

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

GISELY JULIANE BARBOSA DE ALBERTIM

**ESTUDO DOS CANAIS IÔNICOS NO PROCESSO DE PROLIFERAÇÃO E
REGULAÇÃO DO VOLUME EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
HUMANAS**

Recife

2016

GISELY JULIANE BARBOSA DE ALBERTIM

**ESTUDO DOS CANAIS IÔNICOS NO PROCESSO DE PROLIFERAÇÃO E
REGULAÇÃO DO VOLUME EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
HUMANAS**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do título de
Doutora em Inovação Terapêutica.**

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues

Co-orientadora: Prof^a Dra Márcia Bezerra da Silva

Recife

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Albertim, Gisely Juliane Barbosa

Estudos dos canais iônicos no processo de proliferação e regulação do volume em células-tronco mesenquimais humanas/ Gisely Juliane Barbosa Albertim. – Recife: O Autor, 2016.

164 f.: il.

Orientadores: Cláudio Gabriel Rodrigues, Márcia Bezerra da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências e apêndices

I. Canais iônicos 2. Células-tronco I. Rodrigues, Cláudio Gabriel (orient.) II. Silva, Márcia Bezerra da (coorient.) III. Título.

572.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-163

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof^a Dra Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Prof^a. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Prof^a. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof^a. Dra. Máira Galdino da Rocha Pitta

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Albertim, Gisely Juliane Barbosa de

Título: Estudo dos canais iônicos no processo de proliferação e regulação do volume em células-tronco mesenquimais humanas.

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 29/07/2016

Banca Examinadora

Prof^a. **Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão**

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof^a. **Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão**

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof^a. **Dra Márcia Bezerra da Silva**

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. **Dr. Reginaldo Pereira da Silva**

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. **Dr. Thiago de Salazar e Fernandes**

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Assinatura: _____

Dedico este trabalho a base de minha vida: minha família,
em especial a minha amada filha **Maria Isabelly** por todo
ensinamento de amor incondicional, incentivo e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, o maior. Agradeço pelo dom da vida, por me guiar, iluminar e fortalecer e me dar forças para seguir em frente com meus objetivos.

A toda minha família, por fazer parte do alicerce para realização desta jornada. Aos meus pais, **Maria da Conceição e Júlio Mendes**, por todo apoio durante minha jornada de vida. Todos ensinamentos. Por acreditar na minha formação e me ajudar a progredir, alcançar meus objetivos.

A minha filha amada **Maria Isabelly**, por ser meu presente divino. Agradeço por todo carinho, compreensão, cumplicidade, apoio incondicional e incentivo. O tempo de nossa convivência “roubado” pela tese só fez fortalecer a vontade de estar junto de você.

Ao Professor **Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues**, orientador da presente tese, pela oportunidade que me foi dada de vivenciar, pela preocupação e paciência, por possibilitar o cumprimento deste trabalho.

A Professora **Dra. Márcia Bezerra Silva**, pela co-orientação, por abrir as portas de ingresso ao LBM-CT desde a iniciação científica, pela confiança a mim depositada, pelo aprendizado na cultura de células e acompanhamento durante os experimentos. E também pela amizade fortalecida ao longo dos 8 anos de convivência.

Ao Professor **Dr. Oleg Vladimirovich Krasinilov (in memorian)**, pela confiança dada e apoio, pelos ensinamentos que serão guardados sempre.

A Prof^a **Liliya Yuldasheva**, agradeço pelo carinho, disponibilidade, paciência e preocupação nos experimentos e finalização deste trabalho.

Ao Professor **Dr. Reginaldo Pereira** sempre prestativo e presente durante a execução dos experimentos, sendo essencial para cumprimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biofísica de Membranas (LBM-CT) que tornam minha jornada prazerosa e acolhedora (Wyndly Daniel, Juliana Aguiar, Sheila Melo, Artur Alves, Deborah Fortes, Carolina Melo).

Em especial ao companheiro de jornada **Wyndly Daniel** por sua ajuda, pela paciência, por todo acompanhamento na realização dos experimentos e toda contribuição nas etapas desse trabalho. Mais que um colaborador, um amigo.

A **Juliana Aguiar** por sua paciência e companhia agradável, por proporcionar dias mais suaves de trabalho e risadas, sempre disposta a ajudar.

A amiga **Dra. Dijannah Cota** pela ajuda nas análises estatísticas, por sua

disponibilidade, por toda atenção, paciência e também pela força e palavras de conforto nos momentos difíceis.

A colega **Darlene Paiva** por sua ajuda na compreensão das análises estatísticas.

As amigas **Dra. Layse Malagueta** e **Juliana Brandão** que mesmo tão distantes se fazem tão presentes, com palavras amigas e de incentivo.

A minha amiga **Nadja Freire** sempre presente, pela preocupação e acolhimento, pela força, abraços acolhedores e palavras generosas e de incentivo.

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

A colaboração da colega **Camila Dantas**, pelo apoio técnico no **LIKA** na realização da RT-PCR.

A colaboração do colega **Paulo Euzébio**, pelo apoio técnico na citometria de fluxo, pelas boas conversas e risadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (**FACEPE**) pelo apoio financeiro de suma importância.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biofísica e Radiobiologia do Centro de Biociências.

A equipe de obstetrícia do **Hospital D'Avila**, pela parceria e concessão dos cordões umbilicais.

Ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT), em especial ao funcionário **Paulo Germano** que sempre se colocou à disposição para solucionar os problemas, por todo compromisso, atenção e apoio.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Que Deus proteja todos vocês.

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

(Vinícius de Moraes)

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.” (Charles Chaplin)

RESUMO

A regulação do volume celular é importante em vários processos fisiológicos. A diminuição regulatória do volume (RVD) é o processo pelo qual as células recuperam o seu volume após terem sido submetidas a um choque hipoosmótico. Este processo se deve principalmente à liberação de K^+ e Cl^- através de canais e transportadores iônicos. O objetivo deste trabalho foi estudar a participação dos canais de potássio e canais de cloreto envolvidos na RVD e na proliferação das células-tronco mesenquimais da geléia de Wharton do cordão umbilical humano (hWJ-MSCs). As hWJ-MSCs foram isoladas de acordo com a técnica de migração espontânea do explante. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 15 % soro fetal bovino, 10 % F-12, 100 U/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina e mantidas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C. Nos experimentos da RVD, as hWJ-MSCs foram depositadas em uma cubeta acoplada a um microscópio invertido com um sistema de vídeo imagem, sendo submetidas inicialmente a um choque hipoosmótico (300 mOsm \rightarrow 200 mOsm) por perfusão. A dinâmica de variação do volume foi monitorada por 30 min e as imagens antes (300 mOsm) e durante o choque hipoosmótico (200 mOsm) foram obtidas a cada minuto e analisadas usando o software ImageJ. As hWJ-MSCs foram submetidas aos seguintes inibidores de canais: tetraetilamônio (TEA) 10 mM, (canal de K_v); glibenclamida (GB) 100 μ M, (canal de $K_{ir6.x}$); 4-aminopiridina (4-AP) 5 mM, (canal de K_v1 , KCNA), Iberiotoxina (IBTX) 10 nM (canal BK_{Ca}), (ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzóico (NPPB), (canal de Cl^-), ácido disulfônico diisocianatoestilbeno (DIDS) 100 μ M e Tamoxifeno (TAM) 10 μ M. Posteriormente, as células foram submetidas aos ensaios de MTT, curva de crescimento, quantificação do conteúdo de DNA e RT-PCR. A técnica de patch clamp na configuração Whole-cell foi empregada para caracterização das correntes iônicas. Os dados foram analisados usando o teste t Student's ou ANOVA, com pós-teste de Tukey ou de Bonferroni. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A RVD presente nas hWJ-MSCs foi suprimida na presença dos inibidores de canais de potássio e de canais de cloreto. As hWJ-MSCs apresentaram três perfis de corrente iônica: Maxi K (BK ou K_{Ca}); corrente de potássio transiente de saída (I_{to}) e uma corrente de retificação tardia (K_{DR}). As hWJ-MSCs na presença dos inibidores de canais iônicos reduziram a proliferação permanecendo na fase G0/G1 do ciclo celular. As hWJ-MSCs expressaram os canais de potássio (MaxiK, KCND2, KCND3, KCNS1, KCNH2 e KCNH1) e os canais de cloreto (p1-VDAC e CLCN3). Deste modo, conclui-se que os canais de potássio dependentes de voltagem (K_v), canais de potássio dependentes de ATP, ativados por cálcio de alta condutância (K_{Ca}) e canais de cloreto participam no mecanismo da RVD e conseqüentemente interferem na proliferação das hWJ-MSCs.

Palavras chaves: Regulação de volume. RVD. Canal iônico. Células-tronco mesenquimais. Inibidores.

ABSTRACT

Cell volume regulation is one of the most fundamental homeostatic mechanisms and essential for normal cellular function. The phenomenon of shrinkage and / or cell swelling caused by osmotic changes are called regulatory volume increase (RVI) and regulatory volume decrease (RVD), respectively. The RVD is the process by which cells recovery its volume after being subjected to hypoosmotic environment. This process occurs due to release K^+ and Cl^- through ion channels and transporters. The aim of this study was to investigate the involvement of ionic channels involved in RVD and proliferation of mesenchymal stem cells from Wharton's Jelly of the human umbilical cord (hWJ-MSCs). The hWJ-MSCs were isolated according to the spontaneous migration of the explant technique. Cells were grown in DMEM supplemented with 15% fetal bovine serum, 10 % F-12, 100 U / ml penicillin and 100 ug / ml streptomycin and maintained in an atmosphere of 5 % CO_2 at 37 °C. In the experiments the RVD, the hWJ-MSCs were placed in a chamber coupled to an inverted microscope with a video image system and initially subjected to shock hypo-osmotic (300 mOsm \rightarrow 200 mOsm) perfusion. The dynamics of volume change was monitored for 30 minutes before (300 mOsm) and during hypo-osmotic shock (200 mOsm) and the images (every min) analyzed using the ImageJ software. Specific cation channel inhibitors such as tetraethylammonium (TEA) 10 mM (K_v channel); glibenclamide (GB) 100 μ m (Kir6.x channel); 4-aminopyridine (4-AP) 5 mM (K_{v1} channel KCNA), iberotoxin (IBTX) 10 nM (BK_{Ca} channel) and cellular anion inhibitors (5-Nitro-2- (3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) (Cl^- channel), disulfonic acid di-isocianatoestilben- (DIDS) 100 μ m (Cl^- channel) and tamoxifen (TAM) 10 μ m (Cl^- channel) were used as molecular tools to evaluate the influence of ion channels in regulate mechanism RVD and cell proliferation. Subsequently, the cells were subjected to MTT assay, growth curve, flow cytometer to quantify the DNA content and RT-PCR. The patch clamp technique in Whole-cell configuration was employed to characterize the ionic currents. For statistical analysis, one-way ANOVA followed Tukey's or Bonferroni post hoc test were performed. A p-value less than 0.05 were considered statistically significant. The RVD in hWJ-MSCs was abolished in the presence of ionic channels inhibitors (potassium and chloride). The electrophysiological recording presents, at least, three different profiles compatible with: noisy current as a Maxi K current (BK or K_{Ca}), transient outward K^+ current (Ito) and a slower activating delayed rectifier (K_{DR}). Also showed that hWJ-MSCs in the presence of the ionic channel inhibitors reduced the cell proliferation and arrest cells in G0/G1 cell cycle stage. As hWJ-MSCs expressed of the potassium channels (MaxiK, KCND2, KCND3, KCNS1, KCNH2 and KCNH1) and chloride channels (p1-VDAC and CLCN3). The results showed that there are a relationship of cell cycle progression and membrane permeability. Thus, we concluded that there is participation of K_{ATP} , BK_{Ca} K_v and Cl^- channels in the mechanism of RVD and proliferation of hWJ-MSCs.

Key words: Ionic channel. Cell volume regulation. RVD. Cell proliferation. Cell cycle. Mesenchymal Stem Cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Estrutura de um canal iônico. Visão do interior de um canal iônico, mostrando 2 íons no filtro de seletividade e 1 no interior da cavidade central (DOYLE et al.,1998).....	23
FIGURA 2. Conformação do canal unitário (GADSBY, 2009).....	24
FIGURA 3. Classes dos principais osmólitos orgânicos (LANG et al., 2007).....	32
FIGURA 4 Mecanismos de regulação do volume celular (DANZIGER, ZEIDEL, 2014)..	34
FIGURA 5. Ilustração esquemática dos mecanismos de transporte envolvidos na RVI. (Extraída de BERNE, LEVY Physiology, 6 ° edição. 2008).....	42
FIGURA 6. Ilustração esquemática dos mecanismos de transporte envolvidos na RVD. (Extraída de BERNE, LEVY, Physiology, 6 ° edição 2008).....	44
FIGURA 7. Representação esquemática da topologia dos canais de potássio (Retirada de HUANG, JAN. 2014).....	45
FIGURA 8. Canais de potássio sensíveis ao volume (Adaptada de HOFFMANN et al., 2009).....	49
FIGURA 9. Canais de cloreto e doenças humanas. Ilustração mostrando a localização celular, o tipo de canal de Cl ⁻ e a doença associada com a desregulação da atividade do canal (PULJAK, KILIC, 2006).....	53
FIGURA 10. Representação dos canais de cloreto de acordo com seu mecanismo de ativação (DURAN et al., 2010).....	54
FIGURA 11. Esquema da função do canal sensível a volume VRAC (ABSCAL, ZARDOYA, 2012).....	56
FIGURA 12. Representação esquemática do ciclo de divisão eucariótico (BEHL & ZIEGLER, 2014).....	65
FIGURA 13. Potencial de diferenciação das CTMs (FU- JIANG & SHI-QING, 2009).....	75
FIGURA 14. Número do registro de ensaios clínicos baseados na terapia celular com CTMS (ClinicalTrials.gov) (WEI X., 2013).....	76
FIGURA 15. Anatomia do cordão umbilical mostrando a géleia de Wharton (Adaptada de TROYER & WEISS, 2008).....	79
FIGURA 16. Esquema mostrando sequência de procedimento desde a coleta do cordão umbilical até o acompanhamento da expansão das células – tronco(autora).....	81
FIGURA 17. Citômetro FACSCalibur.....	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Patologias associadas aos defeitos de funcionamento em canais iônicos (Adaptada de HUBNER & JENTSCH, 2002).....	25
TABELA 2. Distribuição tecidual de diferentes subunidades dos canais de K_{ATP} (Adaptada de SANDHIYA & DKHAR, 2009).....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC - Transportadores do ATP (do inglês ATP- binding cassette)
- ADH - hormônio antidiurético
- AE - trocador aniônico (do inglês *anion exchanger*)
- AQP - aquaporina
- ATP - adenosina trifosfato
- AVD - diminuição de volume apoptótica
- BK - canal de potássio ativado por cálcio de alta condutância
- cAMP - monofosfato de adenosina cíclico
- CFTR - fator regulador da condutância transmembrana modificado na fibrose cística (do inglês *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)
- CFU-F - unidades formadoras de colônias de fibroblastos
- CIC - família de canal de cloreto
- CT - célula-tronco
- CTA - células-tronco adultas
- CTE - células-tronco embrionárias
- CTH - células-tronco hematopoiéticas
- CTMs - células-tronco mesenquimais
- DIDS - ácido 4,4' diisotiocianoestilbeno – 2,2' dissulfônico
- DNA - ácido desoxirribonucléico
- ERK - quinases reguladas por sinais extracelulares
- ICM - massa celular interna
- IK - canal de potássio ativado por cálcio de condutância intermediária
- IPs - células-tronco pluripotentes induzidas
- JNKs - C-Jun N-terminal quinases
- kDa - Quilo dalton
- KCC - co-transportador K⁺-Cl⁻
- KCl - cloreto de potássio
- KCNE1/KCNQ1 - subfamílias de canal de potássio dependente de voltagem
- Kir - canal de potássio de retificação interna (do inglês *Inwardly rectifying potassium channels*)
- Kv - canal de potássio dependente de voltagem
- Lp - condutividade hidráulica
- MAP - proteína cinase ativada por mitógeno
- MinK - tipo de canal de potássio (do inglês minimal potassium subunits)
- MLC - miosina de cadeia leve (do inglês myosin light chain)

