanism. *J Gen Physiol* **115**, 769-782 (2000).

Thompson J & Begenisich T. Affinity and location of an internal K^+ ion binding site in shaker K channels. *J Gen Physiol* **117**, 373-384 (2001).

Thompson J & Begenisich T. External TEA block of shaker K⁺ channels is coupled to the movement of K⁺ ions within the selectivity filter. *J Gen Physiol* **122**, 239-246 (2003).

Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, & Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* **100**, 11247-11256 (1999).

Toro L, Wallner M, Meera P, & Tanaka Y. Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News Physiol Sci* **13**, 112-117 (1998).

Troyer DL & Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* **26**, 591-599 (2008).

Ulbricht W & Wagner HH. Block of potassium channels of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal on depolarization. *Pflugers Arch* **367**, 77-87 (1976).

Venglarik CJ, Singh AK, & Bridges RJ. Comparison of -nitro versus -amino 4,4'-substituents of disulfonic stilbenes as chloride channel blockers. *Mol Cell Biochem* **140**, 137-146 (1994).

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, & Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* **33**, 1402-1416 (2005).

Wang K, Xue T, Tsang SY, Van HR, Wong CW, Lai KW, Ye Z, Cheng L, Au KW, Zhang J, Li GR, Lau CP, Tse HF, & Li RA. Electrophysiological properties of pluripotent human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**, 1526-1534 (2005).

Wangemann P, Wittner M, Di SA, Englert HC, Lang HJ, Schlatter E, & Greger R. Cl⁻-channel blockers in the thick ascending limb of the loop of Henle. Structure activity relationship. *Pflugers Arch* **407 Suppl 2**, S128-S141 (1986).

Welker S & Drews G. Imidazole antimycotics affect the activity of various ion channels and insulin secretion in mouse pancreatic B-cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **356**, 543-550 (1997).

Wu KH, Zhou B, Lu SH, Feng B, Yang SG, Du WT, Gu DS, Han ZC, & Liu YL. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem* **100**, 608-616 (2007).

Wu LF, Wang NN, Liu YS, & Wei X. Differentiation of Wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* **15**, 2865-2873 (2009a).

Wu LF, Wang NN, Liu YS, & Wei X. Differentiation of Wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* **15**, 2865-2873 (2009b).

Wulff H, Castle NA, & Pardo LA. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 982-1001 (2009).

Yeh JZ, Oxford GS, Wu CH, & Narahashi T. Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. *Biophys J* **16**, 77-81 (1976).

Yu FH & Catterall WA. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* **2004**, re15 (2004).

ZAGO M.A., COVAS D.T. Células-Tronco, a Nova Fronteira da Medicina. Editora ATHENEU 1º reimpressão, 1º edição, (2007).

7 CONCLUSÕES

- As células troncos mesenquimais de cordão umbilical humano entre a 2ª e a 5ª passagem apresentaram correntes semelhantes a $I_{K_{Ca}}$ bloqueados por 10mM de TEA (80% a 40 mV);
- As células apresentaram uma corrente de K semelhante a I_{to} inibida por 5mM de 4-AP (57% a 40 mV);
- Parte das células apresentaram uma corrente ativada pela glibenclamida 100µM que precisar ser melhor caracterizada com outros protocolos experimentais;
- Uma das células apresentou corrente inibida pelo NPPB 100µM;
- Nestas células tivemos uma diversidade de corrente que precisa ser bem caracterizada por novos protocolos experimentais.