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

MMP-9 - metalopeptidase-9 de matriz

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NEM - tiol-alquilantes N-etilmaleimida

NCC - co-transportador Na^+ - Cl^-

NKCC - co-transportador Na^+ - K^+ - 2Cl^-

NHE - trocador Na^+/H^+

NSC - canais catiônicos não seletivos permeáveis ao Na^+

NO - óxido nítrico

PDGFR - receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

PEPCK - fosfoenolpiruvato carboxiquinase

RVD - diminuição regulatória do volume

RVDC - canal regulador da RVD

RVI - aumento regulatório do volume

SK - canal de potássio ativado por cálcio de pequena condutância

SLC - Família Carreadora de Solutos 4

TASK - canal de potássio sensível a ácido

TNF- fator de necrose tumoral

TRAAK- canal de potássio sensível ao ácido araquidônico

TREK - Subfamília de canal de potássio de dois poros

TauT: carreador de taurina

VRAC - Canal aniônico regulado por volume ou canal mecano-sensível . (do inglês *Volume Regulated Anion Channel*)

VSCC - Canal de cloreto sensível ao volume (do inglês *Volume Sensitive Chloride Channel*)

VSOAC - Canal aniônico sensível a osmólitos orgânicos

VSOR - Canal aniônico sensível ao volume de retificação externa

WNKs - Quinases sem lisina (do inglês With-no-lysin kinases)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Geral.....	20
2.2	Específicos.....	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	Canais iônicos.....	21
3.2	Homeostasia do volume celular.....	26
3.3	O movimento de água na célula	33
3.4	Mecanismos sensores do volume.....	39
3.5	Mecanismos reguladores do volume celular.....	41
3.5.1	Aumento Regulatório do Volume.....	41
3.5.2	Diminuição Regulatória do Volume.....	43
3.5.2.1	Mecanismos de transporte iônico envolvidos no RVD.....	44
a)	Canais catiônicos	44
b)	Canais aniônicos.....	51
c)	Co-transportador de potássio e cloreto.....	59
d)	Trocador aniônico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$	61
e)	Osmólitos orgânicos	62
3.6	Ciclo Celular.....	64
3.7	Células – tronco.....	67
3.7.1	Células-tronco mesenquimais.....	72
3.7.1.1	Células-tronco do cordão umbilical.....	78
4	MATERIAIS E MÉTODOS	80
4.1	Coleta do cordão umbilical humano.....	80
4.2	Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais.....	80

4.3	Identificação das células-tronco mesenquimais.....	81
4.4	Ensaio de proliferação celular.....	83
4.5	Ensaio de viabilidade celular.....	83
4.6	Experimentos para análise do RVD.....	84
4.6.1	Soluções.....	84
4.6.2	Análise morfológica do volume celular - RVD.....	85
4.7	Análise do ciclo celular.....	86
4.8	Extração de RNA e qRT-PCR.....	86
4.9	Patch Clamp - Registros eletrofisiológicos.....	87
4.10	Análise estatística.....	87
5	RESULTADOS	88
5.1	Manuscrito 1: Role of chloride Channel in regulatory volume decrease and proliferation of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly human umbilical.....	88
5.2	Manuscrito 2: Mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of human umbilical cord: expression, function and physiological role of potassium channels.....	118
6	CONCLUSÕES	144
	REFERÊNCIAS	145
	ANEXO A: Parecer do comitê de ética em pesquisa da UFPE.....	161
	ANEXO B: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	163

1 INTRODUÇÃO

Os canais iônicos formam um grupo diversificado de proteínas integrais ubiquamente distribuídas em biomembranas, constituindo os poros que possibilitam o fluxo de íons devido ao gradiente de potencial eletroquímico (HILLE, 2001). Tais canais apresentam importante papel na homeostasia fisiológica, sendo elementos chave na excitabilidade celular (HILLE, 2001). Participam de vários fenômenos biológicos, dentre os quais destacam-se geração e propagação de biopotenciais, contração muscular, manutenção (junto com carregadores e bombas) dos níveis iônicos no estado de repouso das células, regulação do volume e proliferação celular (WHENER et al., 2006; LANG et al., 2007; DA SILVA et al., 2010; LI, DENG 2011; URREGO et al.; 2014).

Os canais iônicos participam diretamente da regulação de volume (SARDINI et al., 2003; OKADA et al., 2004; FRIEDRICH et al, 2006; HOFFMAN et al., 2009) e evidências indicam que participam decisivamente na modulação e progressão do ciclo celular (WANG et al., 2002; LI, DENG, 2011; HUANG, JAN, 2014; URREGO et al., 2014).

Um dos mecanismos pelos quais os canais iônicos regulam a proliferação celular é através do controle do volume celular (HUANG, JAN, 2014). A habilidade de regulação do volume celular é uma característica fundamental das células e tem sido conservada essencialmente em todas as espécies ao longo de sua evolução (LANG et al., 1998; RITTER et al., 2003). As células são persistentemente desafiadas por distúrbios do equilíbrio osmótico entre o espaço intra e extracelular devido a mudanças na osmolaridade do ambiente, metabolismo de solutos osmoticamente ativos ou íons e transporte de substratos. Por outro lado, as células mudam o seu volume para executar funções específicas tais como divisão celular, migração ou secreção (RITTER et al., 2003; OKADA et al., 2004; WHENER et al., 2006; LANG et al., 2007; HOFFMAN et al., 2009). Desta forma, mecanismos reguladores do volume estão envolvidos em várias funções celulares, incluindo a proliferação e perturbações destes mecanismos podem levar a diversas disfunções (LANG et al., 1998).

Os processos pelos quais as células “inchadas” ou “murchas” retornam ao seu volume inicial são denominados RVD (do inglês *Regulatory Volume Decrease* – que significa “decréscimo regulatório do volume”) e RVI (do inglês *Regulatory Volume Increase* – que significa “aumento regulatório do volume”), respectivamente (MONGIN, ORLOV 2001; SARDINI et al., 2003; STRANGE, 2004; FRIEDRICH et al., 2006; HOFFMAN et al., 2009;

PENDERSEN, KAPUS, HOFFMAN, 2011). Na maioria das células estudadas, a RVD requer a liberação de íons através da atividade concomitante de canais de K^+ e canais de Cl^- (MINTON, 2006; WEHNER, 2006; HOFFMANN et al., 2009). Além do transporte iônico, o transporte de pequenas moléculas orgânicas também participa do processo de RVD (WHENER et al., 2003; YANCEY, 2005; LANG et al., 2007).

Paralelamente, existe um número crescente de observações demonstrando que a progressão do ciclo celular está relacionada com a permeabilidade da membrana a íons e que existe uma ligação com a regulação do volume celular (LANG et al. 2007; BLACKISTON et al., 2009; HUANG et al. 2014).

A atividade e expressão dos canais iônicos variam ao longo do ciclo celular e os canais de K^+ ou Cl^- estão envolvidos neste processo (WANG et al., 2002; DENG et al., 2012; URREGO et al., 2014). As observações iniciais de que um amplo espectro de bloqueadores de canais de K^+ inibe a proliferação têm sido confirmadas em diferentes tecidos e diversos tipos celulares, incluindo células-tronco mesenquimais (ZHANPING et al., 2006; WANG et al., 2008; LI, DENG, 2011; DING et al., 2012; URREGO et al, 2014). As pesquisas revelam que ocorre ativação simultânea de canais de K^+ e canais de Cl^- durante progressão do ciclo celular (NILLIUS, DROOGMANS, 2003), enquanto que o bloqueio farmacológico destes canais pode interromper o processo (OUADID-AHIDOUCH, AHIDOUCH, 2008).

Tendo em vista que os canais iônicos e os mecanismos de regulação de volume estão envolvidos na proliferação celular, o estudo destes em células-tronco mesenquimais torna-se extremamente relevante, uma vez que os resultados podem contribuir para o desenvolvimento da terapia celular e engenharia de tecidos. Neste contexto, analisamos o envolvimento dos canais de K^+ e canais de Cl^- no mecanismo de RVD e proliferação das células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton do cordão umbilical humano (hWJ-MSC) durante o ciclo celular.

Entender melhor sobre o mecanismo de RVD e o papel dos canais iônicos neste processo pode permitir vias para o controle da proliferação celular *in vitro* através da modulação do transporte iônico.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a participação dos canais iônicos na proliferação e regulação do volume das células-tronco mesenquimais (CTMs) da geleia de Wharton do cordão umbilical humano.

2.2 Específicos

- ✓ Isolar, cultivar e caracterizar as células-tronco mesenquimais (CTMs) obtidas do cordão umbilical humano;
- ✓ Estudar a cinética da regulação da diminuição do volume celular (RVD) das CTMs;
- ✓ Identificar os canais iônicos (potássio e cloreto) participantes no mecanismo de RVD; na presença de bloqueadores específicos.
- ✓ Investigar o envolvimento dos canais iônicos (potássio e cloreto) na proliferação celular (através da curva de crescimento e ensaio de viabilidade celular via MTT);
- ✓ Avaliar a presença dos canais iônicos (potássio e cloreto) no ciclo celular através da quantificação do DNA por citometria de fluxo;
- ✓ Estudar a expressão dos canais iônicos (potássio e cloreto) nas CTMs por RT-PCR.
- ✓ Estudar as propriedades eletrofisiológicas dos canais iônicos (potássio) presentes nas CTMs através da técnica do patch clamp.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Canais iônicos

A comunicação entre e/ou dentro das células é parte integrante de todos organismos vivos. Embora exista uma ampla variedade de mecanismos usados para processo de sinalização celular, talvez o meio mais fundamental pelos quais as mensagens são transmitidas seja através do movimento de íons. A existência de sistemas de transporte (canais e transportadores iônicos) capazes de movimentar os íons através das membranas celulares é essencial para a vida das células (CORRY, 2006).

Os canais iônicos são um grupo diversificado de proteínas integrais ubiquamente distribuídas em biomembranas, presentes em todas células desde uma simples bactéria a neurônios altamente especializados, formando poros que possibilitam o fluxo de milhares de íons devido ao gradiente de potencial eletroquímico (HILLE, 2001; CHOE, 2002; HUANG, JAN, 2014).

Esses canais formam poros hidrofílicos de dimensões nanométricas (~ 4nm) que permitem a difusão passiva de íons (por exemplo, K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ , entre outros) em curto intervalo de tempo (10^7 íons/segundo) através das membranas biológicas (HUBNER, JENTSCH, 2002; CHEN, HWANG, 2008). Isto o distingue dos transportadores iônicos e bombas, que também transportam íons, porém numa baixa taxa de difusão (TABASSUM, FERROZ, 2011).

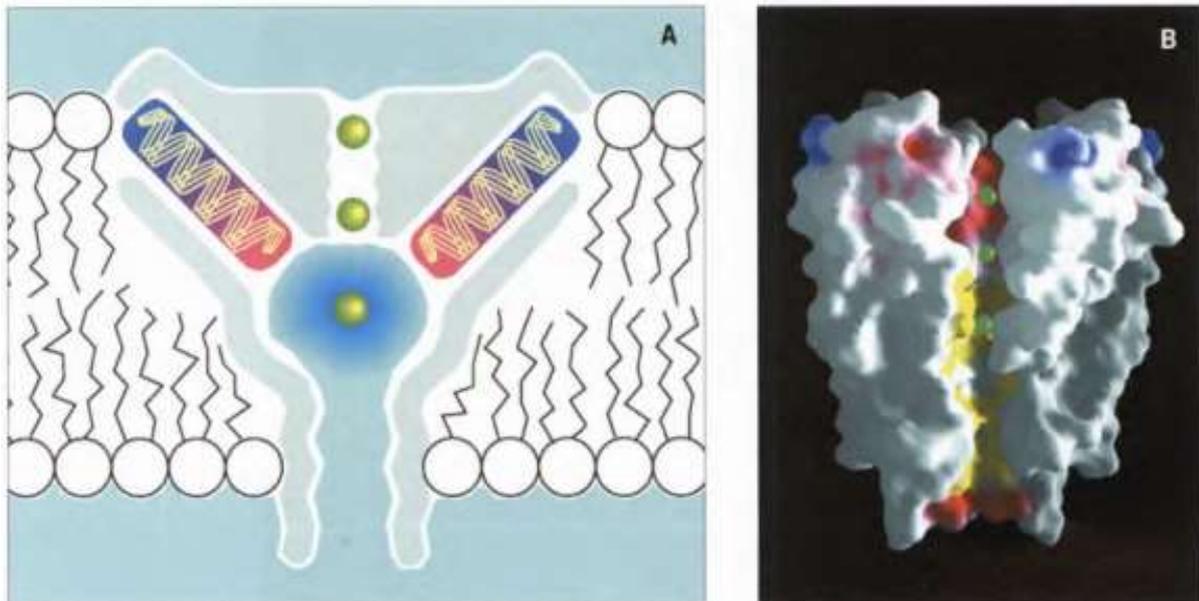
Os canais iônicos desempenham importantes papéis na manutenção da integridade celular, e estão envolvidos em processos como transdução sensorial, propagação de biopotenciais, contração muscular, secreção hormonal, metabolismo ósseo, imunidade inata, apoptose, proliferação, migração e regulação do volume celular (HILLE, 2001, GHATTA et al., 2006; BLACKISTON et al., 2009).

A existência hipotética dos canais iônicos foi descrita pela primeira vez pelos biofísicos britânicos Alan Hodgkin e Andrew Huxley, em 1952. Como parte dessa pesquisa, eles descreveram o modelo de propagação do potencial de ação em células excitáveis, usando o axônio de lula gigante. Estes achados lhes renderam o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1963. Em 1970, a existência de canais iônicos foi confirmada através da técnica do “Patch Clamp” pelos eletrofisiologistas alemães Erwin Neher e Bert Sakmann, que também ganharam o Prêmio Nobel de Medicina em 1991. Em 2003, o Prêmio Nobel de Química foi concedido aos cientistas americanos Roderick MacKinnon e Peter Agre que estudaram canais iônicos e

aquaporinas, respectivamente, usando a técnica de cristalografia de raios-X (NADEEM, HUSSAIN, 2010).

Quanto à estrutura tridimensional, estas proteínas são geralmente formadas por mais de uma subunidade em um arranjo circular em torno de um poro que forma um filamento de água, as subunidades que formam o poro aquoso são chamadas subunidades α , enquanto que as subunidades auxiliares, que modulam as propriedades dos canais, são chamadas de β , γ e assim por diante. Muitas vezes existem várias isoformas de cada subunidade que dão origem a um número quase infinito de combinações possíveis e, portanto, isoformas funcionais dos canais iônicos (WILLUMSEN, 2003; GADSBY, 2009). Desta forma, os canais são específicos para certos íons (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) ou para uma determinada classe de íons, o que permite sua classificação em catiônicos e aniônicos (HUBNER, JENTSCH, 2002).

Uma característica intrínseca dos canais iônicos é apresentar alta seletividade para uma determinada espécie iônica (HUBNER, JENTSCH, 2002; TABASSUM, FERROZ, 2011). Alguns canais permitem a passagem de íons baseados principalmente na sua carga positiva ou negativa. Entretanto, o mais comum é que apenas um ou dois tipos de íons passem pela parte mais estreita do canal, o filtro de seletividade. A existência deste mecanismo de seletividade foi primeiramente postulado nos anos 60 por CLAY ARMSTRONG (BENZANILLA, 1972). Essa seletividade é baseada no tamanho, carga e estado de hidratação dos íons (DOYLE et al., 1998; CHOE, 2002; GADSBY, 2009) (**FIGURA 1**).

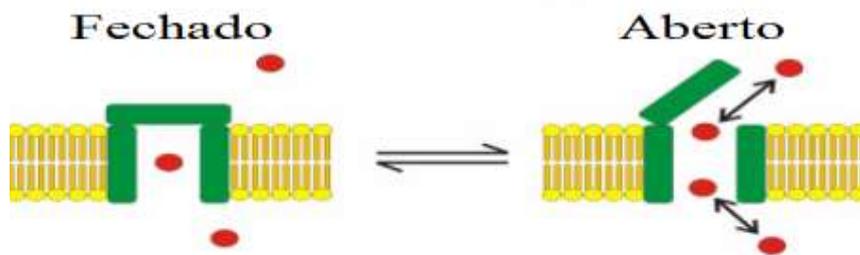
FIGURA 1 - Estrutura de um canal iônico.

Fonte: DOYLE et al.,1998. Visão do interior de um canal iônico, mostrando 2 íons de potássio no filtro de seletividade e 1 no interior da cavidade central. A. Esquema que mostra os dois mecanismos de estabilização do K^+ no interior do canal, a orientação dos polos negativos (cor vermelha) das duas meias hélices para o interior do canal com os polos positivos (cor azul) para a superfície. Cavidade central larga e aquosa B. Visão de uma secção das paredes do canal coloridas de acordo com suas propriedades físicas: azul, zonas carregadas positivamente, vermelho, zonas negativas em amarelo, zonas hidrofóbicas.

Além da região do filtro de seletividade, alguns canais têm uma configuração estrutural apresentando uma região de comporta ou “gate”, que pode abrir e fechar respondendo a estímulos diversos, dependendo de cada canal (AGUILELLA et al., 2011; TABASSUM, FERROZ, 2011). A região de comporta apresenta duas conformações: fechada ou aberta (**FIGURA 2**). O fenômeno de abertura e fechamento da comporta é conhecido como cinética dos canais iônicos e permite que haja diversos tipos de regulação celular. Em geral, os canais iônicos são “controlados” abrindo em resposta a um estímulo específico, como por exemplo: uma mudança no potencial de membrana (canais dependentes de voltagem), canais controlados por ligante (exemplo: canais ativados por GABA, glutamato, etc), por estresse mecânico (canais controlados mecanicamente), canais sensíveis a volume e canais sensíveis a temperatura. Adicionalmente, os canais também podem ser regulados através da concentração intracelular de Ca^{+2} , pH, fosforilação e lipídios. Há outros canais que não possuem comportas, os chamados “non-gated channels” ou canais de repouso, cujo fluxo de íons é regulado simplesmente pelo

gradiente de concentração iônica e pela bomba de sódio e potássio (HILLE, 2001, CHOE, 2002; HUBNER, JENTSCH, 2002; HUSARU et al., 2005; KASS, 2005).

FIGURA 2 - Conformação do canal unitário.



Fonte: GADSBY, 2009. Representação esquemática de um canal iônico formando poro que atravessa a membrana, através dos quais o movimento dos íons é controlado por uma comporta conhecida como “gate”.

Os mais de 400 genes que codificam os canais iônicos representam aproximadamente 1,5% do genoma humano, estes canais desempenham ampla diversidade estrutural e funcional (HUANG, JAN, 2014). Os canais iônicos residem tanto na membrana plasmática, quanto nas membranas de diversas organelas celulares (ASHCROFT, 2000), exercendo funções em processos fisiológicos, patológicos e toxicológicos (RESTREPO-ÂNGULO et al., 2010).

Os canais iônicos participam de uma série de processos biológicos importantes para a homeostasia do organismo Além de sua clássica função de regular a excitabilidade elétrica de nervos e músculos, eles desempenham um papel muito mais abrangente. Podem participar da sinalização intracelular, podem estar envolvidos na adesão celular ou na arquitetura do citoesqueleto e alterar a expressão de genes específicos (KACZMAREK, 2006). Ao nível celular, por exemplo, são cruciais para o transporte transepitelial, transporte de íons e de água, regulação do volume celular, pH citoplasmático e vesicular, acidificação de organelas intracelulares e regulação do Ca^{2+} citoplasmático, concentração que é crucial na sinalização química (no caso particular de canais de Ca^{2+}) (HUBNER, JENTSCH, 2002; KASS, 2005; PLANELLS – CASES, JENTSCH, 2009; NADEEM, HUSSAIN, 2010).

Sua importância se estende desde o controle do movimento dos cílios que permitem a movimentação do *Paramecium*, ao esclarecimento de doenças cujas etiologias eram desconhecidas até então, como por exemplo, a fibrose cística. Alterações na expressão e atividade dos canais iônicos podem resultar em diversas patologias, conhecidas como

canalopatias. Elas resultam diretamente da mutação em um gene do próprio canal ou em genes que codificam agentes moleculares envolvidos em suas vias reguladoras (ASHCROFT, 2000). Mutações nos canais de K^+ sensíveis ao ATP afetam fortemente a secreção de insulina, e mutações nos canais de Cl^- dos endossomos e lisossomos pode causar cálculos renais e osteoporose, respectivamente (HUBNER, JENTSCH, 2002). Disfunções dos canais também afetam o sistema neuromuscular podendo causar doenças tais como: arritmia cardíaca, epilepsia, miotonia. Também estão envolvidos na toxicologia, pois diversos animais venenosos (serpentes, peixes, aranhas e outros insetos) produzem toxinas que atuam nos canais iônicos (RESTREPO-ÂNGULO et al., 2010). Defeitos no transporte epitelial podem ser a base de entendimento para doenças como a fibrose cística e diferentes formas da Síndrome de Bartter e doença de Dent's (TABELA 1). Considerando sua indiscutível importância fisiológica, os canais iônicos são usados como modelo para síntese de novos medicamentos para o tratamento de diversas doenças tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, cancro, epilepsia (HUBNER, JENTSCH, 2002, PARDO et al., 2005; OVERINGTON et al., 2006).

TABELA 1. Patologias associadas aos defeitos de funcionamento em canais iônicos

Canal iônico defeituoso	Patologia
Canal de potássio (K^+)	- Ataxia episódica - Síndrome do QT longo - Hipoglicemia hiperinsulinêmica
Canal de sódio (Na^+)	-Paralisia periódica hipercalêmica (Doença de Gamstrop) - Epilepsia - Paramiotonia congênita - Miotonia atípica
Canal de cloreto (Cl^-)	- Fibrose cística - Miotonia congênita (Doença de Thomsen) - Miotonia generalizada (Doença de Becker) - Síndrome de Bartter's - Doença de Dent's
Canal de cálcio (Ca^{2+})	- Paralisia periódica hipocalêmica; - Hipotermia maligna - Ataxia episódica - Epilepsia - Doença Renal policística

Fonte: Adaptada de HUBNER, JENTSCH, 2002

3.2 Homeostasia do volume celular

A regulação e manutenção do volume celular é um processo fisiológico fundamental, considerando as variações dos meios interno ou externo. Alterações no conteúdo de água na célula podem afetar a concentração de mensageiros moleculares prejudicando a complexa rede de sinalização crucial para as funções celulares e comunicação intracelular. Desta forma, a manutenção do volume adequado, diante de perturbações osmóticas extracelulares e intracelulares, é essencial para sobrevivência das células animais e tem sido conservada ao longo de sua evolução (LANG et al., 1998). O volume celular é desafiado por mudanças na osmolaridade externa em espécies aquáticas e em poucos tipos de células de animais terrestres, mas também sofre alterações dinâmicas em diversos processos fisiológicos e patológicos (LANG et al., 1998; PASANTES, MORALES, 2000; MONGIN, ORLOV, 2001; HOFFMAN e al., 2009).

Uma vez que células animais não possuem uma parede celular rígida, como visto em células vegetais, o inchaço ou encolhimento pode prejudicar a integridade da membrana e citoesqueleto das células animais (LANG et al., 1998; PEDERSEN, HOFFMAN, MILLS 2001; WHENER et al., 2003). Para sua sobrevivência, as células mantêm seu volume dentro de certos limites, pois pequenas alterações no volume afetam as funções celulares devido as alterações no balanço de enzimas e concentração de substratos. Desta maneira, o inchaço ou encolhimento celular compromete as funções bioquímicas intracelulares, metabolismo energético, liberação e transmissão hormonal, excitabilidade e contração, migração, proliferação e apoptose (SARDINI et al., 2003; LANG et al., 2007). Apoptose celular, por exemplo, está associada com uma diminuição no volume celular e esta é denominada decréscimo apoptótica do volume (AVD - Apoptotic Volume Decrease), enquanto que na morte celular por necrose é observado um aumento irreversível do volume celular (OKADA, MAENO, 2001; OKADA et al., 2004; SHIMIZU et al., 2006). O AVD é acompanhado pela perda celular de íons, principalmente K^+ e Cl^- e aminoácidos (OKADA, MAENO, 2001; LANG, HOFFMAN, 2012).

Embora a maioria das células se mantenham em um ambiente altamente regulado, elas podem enfrentar desafios de mudanças osmóticas internas e externas. Por exemplo, células do epitélio intestinal, durante absorção, são expostas a fluidos anisomóticos no lúmen; células na medula renal passam por períodos prolongados expostas ao meio com alta osmolaridade extracelular (~1400 mOsmol/l), bem como sofrem rápidas mudanças de osmolaridade durante

transição da antidiurese a diurese (LANG et al., 1998; STRANGE, 2004). Células sanguíneas, em menos de um minuto atravessando a medula renal são expostas a alta osmolaridade e retornam a condições isosmóticas na corrente sanguínea (LANG et al., 2007).

Alterações nas concentrações intracelulares de osmólitos, como consequência do transporte de substratos ou alterações das taxas metabólicas, também constituem um desafio para manter constante o volume celular (GONCZI et al., 2007). Por exemplo, hepatócitos mudam seu volume em resposta ao aumento da quantidade de aminoácidos e outros nutrientes, e células epiteliais envolvidas no transporte transepitelial têm o balanço de substratos aumentado (LI, WEINMAN, 2002).

Além disso, a concentração de osmólitos pode ser afetada por mudança na taxa metabólica, como a quebra de glicogênio nos hepatócitos (HOFFMAN et al., 2009). Diversos hormônios e outros mediadores alteram o volume celular. Por exemplo, a insulina induz inchaço celular dos hepatócitos, via de ativação do co-transportador NKCC ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$) e trocador AE (Na^+/H^+), enquanto ativação de canais de K^+ por glucagon nos hepatócitos, causam encolhimento celular, possivelmente pela ativação de canais iônicos (STRBAK, 2006).

Visando proteger a integridade estrutural da membrana e manter a homeostasia do ambiente interno, células animais desenvolveram mecanismos especializados para acúmulo ou extrusão de moléculas osmoticamente ativas, permitindo ajustes na osmolaridade intracelular e regulação do volume celular. Estes mecanismos podem ser divididos em três categorias (MONGI, ORLOV, 2001):

- ✓ Regulação do volume em condições isotônicas principalmente devido ao papel da bomba de sódio- potássio ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$);
- ✓ Mecanismos de resposta rápida, que ocorre dentro de segundos a minutos após perturbação do volume com ativação de canais e transportadores iônicos;
- ✓ Mecanismos de resposta lenta, com adaptação para alterações crônicas na osmolaridade extracelular, envolvendo modificações na expressão de genes e conteúdo dos osmólitos orgânicos intracelulares.

Durante condições isoosmóticas, as células apresentam variações de volume, devido à sua própria atividade, que alteram constantemente a osmolaridade intracelular. Sob condições de

estado estacionário, os níveis intracelulares de soluto são mantidos constantes por um balanço preciso entre o influxo e efluxo através da membrana plasmática, e também pela produção metabólica e remoção das substâncias osmoticamente ativas (osmólitos). Nesta condição, existe uma igualdade nos fluxos de entrada e saída de solutos (STRANGE, 2004), e a diferença entre a pressão osmótica intracelular e extracelular, gerada pela presença de macromoléculas intracelulares carregadas negativamente (X^-) (ânions orgânicos impermeáveis – principalmente proteínas e fosfatos) no interior da célula é compensada pela atividade da bomba de sódio potássio (AL HABORI, 2001; SARDINI et al., 2003; LANG et al., 2007).

A presença destas macromoléculas (cerca de 70% das proteínas) é responsável por atrair uma grande quantidade de cátions para o interior da célula. Estas cargas negativas atraem os cátions inorgânicos permeáveis à membrana (C^+) para o citosol, e o gradiente de concentração para os ânions inorgânicos permeáveis à membrana (A^-) também direciona os ânions para o citosol. Desta forma, estes cátions e ânions podem se distribuir entre o meio intra e extracelular de acordo com o Equilíbrio de Gibbs – Donnan (que estabelece que o produto das concentrações de íons difundíveis é igual nos dois lados da membrana) (**Equação 1**) e com a eletroneutralidade (estabelece que a soma das cargas positivas deve ser igual à soma das cargas negativas (**Equação 2**)).

$$[C^+]_{in} \times [A^-]_{in} = [C^+]_{ext} \times [A^-]_{ext} \quad (1)$$

$$[C^+]_{out} = [A^-]_{out} \quad (2)$$

Entretanto, a concentração intracelular dos íons inorgânicos precisa ser menor do que a concentração extracelular para contrabalancear o acúmulo celular de substâncias orgânicas. Para que essa entrada de água não cause alterações no volume celular, a célula precisa perder cátions para o meio extracelular. Essa extrusão de íons positivos ocorre através de transporte ativo (bombas) (STEIN, 2002; OKADA, 2004; HOFFMANN et al., 2009). O gradiente eletroquímico decorrente da distribuição assimétrica dos íons (Na^+/K^+) através da membrana é mantido, na maioria das células animais, principalmente pela bomba sódio potássio (Na^+/K^+ -ATPase), sendo este um dos transportadores mais importante na manutenção da homeostasia.

O gradiente eletroquímico estabelecido é fundamental em diversas funções celulares, como manutenção do volume celular, do balanço osmótico, na manutenção do potencial de repouso das membranas e pelas propriedades excitáveis das células musculares e nervosas. Além disso, o gradiente eletroquímico também fornece energia para facilitar o transporte de outros íons, tais como: H^+ , Ca^{2+} e Cl^- , bem como de substratos como glicose e aminoácidos e neurotransmissores (JORGENSEN, PEDERSEN, HOFFMAN, MILLS, 2001).

A bomba de Na^+/K^+ -ATPase é uma ATPase de transporte, sendo uma proteína heterodimérica constituída de uma subunidade α e uma subunidade β . A subunidade α é responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte da enzima e contém o sítio de ligação para a ouabaína, enquanto a subunidade β tem a função de ancorar o complexo na membrana (KAPLAN, 2002). Na inibição da bomba Na^+/K^+ -ATPase, eventualmente ocorre diminuição do K^+ intracelular e aumento do Na^+ . Essa diminuição do K^+ intracelular é seguida por despolarização, entrada de Cl^- e, assim inchaço celular (FRIEDRICH et al, 2006). Desta maneira, quando a ouabaína se liga a bomba Na^+/K^+ -ATPase, ocorre eventualmente um aumento do volume celular, o que demonstra a importância da regulação de volume em condições normotônicas (STEIN, 2002). Sob influência da ouabaína, hepatócitos e células renais corticais são aparentemente capazes de manter seu volume pelo acúmulo de eletrólitos em vesículas intracelulares que são subsequentemente excitadas. O acúmulo de eletrólitos é realizado pela H^+ -ATPase em paralelo aos canais de Cl^- (HOFFMAN et al., 2009)

Em células animais, são encontrados vários mecanismos fisiológicos envolvidos na regulação do volume. Estes mecanismos são altamente conservados e essencialmente semelhantes em células de diferentes tecidos (LANG et al., 1998). Eles têm sensores hipotéticos de volume, sistemas de sinalização intracelular acoplados a estes sensores, e transportadores de membrana mediando a liberação ou ingestão de compostos osmoticamente ativos para compensar o aumento ou diminuição do volume celular (STRANGE, 2004), buscando diminuir o impacto provocado pela entrada ou saída de água em excesso da célula. Já em condições anisomóticas, alterações de volume são induzidas por mudanças na osmolaridade extracelular. Sendo a maioria das células capazes de restaurar seu volume original quando confrontadas com aumento ou diminuição do volume (WEHNER et al., 2003; OKADA, 2004). Elas respondem às alterações de volume ativando transportadores específicos de membrana e/ou processos

metabólicos que servem para que as células retornem ao seu volume normal. Assim, canais e transportadores de membrana são rapidamente ativados para responder a essas mudanças de osmolaridade intra e extracelular possibilitando a passagem de osmólitos tanto inorgânicos (íons) quanto de pequenas moléculas orgânicas. Com a passagem de osmólitos, ocorre obrigatoriamente a passagem de água para dentro ou para fora da célula, regulando assim seu volume (MONGIN, ORLOV, 2001; WHENER et al., 2003). Os processos pelos quais as células “inchadas” ou “encolhidas” retornam ao seu volume inicial são denominados RVD (do inglês *Regulatory Volume decrease* – que significa “decréscimo regulatório do volume”) e RVI (do inglês *Regulatory Volume increase* – que significa “aumento regulatório do volume”), respectivamente (MONGIN, ORLOV, 2001; SARDINI et al., 2003; FRIEDRICH et al., 2006; PENDERSEN, KAPUS, HOFFMAN, 2011).

A ativação dos mecanismos de transporte é rápida e ocorre dentro de segundos a minutos após a perturbação do volume. A estimulação rápida de transporte de eletrólitos é possível porque os canais e transportadores, pelos quais estes eletrólitos passam, residem perenemente na membrana plasmática ou são estocados em vesículas citoplasmáticas (STRANGE, 2004).

Durante os mecanismos de resposta lenta, a adaptação em longo prazo durante condição hipoosmótica é mediada por uma diminuição do conteúdo de osmólitos orgânicos devido a uma diminuição da expressão de enzimas envolvidas na síntese e acúmulo de osmólitos. Já a adaptação à condição hiperosmótica é acompanhada por um aumento na expressão de transportadores de osmólitos orgânicos e enzimas envolvidas na síntese. Deve-se ter em mente que a exposição de células a um meio anisosmótico não modifica apenas o volume celular, mas também, o volume de organelas intracelulares, como as mitocôndrias (SAFIULINA et al., 2006).

Embora os seres humanos, disponham de mecanismos homeostáticos complexos para homeostasia do volume celular e composição do meio interno, desarranjos podem ocorrer. Condições como injúria cerebral, cardíaca e apoptose também são dependentes do volume celular. Por exemplo, em consequência de um trauma ou isquemia cerebral, a perda do controle do volume, seguido do aumento do volume da célula neuronal e aumento da pressão intracraniana, demonstra que a regulação precisa do volume é de suma importância não apenas para o bom funcionamento, mas também para sua sobrevivência (PAZANTES–MORALES et al., 2000).

Em cardiomiócitos, o inchaço celular ocorre durante isquemia aguda do miocárdio. Durante o período de isquemia, há um acúmulo intracelular de metabólitos (por exemplo, lactato). Excessivas mudanças de volume celular, no coração podem causar profundas alterações de integridade estrutural e constância do ambiente intracelular, que afetam muitas funções celulares e causam morte celular.

Muitas células, como visto anteriormente, não são expostas a alterações extracelulares, sendo a concentração intracelular comprometida pelo transporte e metabolismo celulares (LANG et al., 1998). Seus efeitos no metabolismo resultam na ativação, inibição ou alteração de enzimas. Por exemplo, este efeito é particularmente evidente no fígado, onde a quebra de proteínas em aminoácidos aumenta o conteúdo de partículas, e cria um gradiente favorável a entrada de água, aumentando assim o volume celular. Ao contrário, a síntese de proteínas cria um gradiente favorável a saída de água, diminuindo o volume celular (LANG et al., 2007).

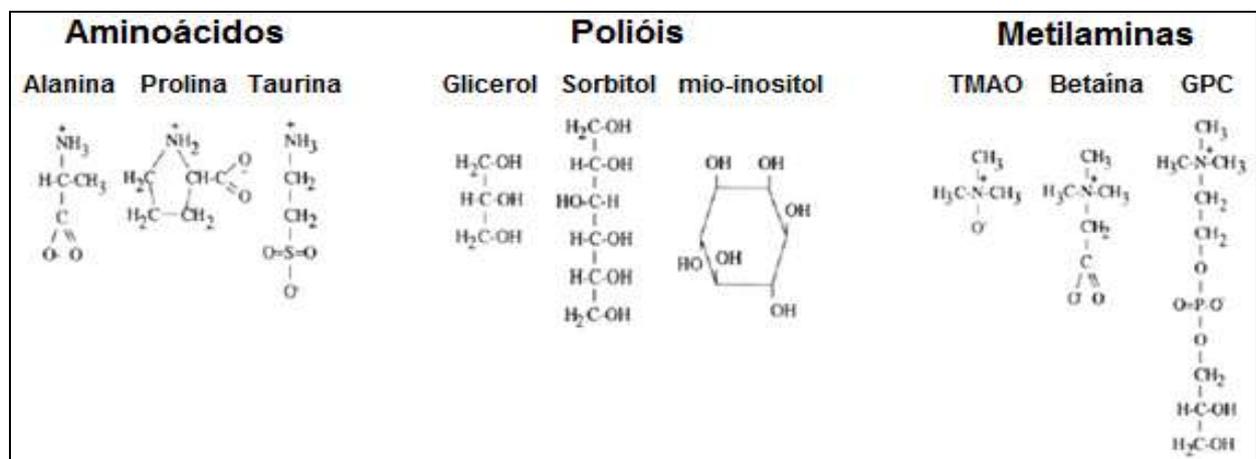
Alterações de volume influenciam diversas vias do metabolismo da glicose e aminoácidos. O inchaço celular inibe a glicólise, favorece a lipogênese, diminui a transcrição da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), uma enzima chave da gliconeogênese, diminuindo assim a concentração de metabólitos derivados dos carboidratos, enquanto que durante o encolhimento celular estes efeitos são revertidos (LANG et al., 1998). O restabelecimento do volume celular após alterações requer redistribuição dos osmólitos intracelulares, que incluem combinações de alguns íons inorgânicos e uma variedade de moléculas orgânicas (STRANGE, 2004).

Os íons inorgânicos constituem dois terços da liberação de osmólitos durante o RVD, sendo seu transporte através da membrana celular o meio mais rápido e eficiente para regulação do volume celular. Este mecanismo ocorre dentro de segundos a minutos após a perturbação do volume, no entanto, o uso dos íons na osmorregulação celular é limitado, uma vez que altas concentrações de íons inorgânicos interferem com a estabilidade de proteínas, e, além disso, os gradientes iônicos alterados através da membrana interferem com a função celular. Por exemplo, um aumento na atividade intracelular de Na^+ diminui o gradiente para sódio através da membrana celular, e assim diminui o fluxo de saída dos íons Ca^{2+} via trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ aumentando a concentração intracelular de Ca^{2+} . Com isso, para evitar alterações excessivas da concentração iônica intracelular, osmólitos orgânicos também participam da osmorregulação

(LANG et al., 1998, 2007; MONGIN, ORLOV, 2001; WHENER et al., 2003; YANCEY 2005; FRIEDRICH et al 2006; HOFFMAN et al., 2009).

Osmólitos orgânicos são solutos tipicamente encontrados em altas concentrações de dezenas a centenas de milimolares no citosol de todos os organismos, desde bactérias aos humanos. Esses solutos desempenham um papel importante na homeostase do volume celular, podendo também ter função citoprotetora. Em células animais, os principais osmólitos orgânicos (23-29%) são agrupados em três classes distintas: polióis (glicerol, sorbitol e mioinositol), metilaminas (óxido de trimetilamina (TMO), betaína e glicerofosforilcolina (GPC), assim como os aminoácidos e seus respectivos derivados (alanina, prolina e taurina) (FIGURA 3).

FIGURA 3. Classes dos principais osmólitos orgânicos.



Fonte: LANG et al., 2007. Exemplos dos principais osmólitos orgânicos. TMAO – óxido de trimetilamina; GPC - glicerolfosforilcolina

Outro aspecto é que diversos osmólitos orgânicos são eletroneutros e podem substituir osmólitos inorgânicos que, ao serem liberados através da membrana celular, podem alterar o potencial de membrana, e assim, a excitabilidade neuronal no cérebro, sendo particularmente interessante no sistema de recaptção de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) que são transportados pelo sistema de co-transporte acoplado ao Na^+ (WHENER et al. 2003).

O acúmulo intracelular de osmólitos orgânicos é um processo lento (requer horas a dias) quando comparado à absorção de eletrólitos e envolve principalmente dois processos: o primeiro representa absorção através da membrana celular por meio de sistemas de transporte específicos, e o segundo, a formação de osmólitos por reações metabólicas (WEHNER et al., 2003; FRIEDRICH et al., 2006). Os osmólitos orgânicos mio-inositol (inositol), betaína e taurina são acumulados por transportadores específicos acoplados ao sódio. O aumento da concentração

iônica estimula a transcrição do transportador, e assim, leva ao acúmulo de osmólitos orgânicos. Os osmólitos orgânicos sorbitol, inositol e betaína são rapidamente liberados por células inchadas (LANG et al., 1998).

Adicionalmente, a taurina, a concentração celular de outros aminoácidos e seus metabólitos (incluindo glutamina, glutamato, glicina, prolina, serina, treonina, beta alanina, aspartato e GABA) são modificados pelo volume celular. Embora a concentração intracelular da maioria dos aminoácidos individual seja extremamente baixa, a soma de todos os aminoácidos contribui significativamente para a osmolaridade celular nas células expostas ao fluido extracelular isotônico. Os aminoácidos são importantes durante adaptação de pequenas alterações de osmolaridade extracelular. Sua contribuição, contudo, é desprezada para a adaptação a mudanças excessivas de osmolaridade, como por exemplo, na medula renal. Além dos aminoácidos, numerosos metabólitos orgânicos contribuem para a osmolaridade celular. Da mesma forma, as células apresentam alterações osmóticas e de volume quando há secreção, absorção de nutrientes, ou ainda, quando estão entrando na fase S do ciclo celular, momento no qual seu volume encontra-se bastante aumentado (OKADA et al 2004; HABELA, SONTHEIMER, 2007).

3.3 O movimento de água na célula

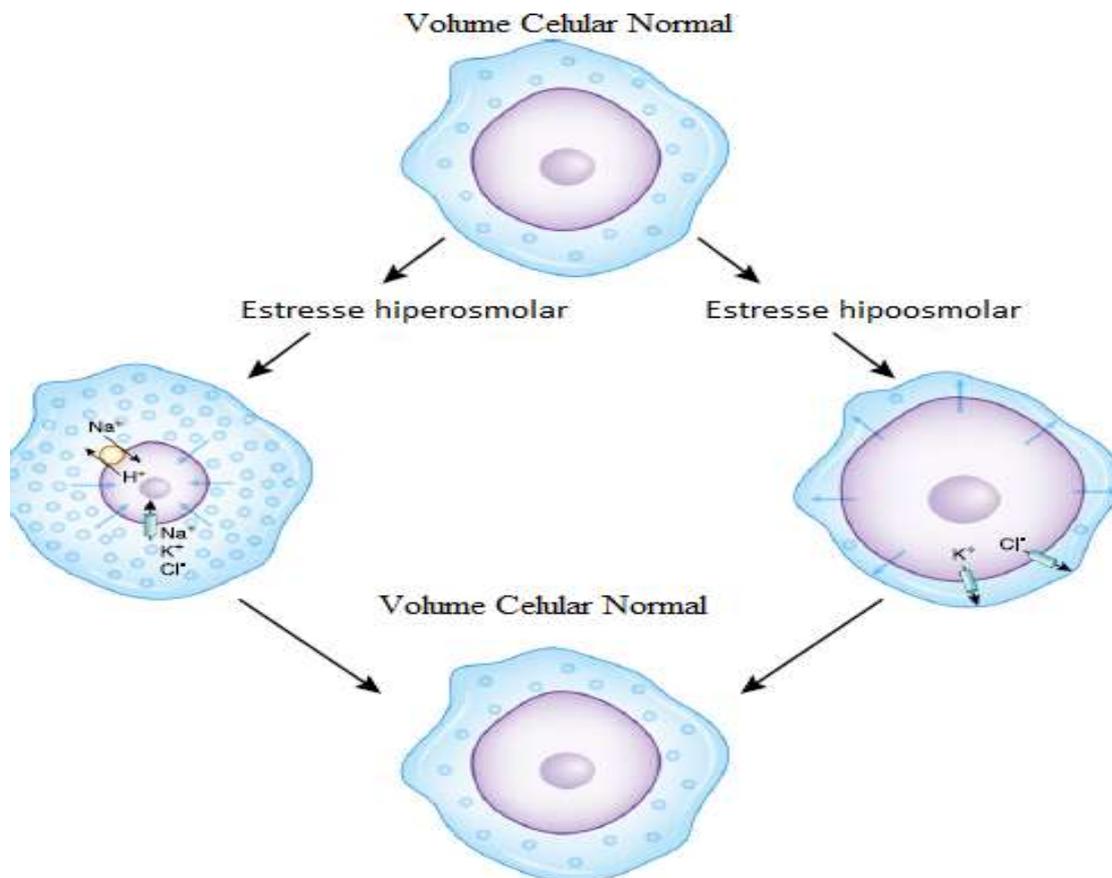
A vida na terra teve sua origem nos oceanos primitivos e este legado tem uma marca profunda em todas as formas de vida contemporânea (WEISS, 1996). A proporção de água corresponde a cerca de 60-90% da massa de plantas e animais, e os organismos vivos absorvem e excretam grande quantidade de água por dia. Deste modo, a água é o componente mais abundante nas células e tecidos humanos, sendo indispensável à vida (WEISS, 1996; AGRE, KOZONO, 2003).

Uma vez que mais da metade da quantidade de água, cerca de 2/3 do fluido corporal é encontrada no espaço intracelular, a estabilidade do peso de um organismo requer que o conteúdo de água seja devidamente regulado (WEISS, 1996; DANZIGER, ZEIDEL, 2014).

A regulação exata do conteúdo de água celular é requerida para manter as concentrações fisiológicas dos constituintes citoplasmáticos. A água é distribuída entre os compartimentos intra e extracelular, onde a entrada de água em excesso nas células leva ao inchaço celular. Por outro lado, a perda de água, sob condições de desidratação provoca encolhimento celular (WHENER

et al., 2003; FRIEDRICH et al., 2006; LANG et al., 2007; DANZIGER, ZEIDEL, 2014) (FIGURA 4).

FIGURA 4 - Mecanismos de regulação do volume celular.



Fonte: DANZIGER, ZEIDEL, 2014. As células regulam seu ambiente interno em resposta ao estresse osmótico através da ativação de proteínas carreadoras e canais iônicos. Nesta figura, uma célula normal é colocada tanto num ambiente hiperosmolar (esquerda) ou hipoosmolar (direita). No cenário de estresse hiperosmolar, onde ocorre encolhimento da célula devido a saída de água, as células respondem rapidamente com acúmulo de Na^+ , K^+ e Cl^- seguido de produção intracelular de solutos orgânicos. O aumento do conteúdo intracelular direciona a entrada de água para normalizar as concentrações dos dois lados da célula, restaurando assim o tamanho celular. Na configuração de inchaço induzido por condição hipoosmolar, a ativação de canais de K^+ e canais de Cl^- , bem como do co-transportador KCC leva a saída de soluto e consequente perda de água, restaurando assim o volume celular.

Com poucas exceções, as membranas das células animais são altamente permeáveis à água. Nos organismos, o fluxo de água está submetido a dois tipos de forças: pressão hidrostática e osmótica. Contudo, em células de mamíferos, o gradiente de pressão hidrostática é insignificativamente baixo. Essas membranas não suportam grandes variações de pressão

hidrostática e o movimento de água deve-se, em grande parte, ao gradiente osmótico (PAZANTES – MORALES et al., 2007; FRIEDRICH et al., 2006; STRANGE, 2004). Portanto, qualquer desequilíbrio entre as concentrações intra e extracelular é compensado por um movimento de água através das membranas celulares, na direção necessária para alcançar o equilíbrio osmótico, o que ocasiona subseqüentes alterações de volume (PASANTES-MORALES et al., 2006).

O fluxo de água através da maioria das membranas celulares ocorre por difusão simples das moléculas de água através de uma bicamada lipídica. Contudo, algumas células possuem proteínas especializadas que formam poros seletivos à passagem de água, chamadas de aquaporinas aumentando drasticamente a permeabilidade à água através das membranas celulares (FÜRST et al., 2002; AGRE, KOZONO, 2003; STRANGE, 2004). A permeabilidade da membrana plasmática para a água é alta (1µm/s), contudo, o transporte de água por meio das aquaporinas aumenta a permeabilidade da membrana podendo atingir cerca de 100 µm/s (AGRE, KOZONO, 2003; OKADA, 2004).

A difusão é definida como o movimento contínuo de moléculas em um fluido, que ocorre em função da presença de um gradiente de concentração e é regida pela primeira Lei de Fick. Quando há um gradiente de concentração de água (ou outro solvente) entre duas regiões separadas por uma membrana semipermeável, como é o caso da membrana plasmática, ocorre a osmose, um caso especial da difusão. Quando o fluxo causado pela osmose ocorre em uma membrana semipermeável ideal, ou seja, uma membrana permeável apenas ao solvente, esse fluxo pode ser expresso por:

$$J = L_p (\Delta P - \Delta \pi) \quad (3)$$

Onde J representa o fluxo resultante da água, L_p é chamado de condutividade hidráulica da membrana e corresponde à permeabilidade da membrana à água, ΔP é a diferença entre as pressões hidrostáticas dos dois lados da membrana e $\Delta \pi$ é a diferença entre as pressões osmóticas das duas soluções (LANG et al., 1998). A constante L_p depende basicamente da presença de aquaporinas inseridas na membrana celular (STRANGE, 2004).

O fluxo de água através das membranas (J) é regulado em grande parte por meio do gradiente de pressão osmótica ($\Delta \pi$), que equivale à pressão hidrostática necessária para impedir

o transporte do solvente através da membrana, e sob condição de equilíbrio, é definida através da expressão matemática de Boyle Van't Hoff:

$$\Delta\pi = RT\Delta C_i \quad (4)$$

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

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

$$\text{Osmolaridade} = C_i \phi_i \quad (5)$$

Onde, C indica a concentração molar do soluto, ϕ indica o coeficiente osmótico e i indica o número de partículas osmoticamente ativas de soluto. O coeficiente osmótico é um fator inerente a cada soluto, e é introduzido para corrigir desvios de osmolaridade causados por interações específicas da molécula dissolvida, e é desprezado muitas vezes por questões práticas (WEISS, 1996).

A aplicação dessas equações supõe que o citosol se comporte como uma solução diluída, obedecendo a equação de estado de um gás ideal. Entretanto, as membranas biológicas não exibem esse comportamento ideal, permitindo também a passagem de soluto (LANG et al, 1998).

Para explicar o comportamento não ideal de membranas, STAVERMAN, em 1951, definiu o termo coeficiente de reflexão para o soluto i , σ_i , que é a razão entre a pressão osmótica experimental (π) e a pressão osmótica teórica (π_t) obtida através da equação 2.

$$\sigma_i = \pi_e / \pi_t \quad (6)$$

O coeficiente de reflexão é um termo adimensional que varia de 1 para o soluto que se comporta como se fosse efetivamente impermeável (ou seja, o soluto é “refletido” pela

membrana) para 0, no caso de um soluto cuja permeabilidade seja igual à da água (STRANGE, 2004; WEISS, 1996). O gradiente de pressão osmótica efetiva ($\Delta\pi_e$) através da membrana gerada pelo soluto i:

$$\Delta\pi_e = RT \sum \sigma_i \Delta C_i \quad (7)$$

$\Delta\pi$ depende da diferença de concentração através da membrana (ΔC) e coeficiente de reflexão (σ_i) para cada soluto (i).

O fluxo efetivo que ocorre em membranas não ideais pode ser representado pela seguinte equação:

$$J = L_p \Delta P - \sigma RT \Delta C_i \quad (8)$$

onde σ é chamado de coeficiente de reflexão, indicando a razão entre a pressão osmótica quando a membrana é permeável tanto para o soluto quanto para o solvente e a pressão osmótica caso a membrana fosse permeável apenas para o solvente. ΔC_i equivale à diferença de concentração do soluto entre os compartimentos, R é a constante universal dos gases perfeitos, e T representa a temperatura (JANÁČEK, SIGLER, 2000).

A osmolaridade do meio extracelular nos animais apresenta variações controladas, porém mudanças significativas na osmolaridade plasmática estão associadas com uma variedade de estados patológicos (DANZIGER, ZEIDEL; 2014; HOFFMAN, PENDERSON, KAPUS, HOFFMAN, 2011; OKADA, 2004; WHENER, 2003; MOGIN, ORLOV, 2001). A osmolaridade do meio intracelular é aproximadamente 300 mOsm em células de mamíferos (PENDERSON, KAPUS, HOFFMAN, 2011; OKADA, 2004). Para prevenir a ruptura pela pressão osmótica, células animais possuem normalmente pequenos dobramentos ou invaginações na membrana plasmática, incluindo microvilosidades que se desfazem após aumento do volume celular de forma a não aumentar significativamente a tensão na membrana. O excesso de água dentro da célula pode causar um aumento de volume que ultrapasse a capacidade elástica da membrana, o que pode levar ao seu rompimento e morte celular (OKADA, 2004).

Quando a osmolaridade extracelular é maior que a intracelular, ocorre um fluxo de água para fora seguindo seu gradiente osmótico e a célula se rompe em um processo chamado plasmólise, ao contrário, quando a osmolaridade intracelular é maior que a extracelular, ocorre

um fluxo de água para dentro e a célula incha num fenômeno conhecido como turgescência (LANG et al., 2007). Em ambas as situações, ocorre alterações do volume celular que podem ser obtidas em função da pressão osmótica através da equação 7, por substituição de C_i por $\sigma_i Q_i/V$ na equação 2.

$$\pi = RT \sum \sigma_i Q_i / V \quad (9)$$

Onde Q_i representa o número de moles da molécula i vezes o número de partículas osmoticamente ativas por molécula do soluto (como visto na equação 2) e V representa o volume.

Quando a célula é submetida a uma pressão osmótica inicial π_0 e em seguida é transferida para um meio de pressão osmótica π , onde a osmolaridade intracelular e temperatura não se alteram, ou seja, o valor de $RT \sum \sigma_i Q_i$ não se modifica, temos que:

$$\pi V = \pi_0 v_0 \quad (10)$$

Porém, para células vivas, como existem espaços na membrana que são inacessíveis para a água, onde o volume inativo é representado então por b na equação: (OKADA, 2004; HOFFMANN et al., 2009).

$$\pi (V - b) = \pi_0 (v_0 - b) \quad (11)$$

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

Em células que apresentam pouca regulação de volume e uma membrana bastante permeável à água, essa relação foi verificada experimentalmente com sucesso: As células expostas a 50% da osmolaridade isotônica apresentam um aumento de volume de cerca de duas vezes o volume inicial, se comportando nesse momento como o previsto teoricamente pela relação de Van't Hoff (MORISHIMA et al., 2000). Dessa forma, as células apresentam um comportamento semelhante ao de um osmômetro ideal, quando há alterações na osmolaridade, a célula apresenta uma mudança de volume devido à entrada ou saída de água, que varia proporcionalmente a essas alterações (WEISS, 1996; WHENER et al., 2003).

Existem dois tipos de alterações de volume que ativa os mecanismos osmorregulatórios; mudanças de volume anisomóticas que são aquelas provocadas por alterações na osmolaridade extracelular, enquanto que mudanças isoosmóticas são causadas por alterações no conteúdo intracelular (LANG et al., 2007). Assim sendo, células animais possuem mecanismos fisiológicos pelos quais elas sentem as mudanças no volume celular e regulam seu volume diminuindo o impacto provocado pela entrada ou saída de água em excesso nas células.

3.4 Mecanismos sensores de volume celular

As células podem fazer uso de mais de um dos mecanismos de transporte descritos e serem aptas a regular seus volumes mesmo se um dos sistemas de transporte envolvido na regulação de volume estiver inibido ou bloqueado (LANG et al., 1998). Assim, as respostas de redução regulatória de volume envolvem três componentes celulares: i) um sensor de volume que detecta mudanças no volume celular e traduz estas mudanças em sinais extracelulares; ii) um mecanismo efetor que causa a perda de osmólitos e água, corrigindo as alterações de volume; e iii) um sinal ou segundo mensageiro que une o sensor ao efetor (HALLOWS, KNAUF, 1994).

As questões de como as células “detectam” as variações de volume e de como os sinais são amplificados e transmitidos aos efetores têm sido alvo de muitos estudos. Por exemplo, foi demonstrado em túbulo proximal renal, que as células podem detectar e responder a mudanças de volume menores que 3% (LOHR, GRANTHAM, 1986). No entanto, nossa compreensão acerca dos mecanismos regulatórios pelos quais as células detectam essas variações de volume e traduzem estes sinais em respostas regulatórias ainda é pouco explorado. Obviamente, a identificação destes mecanismos é extremamente relevante para a descrição do fenômeno de regulação de volume. Os elementos sensores, efetores e sinalizadores nesse sistema de retroalimentação não têm necessariamente, funções exclusivas; ao contrário, muitas vezes interagem para produzir uma resposta de regulação de volume integrada. Canais ativados por estiramento, por exemplo, têm características dos três componentes. Dentre os sensores de volume, destacam-se: o citoesqueleto, pois mudanças decorrentes da exposição a ambientes osmoticamente variados podem afetar a arquitetura do citoesqueleto (KUANG et al., 2006); canais ativados pelo estiramento da membrana (WANG, MCCRUDDEN et al., 2004);

concentração de macromoléculas intracelulares (AL-HABORI, 2001) e pH intracelular (ORLOV, HAMET, 2006).

A capacidade de regulação de volume envolve uma grande diversidade de sistemas de transporte iônico na membrana celular. Assim, os mecanismos efetores são, basicamente, sistemas dependentes de proteínas transmembranares e incluem transporte ativo (ATPases) e transporte passivo (canais iônicos e carregadores). Finalmente, quanto aos sinais que comunicam o sensor ao efetor, temos que alguns sinalizadores celulares também estão relacionados à transmissão e amplificação dos primeiros sinais de alteração de volume, tais como os fosfoinositídeos, quinases e fosfatases, AMPc, proteína G e cálcio intracelular (BERRIDGE et al., 2000).

A própria composição lipídica da membrana altera a atividade dos transportadores envolvidos na regulação de volume. A ativação de canais pode ocorrer através do estiramento da membrana, ou de alterações na sua curvatura. O aumento do volume celular pode provocar estiramento da membrana e/ou citoesqueleto, que podem semelhantemente funcionar como sensores de volume (PEDERSEN, HOFFMAN, MILLS et al., 2001). Estes sensores ativam uma série de vias de sinalização celular, que pode variar consideravelmente entre os diversos tipos de células ou mesmo em uma célula nos seus diferentes estados funcionais (HOFFMAN et al., 2009).

O citoesqueleto desempenha importante papel na regulação do volume, com participação dos microtúbulos de actina (PEDERSEN, HOFFMAN, MILLS et al., 2001). A actina interfere na entrada e saída de água na célula, retardando alterações de volume. Porém, durante o inchaço celular ocorre despolimerização dos filamentos de actina em diversos tipos celulares. A interferência da citocalasina B no citoesqueleto impede que o RVD ocorra em alguns tipos celulares e a colchicina, que interfere no arranjo dos microtubulos, também impede que o RVD ocorra em células de Jurkat, HIL-60 e neutrófilos (LANG et al., 1998; OKADA et al., 2004).

Alterações do volume celular envolvem algumas cascatas de sinalização e modifica a fosforilação de uma variedade de proteínas, na qual as quinases (tirosina quinase, MAP quinases, as JNK (c-Jun N-terminal quinase)/SAPK (proteína quinase ativadas por estresse), quinase de adesão focal (p121) e p38 desempenham papel fundamental durante inchaço celular (ALEXANDER, GRINSTEIN, 2006). Numerosas vias de transdução de sinal têm sido implicadas no controle das vias de transportes reguladores do volume, incluindo alterações na

concentração de Ca^{2+} intracelular, atividade GTPase, fosforilação/desfosforilação de proteínas serina/treonina e tirosina e também os níveis de eicosanoides (LANG et al., 1998).

Os eicosanoides, por sua vez, estimulam os canais iônicos (K^+ e Cl^-) reguladores do volume e/ou efluxo de taurina. Também inibe a formação de PGE2 e assim previne os canais de Na^+ sensíveis a PGE2. Integrinas também são responsáveis por sinalizar estímulos mecânicos o que as torna candidatas ao papel de sensor. O inchaço celular alcaliniza os compartimentos celulares tais como endossomos, lisossomos e grânulos secretores, que por sua vez, inibe a proteólise autofágica (LANG et al., 2007).

Apesar do crescente esforço em entender as vias de sinalização e ativação dos mecanismos responsáveis pela regulação de volume, muito ainda precisa ser esclarecido sobre os mecanismos sensores envolvidos na regulação do volume celular.

Em diversas funções celulares, nota-se que as células ativam os mecanismos regulatórios do volume (RVD ou RVI) diante de perturbações osmóticas, que serão abordados na sessão a seguir, sendo o RVD descrito de maneira mais detalhada, uma vez que é objetivo deste trabalho.

3.5 Mecanismos Reguladores do Volume celular

O volume celular pode ser mantido tanto pelo ganho ou perda de solutos osmoticamente ativos, principalmente íons inorgânicos como Na^+ , K^+ , Cl^- ou pequenas moléculas orgânicas, chamadas osmólitos orgânicos. Durante a regulação do volume, a perda ou ganho de eletrólitos são mediados principalmente através de canais e transportadores de membrana (JANACEK, SINGLER, 2000; FRIEDRICH, 2006; LAMBERT, 2008).

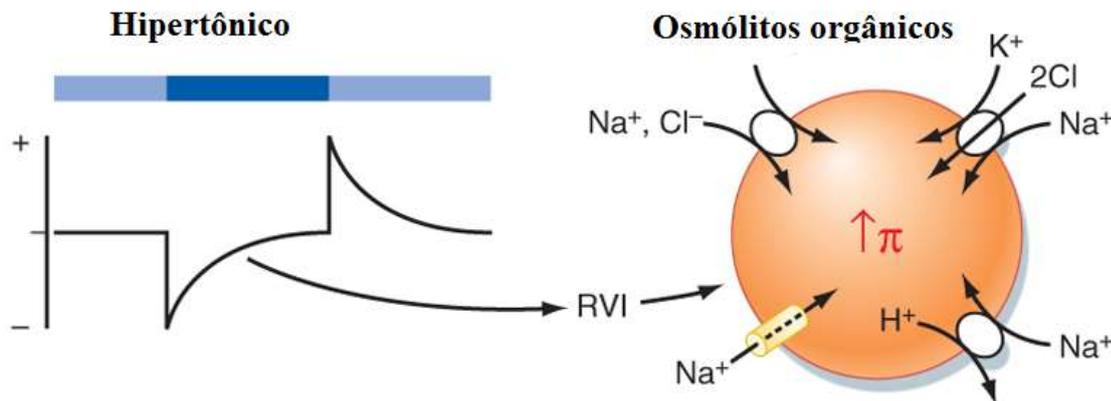
3.5.1 Aumento Regulatório do Volume

A exposição das células ao meio hipertônico ou perda de osmólitos da célula leva à saída de água a favor do seu gradiente osmótico resultando no encolhimento celular. O mecanismo de RVI é acompanhado pela captação de íons, o que se deve fundamentalmente ao aumento da permeabilidade da membrana a entrada de cloreto e sódio nas células (SHIMIZU et al., 2006).

Em células murchas, a RVI envolve ativação do co-transportador $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ (NKCC) e/ou do trocador catiônico $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (NHE) (**FIGURA 5**). O trocador NHE é funcionalmente acoplado ao trocador aniônico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (*do inglês*: anion exchanger AE) que por si só é

insensível a variações de volume celular (LANG et al., 1998; OKADA, 2004; HOFFMAN et al., 2009). O H^+ e HCO_3^- extruído pelos co-transportadores NHE e AE, respectivamente, são absorvidos pela célula na forma de CO_2 via ácido carbônico H_2CO_3 . O trabalho em conjunto dos dois co-transportadores acumula NaCl dentro da célula. Um outro transporte relevante para o RVI é originado da Na^+-K^+ -ATPase. Essa ATPase é ativada de modo compensatório devido ao aumento da permeabilidade ao sódio. Ela atua, portanto, diretamente na manutenção da concentração intracelular de Na^+ e, indiretamente, na manutenção dos gradientes intracelulares de Cl^- e K^+ através da extrusão de Na^+ em troca de K^+ (LANG et al., 2007).

FIGURA 5 Ilustração esquemática dos mecanismos de transporte envolvidos na RVI



Fonte: Extraída de BERNE, LEVY Physiology, 6ª edição. 2008. Durante a RVI NaCl e osmólitos orgânicos entram na célula, ativa o funcionamento da ATPase Na^+-K^+ e assim o conteúdo NaCl na célula é aumentado. O aumento da concentração celular NaCl e osmólitos orgânicos aumenta a pressão osmótica intracelular e movimentam água para dentro da célula, fazendo com que a célula retorne ao volume próximo do original.

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

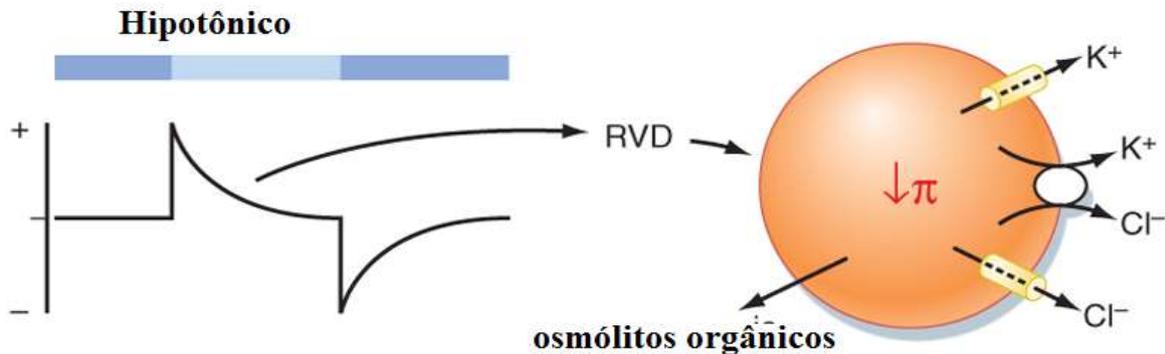
contribuem para o RVI. Os canais de Na^+ contribuem para o RVI por mediar diretamente a entrada de sódio e indiretamente estimular a entrada de Cl^- causando despolarização da membrana (WHENER et al., 2003).

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

3.5.2 Diminuição Regulatória do Volume

A exposição das células ao meio hipotônico ou ganho de osmólitos da célula leva à entrada de água a favor do seu gradiente osmótico e assim ao inchaço celular. A diminuição regulatória do volume (RVD) é o processo responsável pela recuperação do volume celular em meios hipotônicos. O tempo necessário para ativar completamente o RVD e recuperar seu volume celular varia entre os diferentes tipos celulares. Por exemplo, em células do cérebro, o RVD ocorre rapidamente com 70-80% de recuperação alcançada dentro de poucos minutos, como resultado da ativação do efluxo de solutos (PASANTES-MORALES et al., 2002).

Na maioria dos tipos de células estudadas, a RVD requer a liberação de íons através da atividade concomitante de canais de K^+ e Cl^- (SARDINI et al., 2003; FRIEDRICH et al., 2006; WEHNER, 2006; HOFFMANN et al., 2009). Os canais iônicos que participam da regulação do volume celular incluem os canais $\text{Kv}1.3$, $\text{Kv}1.4$ e KCNE1/KCNQ1 e os canais aniônicos CLC-2 e CLC-3 , BRI-VDAC , Icn e glicoproteína-P (MDR) (LANG et al., 1998; MINDELL, MADUKE, 2001, SARDINI et al., 2003; WHENER, 2003). A RVD também pode ser realizada através de carreadores. Há três tipos de transportadores envolvidos: O trocador de ânions $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE), o trocador de cátions K^+/H^+ (KHE) e o co-transportador de K^+/Cl^- (KCC) sendo o carreador mais frequentemente utilizado (ADRAGNA et al., 2004). Em adição, o co-transportador Na^+ (HCO_3^-) também pode participar do mecanismo de RVD. A **FIGURA 6** ilustra os mecanismos de diminuição regulatória do volume celular (RVD), bem como os principais sistemas de transporte iônico envolvidos.

FIGURA 6 Ilustração esquemática dos mecanismos de transporte envolvidos na RVD

Fonte: Extraída de BERNE, LEVY Physiology, 6ª edição 2008. Quando as células são expostas ao meio hipotônico, elas incham e sofrem o mecanismo de diminuição regulatória do volume (RVD). O mecanismo de RVD envolve perda de KCl e osmólitos orgânicos da célula. A redução de KCl intracelular e osmólitos orgânicos diminuem a pressão osmótica intracelular, com saída de água da célula e retorno ao volume próximo do original. Além do transporte iônico, o transporte de pequenas moléculas orgânicas também está envolvido no RVD. O inchaço celular estimula a rápida saída de glicerolfosforilcolina, sorbitol, inositol, betaína e taurina (WEHNER et al., 2003). Os mecanismos mediadores da liberação de osmólitos orgânicos ainda não são bem compreendidos, mas podem envolver diversos transportadores e/ou canais concomitantemente (LANG et al., 2007).

Diante disto, abordaremos de maneira mais detalhada os canais (catiônicos e aniônicos) e transportadores iônicos envolvidos no mecanismo de RVD.

3.5.2.1 Mecanismos de transporte iônico envolvidos no RVD

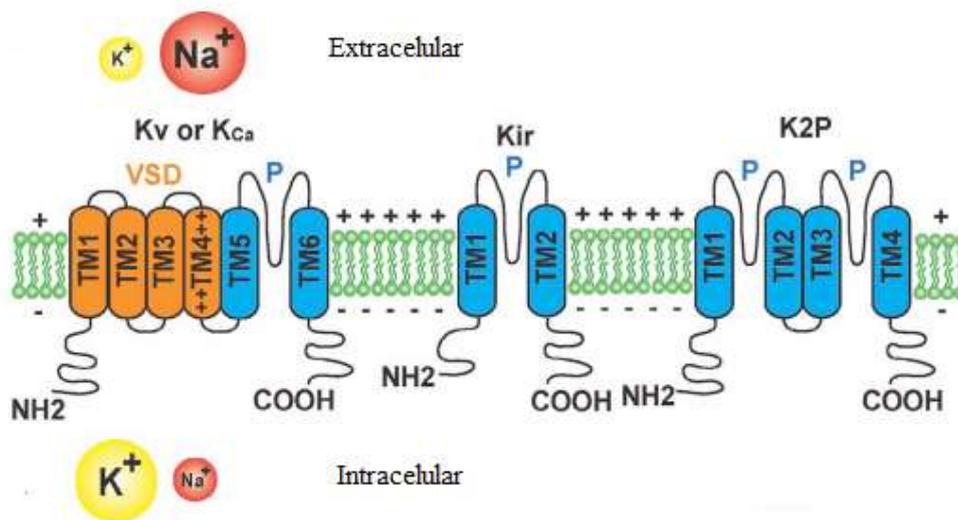
A) Canais catiônicos

Os canais de potássio representam a maior e mais complexa família de canais iônicos. O primeiro gene de canal de potássio clonado foi o canal dependente de voltagem *shaker* da mosca *Drosophila megalonaster*.

Os canais de potássio desempenham papel importante na manutenção do potencial de membrana e, em células eletricamente ativas, neurônios e células musculares, repolarizam a membrana plasmática logo após o potencial de ação (WICKENDEN, 2002). Assim, eles desempenham uma variedade de funções fisiológicas, incluindo a regulação da frequência cardíaca, contração muscular, excitabilidade neuronal e liberação de neurotransmissores. Também participam da secreção de insulina, na regulação do volume celular, resposta imune e proliferação celular (SANDHIYA, DKHAR, 2009; WICKENDEN, 2002; HILLE, 2001).

Os canais de potássio são agrupados em famílias baseados na sua estrutura, bem como em critérios fisiológicos e farmacológicos. Os canais de K^+ podem ser divididos primariamente com base no número de segmentos transmembranares (6TM, 2TM e 4 TM) e mecanismo de ativação (**FIGURA 7**) (SHIEH et al., 2000; CHOE, 2002; JENKINSON, 2006; SANDHIYA, DKHAR, 2009; HUANG, JAN, 2014).

FIGURA 7 - Representação esquemática da topologia dos canais de potássio.



Fonte: Retirada de HUANG, JAN., 2014. Canais de potássio dependentes de voltagem (Kv) e ativados por cálcio (Kca) pertencem a família de canais 6TM/P. Os quatro primeiros segmentos transmembranares (TM1-TM4) formam o sensor de voltagem, enquanto o restante do domínio transmembranar (TM5-TM6) corresponde a região conservadora do canal. O canal de potássio de retificação interna (Kir) pertence a família 2TM/P no qual possui dois domínios transmembranares com uma alça formadora de poro (P) entre eles. O canal de potássio K2P também chamado canal de potássio de vazamento ou de repouso é composto de quatro domínios transmembranares (4TMs) e duas regiões formadoras de poros.

1. Canais de K^+ com 6TMs - Cada canal contém quatro subunidades. Cada subunidade contém de seis a sete segmentos transmembranares e uma alça formadora de poro (P) entre os dois últimos segmentos. Incluem os canais ativados por voltagem (Kv, KCNQ, EAG) e ativados por cálcio (Kca).

Os canais de potássio dependentes de voltagem (Kv) são codificados por cerca de 40 genes em humanos e representam a maior família de canais de potássio ativados por mudanças no potencial de membrana (GUTMAN et al., 2005; HUANG, JAN, 2014).

A literatura revela a participação de 12 subfamílias (Kv1- Kv12). Estas subfamílias são divididas de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos (SZABO, ZORATTI, GULBINS, 2010; GUTMAN et al., 2005). As últimas 3 subfamílias funcionais (Kv10 ou ether-a-go-go; Kv11 ou Eag-related-gene e Kv12 ou eag-like) são conhecidas simplesmente como subfamília Eag, com isoformas encontradas principalmente no sistema nervoso central. Tais isoformas, são pouco elucidadas, exceto a isoforma Kv10.1 ou EAG1 que tem sido relacionada com processos oncogênicos (GUTMAN et al., 2005).

Os canais de Kv atuam em resposta a despolarização e repolarização da membrana. Durante o potencial de repouso encontram-se na conformação fechada. Aumentam sua atividade em estados de despolarização e permitem o efluxo de potássio (WANG et al., 2006). Estão presentes tanto em células excitáveis (cérebro, coração e músculo) quanto em células não excitáveis, tais como: rins, pulmão, ilhotas pancreáticas, sistema imune, tecido adiposo e células epiteliais onde funcionam na regulação do “feedback” do potencial de membrana plasmático e, assim, têm impacto em diversos processos fisiológicos que variam desde secreção até proliferação celular. Mutações e disfunções dos canais Kv estão relacionadas a diversas doenças tais como epilepsia, paralisia e arritmia (SZABO, ZORATTI, GULBINS, 2010).

Os canais de potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}) respondem a alterações da concentração de Ca^{2+} intracelular regulando o potencial de membrana. Estes canais previnem indiretamente a entrada excessiva de Ca^{+2} e estão envolvidos no relaxamento muscular e liberação de neurotransmissores, entre outros eventos (WICKENDEN, 2002). Os canais K_{Ca} são amplamente expressos na maioria dos tecidos e desempenham papel fundamental na regulação de processos fisiológicos, tais como sinalização neuronal, tônus do músculo liso, secreção hormonal e formação do potencial de ação (HOU et al. 2009).

Já os canais K_{Ca} , de acordo com as propriedades de condutância do canal unitário, podem ser divididos em três subfamílias: canais de alta condutância (100-300 pS - BKCa) também chamados de canais Maxi K ou BK, de condutância intermediária (25-100 pS – IKCa ou IK) e de baixa condutância (2-25 pS – SKCa ou SK) (HILLE, 2001; LEDOUX, 2006; FÉLÉTOU, 2009). Eles diferem não apenas no seu valor de condutância, mas também na dependência de voltagem, sensibilidade ao cálcio e farmacologia (LEDOUX, 2006).

2. **Canais de K⁺ com 2TMs** - Esta família também conhecida como canal de potássio de retificação interna (K_{ir} - inward rectifier) - possuem subunidades com dois segmentos transmembranares (M1 e M2) e entre eles há uma alça altamente conservada formadora de poro que mergulha na membrana pelo lado externo. As regiões carboxi- e amino-terminais estão no lado intracelular da membrana. Cada canal possui quatro subunidades formadoras de poro e podem interagir com outras proteínas de membrana. Estes canais estão presentes no músculo cardíaco e são ativados pela hiperpolarização da membrana, pois conduzem corrente de K⁺ para o interior da célula muito mais prontamente do que para o exterior (SANDHIYA, DKHAR, 2009; HIBINO et al., 2010; HUANG, JAN, 2014). Assim como os canais de potássio dependentes de voltagem, estes canais se organizam como tetrâmeros, embora um arranjo octamérico tenha sido descrito no caso dos canais de potássio sensíveis a ATP (Kir6.2/SUR) (SANDHIYA, DKHAR, 2009; HIBINO et al., 2010).

Os canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) formam um grande complexo macromolecular no qual quatro subunidades de canais de potássio de retificação interna (Kir6.x) formam um poro central, rodeados por quatro subunidades do receptor sulfoniuréia (SUR) (MIKHAILOV et al 2005; SANDHIYA, DKHAR, 2009; HIBINO et al., 2010). Kir6.x se apresenta em duas isoformas, Kir6.1 e Kir6.2. Existem três isoformas do receptor SUR: SUR2A, encontrada no coração e no músculo esquelético; SUR2B, encontrado no músculo liso e neurônios; SUR1, amplamente expresso em células neuroendócrinas (incluindo células β pancreáticas) e neurônios e faz parte da superfamília ABC (ligadas ao trifosfato de adenosina cíclico – ATP) (McTAGGART et al., 2010).

Estudos farmacológicos e fisiológicos sugerem que combinações de diferentes subunidades SURx e Kir6.x (**TABELA 2**) formam diferentes tipos de canais K_{ATP}, conferindo características específicas de cada tecido, que podem ser responsáveis em parte pela diversidade molecular e funcional dos canais (SANDHIYA, DKHAR, 2009; HIBINO et al., 2010).

TABELA 2. Distribuição tecidual de diferentes subunidades dos canais de K_{ATP}

Subunidades	Localização
Kir6.2/SUR1	Células β pancreáticas
Kir6.2/SUR2A	Coração e músculo esquelético
Kir6.2/SUR2B	Músculo liso
Kir6.1/SUR2B	Músculo vascular liso

Fonte: Adaptado de SANDHIYA & DKHAR, 2009.

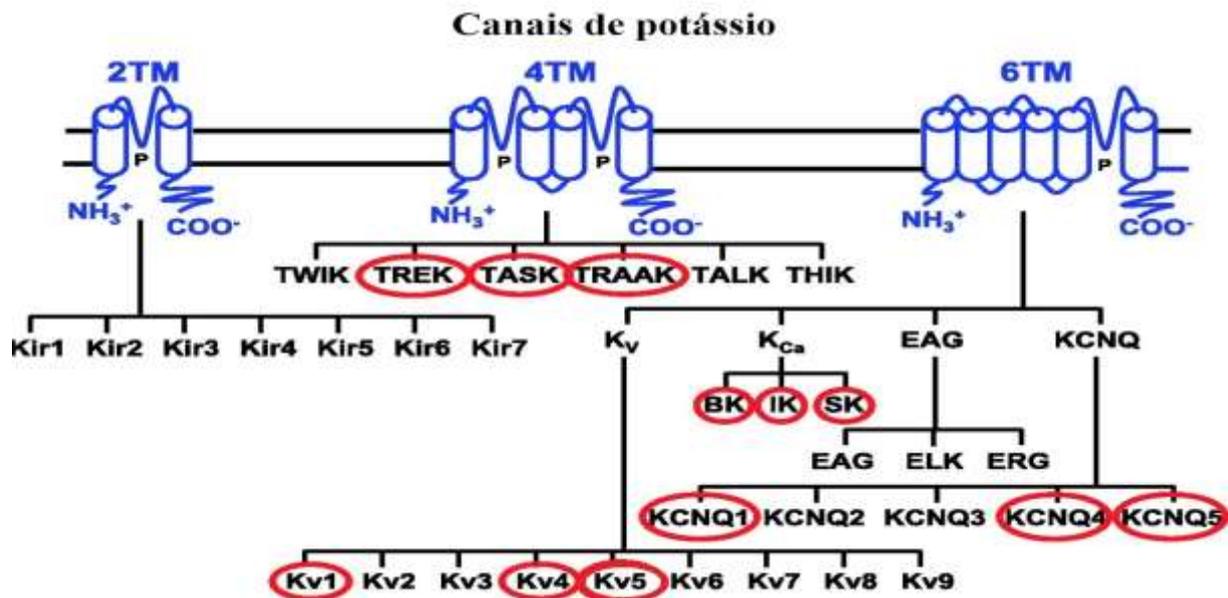
Fisiologicamente, os canais K_{ATP} funcionam como um sensor metabólico, acoplando o metabolismo celular com a atividade elétrica através da regulação do fluxo de potássio em uma ampla gama de tecidos (ASHCROFT et al., 2005; McTAGGART et al., 2010), incluindo coração, células β pancreáticas, músculo esquelético, músculo liso, cérebro, glândula pituitária e rim (HIBINO et al., 2010, McTAGGART et al., 2010). Esses canais também estão relacionados a eventos celulares como secreção de insulina nas células β pancreáticas, proteção contra eventos isquêmicos no coração e cérebro, além de estarem envolvidos na regulação do tônus venoso (ASCROFT, 2005; TERAMOTO, 2006).

3. Canais de K^+ com 4TMs - incluem os canais de potássio com domínios de dois poros (K2P) - cada subunidade contém quatro segmentos transmembranares e duas alças formadoras de poros (P1 e P2). Também conhecidos por canais de vazamento (leak) ou canais de repouso, são responsáveis pela alta permeabilidade da membrana plasmática aos íons K^+ e são responsáveis pela manutenção de um potencial de membrana negativo. Estão presentes em todas as células excitáveis, sendo constitutivamente abertos em estado de repouso e são fundamentais para função neural (HONORÉ, 2007). A classe de canais K2P é composta atualmente por 15 membros e é subdividida em seis grupos: TWIN, THIK, TREK, TASK, TALK e TRESK (MILAC et al., 2011). Esta família parece ter um papel importante na regulação de volume celular e parece ter surgido como alvo potencial de inúmeros anestésicos (CHOE, 2002; SANDHIYA, DKHAR, 2009).

Já foi relatado a associação do aumento do volume celular com ativação de diferentes tipos de canais para K^+ (NIEMEYER et al, 2001; OKADA, 2004; HOFFMAN et al 2009) (**FIGURA 8**). Dentre os canais de K^+ já descritos como sensíveis ao volume estão:

- ✓ Os canais com quatro domínios transmembranares: o TREK, o TASK (em células de tumor ascítico de Erlich) e o TRAAK;
- ✓ Os canais com seis domínios transmembranares: K_v1 , K_v4 e K_v5 , KCNQ1, KCNQ4 e KCNQ5 (entre os dependentes de voltagem) em diferentes tipos celulares como neurônios, miócitos cardíacos e linfócitos. Os canais de potássio dependentes de voltagem KCNQ1 e KCNQ4 mostraram recentemente exibir uma sensibilidade ao volume quando expressos com AQP1 em oócitos de *Xenopus* (OKADA, 2004; HOFFMANN et al., 2009);
- ✓ Os canais de potássio ativados por cálcio (BK, o IK e o SK) em células epiteliais, tubulares renais e miócitos cardíacos. A ativação dos canais BK sob condição hipotônica pode ser demonstrada, por exemplo, em células VERO (HAFTING, SAND, 2000).
- ✓ Já foi demonstrado que os canais de K^+ ativados por cálcio de condutância intermediária (IK) estão envolvidos no processo de RVD em células intestinais humanas 407 (Int-407) (OKADA et al., 2001);
- ✓ Canais com dois domínios transmembranares: Kir (K_{ATP})
- ✓ O canal MinK em células epiteliais traqueais murinas (LOCK, VALVERDE, 2000).

FIGURA 8. Canais de potássio sensíveis ao volume



Fonte: Adaptada de HOFFMANN et al., 2009. Canais de potássio sensíveis ao volume marcados em círculo vermelho: TREK, TASK e TRAAK possuem quatro domínios transmembranares; K_v1 , K_v4 , K_v5 , KCNQ1, KCNQ5 são canais de potássio com seis domínios. BK, IK e SK são canais de potássio dependentes de cálcio de alta, intermediária e baixa condutância.

Parece que a ativação dos canais de K^+ dependentes de cálcio (Kca) ou dependentes de voltagem (Kv) não ocorre diretamente por aumento do volume celular, mas sim por um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} (HOFFMANN et al., 2009). As células inchadas aumentam a condutância para o íon Ca^{2+} (NILIUS, DROOGMANS, 2003) e o consequente aumento na taxa de Ca^{2+} intracelular é responsável pela ativação de canais para K^+ ativados por Ca^{2+} (FERNANDEZ-FERNANDEZ et al, 2002). Embora esses canais sejam sensíveis ao volume, a contribuição de cada canal para a RVD pode não ser significativa dependendo do tipo celular (HOFFMAN et al. 2009).

Além dos canais de potássio, algumas células durante o estresse hipotônico levam à ativação dos canais catiônicos não seletivos. À primeira vista, isto pode ser surpreendente, porque devido à eletronegatividade no interior da membrana, espera-se que os canais catiônicos não seletivos favoreçam a entrada ao invés da saída de osmólitos. O gradiente eletroquímico favorece a entrada de cátions através destes canais (WEHNER et al., 2003). Tem que ser considerado, contudo que alguns destes canais exibem alta permeabilidade para K^+ quando comparado ao Na^+ . Além disso, certos canais catiônicos não seletivos apresentam permeabilidade considerável a cátions divalentes, de modo que eles podem desempenhar papel na sinalização do Ca^{2+} durante RVD. Curiosamente, alguns canais catiônicos não seletivos são sensíveis ao estiramento da membrana (WEHNER et al., 2003).

Recentemente foi demonstrado que esses canais estão presentes e funcionam em uma grande variedade de organismos multicelulares, inclusive em humanos. Esses canais são expressos em vários órgãos tais como cérebro, coração, rim, testículos, pulmão, fígado, baço, ovários, intestino, próstata, placenta e tecidos vasculares, e em muitos tipos de células, incluindo neurônios, células endoteliais vasculares, epiteliais e musculares lisas (MONTELL, 2005). Estes canais pertencem a uma superfamília de canais iônicos de potencial transitório conhecida como TRP (MONTELL et al., 2005) que é dividida em dois grupos baseado segundo suas sequências de aminoácidos e diferenças topológicas, sendo o grupo 1 dividido em 5 subfamílias: canais TRP clássicos (TRPC), TRP receptores vanilóides (TRPV), TRP melastatinas (TRPM), TRP mecanoreceptores potencial C (TRPN), TRP proteínas transmembranares ancrinas (TRPA) e o grupo 2 em duas subfamílias: canais TRP receptores de policistinas (TRPP) e TRP receptores de mucolipinas (TRPML) (MONTELL, 2005; RAMSEY et al., 2006; PENDERSON, KAPPUS, HOFFMANI., 2011).

Estes canais TRP pertencem a uma família de canais catiônicos, em sua maioria, permeáveis ao Ca^{+2} e que foram inicialmente descobertos no sistema visual de *Drosophila melanogaster* mutantes do gene TRP (MINKE, PARNAS, 2006). Os canais TRP têm atraído uma profunda atenção por serem os únicos canais de entrada de Ca^{+2} ativados por estímulos variados, como por exemplo, a hipoosmolaridade e estão associados com diversas funções fisiológicas. Os canais TRP foram assim denominados, pois quando ativados, permitem o influxo de cargas positivas para a célula, gerando uma despolarização. Entretanto, esta despolarização não se caracteriza por um potencial de ação, e sim por um potencial receptor transiente, podendo ou não vir a gerar um potencial de ação (CLAPHAM, 2003). Membros de diversas subfamílias TRP têm sido ativados por estímulos osmóticos e em alguns casos contribuem para a resposta regulatória do volume. Pelo menos TRPV2, TRPV4, TRPM3, TRPM7, TRPC6 e TRPP2 parecem exibir sensibilidade ao volume celular e/ou parâmetros biofísicos acoplados ao estiramento da membrana (BECKER et al., 2005). O papel geralmente presumido dos canais TRPs na regulação do volume celular é mediado por um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , que subsequentemente estimula o RVD por ativação do efluxo de íons K^{+} e de íons Cl^{-} , via canais de potássio ativados por cálcio e de canais de cloreto, respectivamente.

B) Canais aniônicos

Canais aniônicos permitem a difusão passiva de íons de carga negativa ao longo de seu gradiente eletroquímico. Constituem vias de baixa seletividade, presentes nas membranas plasmáticas e nas organelas intracelulares, permeáveis a ânions como HCO_3^{-} , Br^{-} , I^{-} , SCN^{-} , NO_3^{-} , PO_4^{4-} e aminoácidos carregados negativamente. Embora estes canais transportem com mais eficiência outros ânions do que o íon cloreto (Cl^{-}), eles são frequentemente chamados canais de cloreto, porque o íon Cl^{-} é o mais abundante nos organismos. (MADUKE, MILLER, MINDELL, 2000; ESTÉVES, JENTSCH, 2002; JENTSCH et al., 2002; SUZUKI, MORITA, IWAMOTO, 2006). Os canais para cloreto são encontrados tanto em células eucarióticas (animais e vegetais) quanto em células procarióticas (bactérias) (HILLE, 2001; JENTSCH et al., 2002).

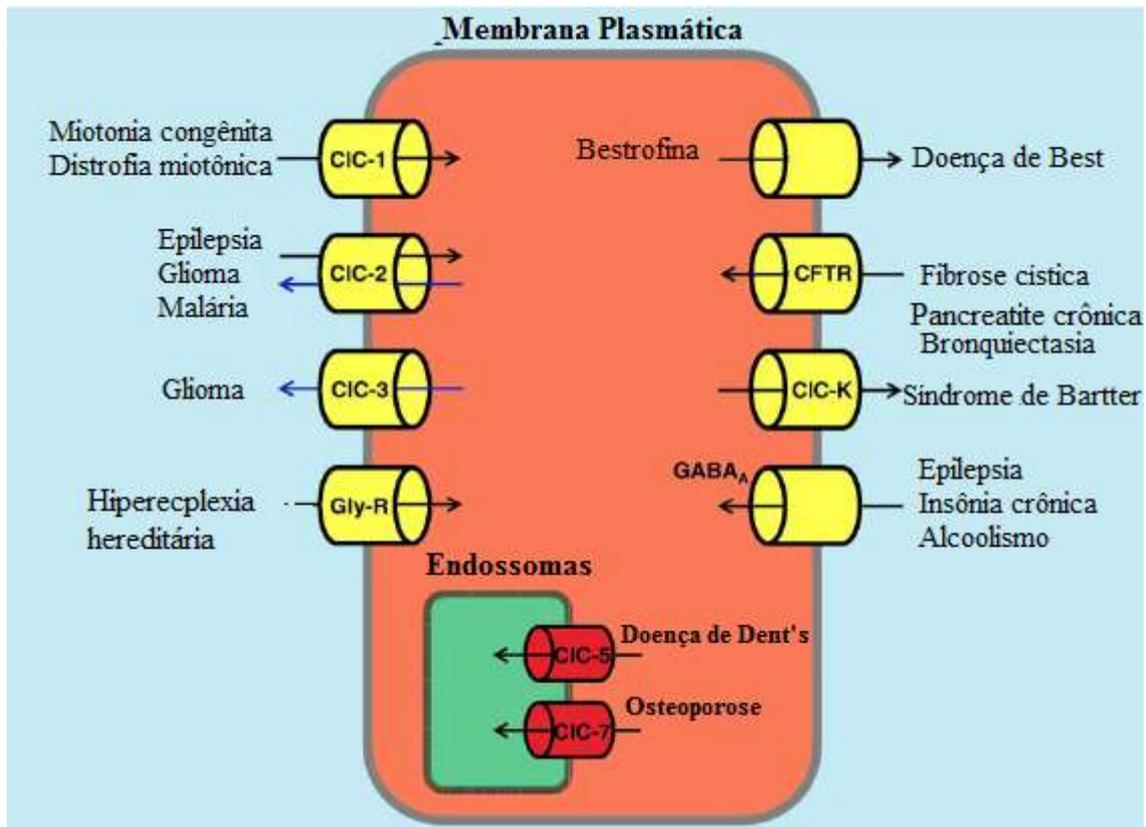
O Cl^{-} desempenha importante papel na homeostasia celular. Funcionalmente, estes íons desempenham papéis importantes em diversos processos fisiológicos incluindo: regulação da

pressão sanguínea, manutenção do pH, regulação do volume celular, tônus muscular, transporte transepitelial, transmissão sináptica, excitabilidade celular e acidificação de organelas intracelulares (MADUKE, MILLER, MINDELL, 2000; HILLE, 2001; NILLIUS, DROOGMANS, 2003; PULJAK, KILIC, 2006). Também existem relatos sobre seu papel na migração celular, proliferação e diferenciação celular (JENTSCH et al., 2002; NILIUS, DROOGMANS, 2003; SUZUKI, MORITA, IWAMOTO, 2006). Estudos recentes têm atribuído ao Cl^- , a capacidade de atuar como segundo mensageiro intracelular, já que sua concentração dentro da célula é dinâmica e capaz de modular a atividade de proteínas como transferrina, glicose-6-fosfatase, hemoglobina, dentre outras (DURAN et al., 2010).

A atividade comprometida dos canais de Cl^- está associada a diversas patologias (**FIGURA 9**), o que sugere que moduladores farmacológicos de canais de cloreto podem ter um valor significativo no tratamento dessas doenças. Segundo JENTSCH et al., 2002, os inibidores dos canais para cloreto na membrana plasmática são DPC, difenilaminocarboxilato; NPPB, ácido niflúmico; 9-AC, antraceno- 9- carboxilato; IAA, ácido indaniloxiácético; CPP, ácido 2- (ρ -clorofenoxi) propiônico; Glibenclamida; Suramina e Tamoxifeno, além dos íons metálicos zinco e cádmio.

Os canais de cloreto são cruciais para o transporte transepitelial e controle do fluxo de água, além de fornecer uma via de permeabilidade para uma variedade de outros ânions. Essa variedade de funções requer um número diversificado de canais de cloreto que são codificados por genes pertencentes a diversas famílias (JENTSCH et al., 2002).

O transporte de Cl^- envolve numerosas vias, incluindo trocadores de ânions, co-transportadores e canais iônicos. Os trocadores e co-transportadores permitem que a concentração do ânion seja mantida contra o gradiente eletroquímico, sendo este transporte associado a outros íons como Na^+ e K^+ . Já os canais de Cl^- permitem a passagem de correntes do íon através da membrana, influenciando o potencial de membrana e o transporte de solutos. As principais famílias de transportadores de cloreto incluem: $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ (NKCC), o $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$ (KCC) e trocador aniônico $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ (AE) (NILLIUS, DROOGMANS, 2003).

FIGURA 9. Canais de cloreto e doenças humanas.

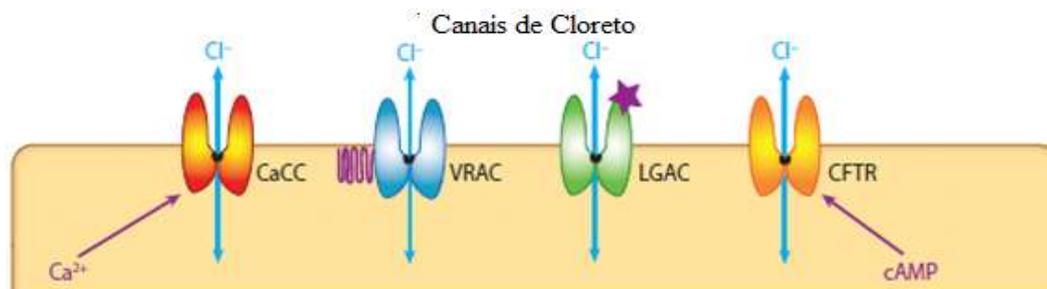
Fonte: PULJAK, KILIC, 2006. Ilustração mostrando a localização celular, o tipo de canal de Cl⁻ e a doença associada com a desregulação da atividade do canal. A seta indica a direção do transporte de Cl⁻ sob condições fisiológicas normais. Em gliomas e malária, atividade do canal de Cl⁻ é altamente regulada (seta azul).

Canais de Cl⁻ podem ser classificados quanto a sua localização, condutância do canal unitário ou mecanismos reguladores. Contudo, esse tipo de classificação é duvidoso. Por exemplo, um mesmo canal pode residir na membrana plasmática e em organelas intracelulares, ou os mecanismos de ativação se sobrepõem. Além disso, com exceção dos receptores do GABA e glicina, essa classificação é insuficiente para correlacionar com as famílias de genes. A classificação mais lógica dos canais de cloreto é baseada em sua estrutura molecular. No entanto, a grande variedade de canais de cloreto identificados não representa um número semelhante de genes para canais aniônicos, sugerindo que famílias inteiras dos genes para canais aniônicos continuam desconhecidas (JENTSCH et al., 2002)

Do ponto de vista funcional, os canais para cloreto têm sido classificados de acordo com seu mecanismo de ativação (**FIGURA 10**) (ESTÉVES, JENTSCH, 2002; NILLIUS, DROOGMANS, 2003; PULJAK, KILIC; 2006), os quais podem ser:

- Dependentes de alterações no campo elétrico transmembranar (canais para cloreto dependentes de voltagem, como a família CIC);
- Dependentes de ATP (por exemplo, canal regulador de condutância transmembranar na fibrose cística, CFTR);
- Dependentes de aumento na concentração do cálcio intracelular (canais de cloreto ativados por cálcio, CaCC);
- Ativados por ligantes (canais ativados por glicina ou ácido gama aminobutírico– GABA);
- Dependentes do aumento do volume celular (canais aniônicos regulados por volume – VRAC ou canais mecano-sensíveis que respondem ao estiramento da membrana).

FIGURA 10. Representação dos canais de cloreto de acordo com seu mecanismo de ativação.



Fonte: DURAN et al., 2010. O fluxo de íons Cl⁻ através da membrana plasmática, por intermédio de diferentes tipos de canais de cloreto, incluindo canais de cloreto ativados por cálcio (CaCC), canais de cloreto ativados por AMPc (CFTR), canais aniônicos reguladores de volume celular (VRAC) e canais aniônicos dependente de ligante (GABAA e receptores de glicina). Canais de cloreto também podem ser encontrados nas membranas intracelulares como as organelas; mitocôndrias, retículo endoplasmático, sistema de Golgi e lisossomos.

Vários canais foram identificados em função das características eletrofisiológicas, seletividade iônica, comportamento da abertura e sensibilidade farmacológica. No entanto, os canais de Cl⁻ ativados por ligantes (glicina e ácido γ aminobutírico - GABA), os reguladores da condutância da membrana na fibrose cística (CFTR) e os canais de Cl⁻ da família CIC são os mais estudados, pois defeitos na sua funcionalidade estão relacionados com processos patológicos (JENTSCH et al., 2002; CHEN, HWANG, 2008) e melhor compreendidos com

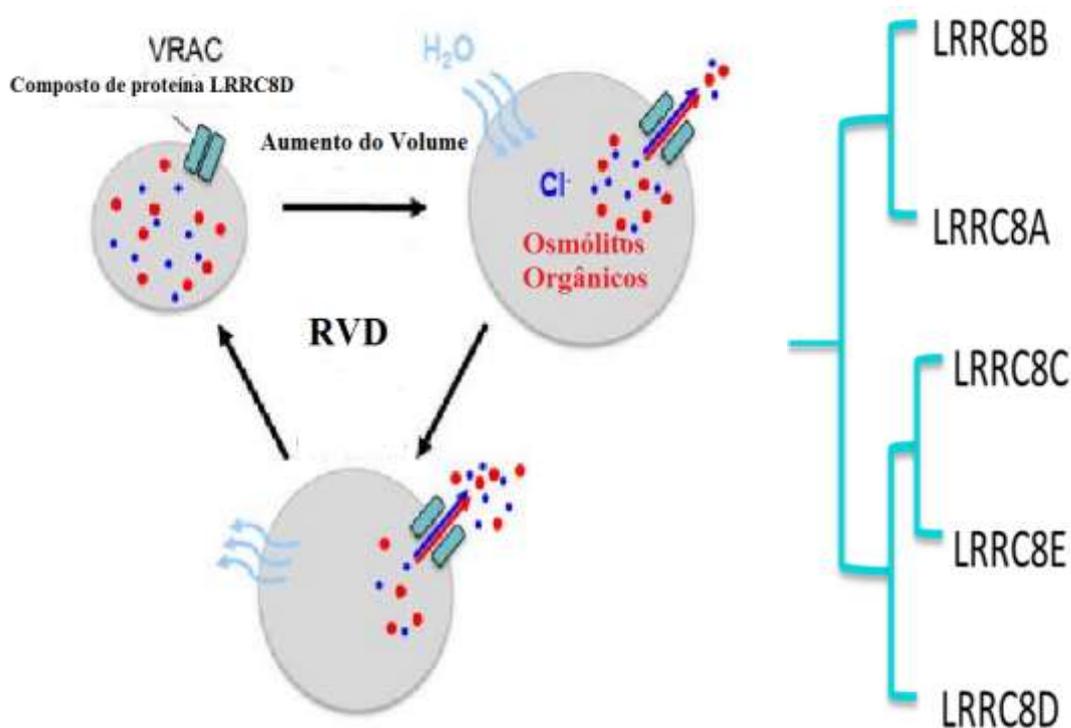
respeito a sua identidade molecular, propriedades e funcionalidade. Em contraste, a identidade molecular de VRAC e CaCC ainda é desconhecida e controversa (EGGERMONT et al., 2001; BERG et al., 2012).

Para manter a neutralidade elétrica, o efluxo de K^+ acontece em paralelo ao efluxo de Cl^- mediado pelo canal de cloreto ativado pelo aumento do volume celular (JENTSCH *et al.*, 2002; SARDINI *et al.*, 2003). Diante de um estresse hipotônico, as células extruem Cl^- através de todos os canais aniônicos disponíveis, incluindo os canais ativados na membrana basal, sensíveis ao volume, ativados por Ca^{2+} , ativados pela adenosina monofosfato cíclico – AMP_C .

O canal de cloreto ativado por hipotonicidade aparentemente mais abundante pertence a um grupo de canal de cloreto denominado VRAC (*volume-regulated anion channels*) (**FIGURA 11**), que também pode ser chamado de (VRC, *Volume Regulated Channel*; VSOR-CLC, *Volume Sensitive Outwardly Rectifier Chloride Channel*; VSOAC, *Volume Stimulated Osmolyte and Anion Channel*, ou *Volume Sensitive Organic Osmolyte and Anion Channel*; RVDC, *RVD related Channel* e VSCC, *Volume Sensitive Chloride Channel*) (OKADA, 2009). O canal VRAC se refere a duas características gerais: seletividade a ânions e ativação causada pelo aumento do volume celular (WHENER, et al. 2003; ALEXANDER, GRINSTEIN, 2006).

O canal VRAC é responsável pela maior parte do fluxo de cloreto para fora da célula durante o RVD, e é apontado como possível canal permissivo também a passagem de osmólitos orgânicos (EGGERMONT et al, 2001; JENTSCH et al., 2002; OKADA, 2004; HOFFMANN et al., 2009). Devido a vasta literatura abordando este canal, não se sabe se todos os trabalhos se referem a único canal protéico ou a diferentes isoformas do canal (EGGERMONT et al, 2001; SARDINI et al. 2003).

O VRAC participa não apenas do mecanismo de RVD em resposta ao inchaço celular, mas também pode ser importante em diversos outros processos, incluindo a regulação da excitabilidade de membranas, transporte transcelular de cloreto, angiogênese, proliferação celular, necrose, apoptose e liberação de glutamato de astrócitos (OKADA et al., 2009).

FIGURA 11. Esquema da função do canal sensível a volume VRAC

Fonte: ABSCAL, ZARDOYA, 2012. VRAC localizado na membrana externa da célula é fechado sob condições de repouso (acima à esquerda) e aberto após alteração de osmolaridade (inchaço osmótico). O efluxo de cloreto e osmólitos orgânicos diminuem a osmolaridade celular, resultado na saída de água e restabelecimento do volume original da célula. VOSS et al, 2014, demonstraram que as proteínas LRRC8 constituem o canal VRAC. Os humanos têm cinco isoformas de LRRC8 (A-E).

Estes canais são referidos como mediadores da corrente de cloreto sensível ao volume ($I_{Cl,Vol}$). Esta corrente foi descrita eletrofisiologicamente pela primeira vez em 1988 por Akihiro Hazama and Yasunobu Okada. A ativação desta corrente em resposta ao inchaço celular é um dos maiores mecanismos pelos quais as células tendem a restaurar seu volume após estresse hipoosmótico. Através dos experimentos de *patch clamp*, vários grupos de pesquisa demonstraram que a corrente de cloreto $I_{Cl,Vol}$ apresenta várias características, que são bem conservadas entre os diferentes tipos de células. Estes canais exibem condutância intermediária na faixa de 10-40pS e 40-80pS em potencial de membrana negativo e positivo, respectivamente (WEHNER et al., 2003).

Esta corrente apresenta o seguinte perfil biofísico: corrente com moderada retificação para fora; inativação dependente de tempo e voltagem em potenciais altamente positivos, seletividade aniônica com a sequência de permeabilidade de Eisenman tipo I: $SCN^- > I^- > NO_3^- >$

$\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{F}^- > \text{isotianato} > \text{gluconato} > \text{glicina} > \text{taurina} > \text{aspartato}, \text{glutamato}$ (SHEN, et al, 2000; RANSOM et al., 2001; NILLIUS, DROOGMANS, 2003).

Foi demonstrado em algumas linhagens celulares que mudanças no pH e concentrações extracelulares de Mg^{2+} e Ca^{2+} podem modular a inativação dependente de voltagem e tempo da corrente $I_{\text{Cl,Vol}}$. Apesar do Mg^{2+} intracelular ser visto como um importante regulador da função, mudanças na sua concentração não causam sua ativação sem o aumento de volume causado por um choque osmótico (OKADA, 2004).

Não existem bloqueadores específicos para os canais VRAC e a eficácia destes compostos podem variar de acordo com o tipo celular. Os principais bloqueadores desses canais são Tamoxifeno, DIDS (ácido disulfônico di-isocianatoestilbeno), SITS (ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-dissulfônico e NPPB (ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzóico, sendo também inibidos por DPC, difenilaminocarboxilato; FFA, ácido flufenamínico; NFA, ácido niflúmico; 9-AC, antraceno-9-carboxilato; IAA, ácido indaniloxiacético; Glibenclamida e DNDS (4,4'-dinitro estilbeno 2,2' dissulfonato) (JENTSCH et al, 2002; NILLIUS, DROOGMANS, 2003).

Os canais de cloreto VRAC são inibidos por concentrações nanomolares de SITS e DIDS. Esta inibição é reversível e é dependente de voltagem de modo que as correntes de saída são mais sensíveis do que as de entrada. De modo independente de voltagem, o canal VRAC também é inibido de forma eficiente pelo NPPB e, em algumas preparações, por DPC e seus derivados flufenamato e ácido niflúmico. Também foram bloqueados por inibidores de glicoproteína P, como tamoxifeno e verapamil, o que levou a hipótese da correlação molecular com estas proteínas (WEHNER et al., 2003).

Apesar da sua ubíqua expressão, a identidade molecular da proteína que forma o canal para cloreto ativado pelo aumento do volume celular ainda é desconhecida, o que dificulta a caracterização farmacológica desta corrente (WEHNER et al., 2003).

Além desse canal, outros canais aniônicos também são ativados pela saída de Cl^- durante o RVD. Existem vários tipos diferentes de canais aniônicos sensíveis ao volume. Os canais de cloreto que atuam na regulação do volume celular incluem os canais de CIC-2 e CIC-3 (SABIROV, DUTTA, OKADA, 2001; WEYLANDT et al., 2001; JENTSCH et al, 2002), BRIVDAC, I_{ClIn} (SARDINI et al, 2003) e a P-glicoproteína (TOMINAGA et al., 1995). Apesar do

papel de I_{Cl} e P-glicoproteína na regulação do volume celular ainda ser uma questão controversa (RITTER et al., 2003).

O canal de cloreto ativado por AMPc conhecido como CFTR possui influência na RVD, porém de forma aparentemente indireta, através da regulação dos canais de potássio (VALVERDE et al., 1995). O CIC-3 foi indicado e subsequentemente refutado como responsável pela corrente I_{Cl} , por esse canal apresentar características biofísicas e mecanismos de modulação semelhantes à dos canais VRACs (WEYLANDT et al., 2001; JENTSCH et al., 2002). Porém, alguns autores discordam dessa hipótese, argumentando que o CIC-3 apresenta uma sequência de permeabilidade e farmacologia distinta dos canais ativados por volume. Um estudo em hepatócitos de camundongos “nocaute” para CLC-3 não apresentou deficiência nas correntes de cloreto sensíveis ao volume $I_{Cl,Vol}$. Os canais CLC-3 exibem muitas semelhanças com o canal VRAC, incluindo retificação para fora, condutância unitária, seletividade aniônica, inativação dependente de voltagem e inibição por derivados estilbenos e tamoxifeno (JENTSCH et al., 2002). Porém, existem algumas diferenças significativas, como por exemplo, a atividade basal de CIC-3 é enorme em comparação com os canais VRAC, sendo este indetectável sob condições isotônicas.

Os VRACs, fornecem em muitos tipos celulares, uma via para o efluxo de osmólitos orgânicos induzido pela hipotonicidade, como por exemplo, os aminoácidos. Estes canais apresentam um poro grande suficiente para permitir a passagem de moléculas relativamente grandes (incluindo glutamato, aspartato e taurina) quando comparadas aos íons inorgânicos, exibindo desta forma um amplo espectro de permeabilidade (RANSOM et al., 2001).

Além dos osmólitos orgânicos citados anteriormente, sabe-se que em resposta ao estresse hipotônico, ocorre a liberação de ATP para o meio extracelular. Os mecanismos pelos quais estes nucleotídeos atravessam a membrana para acessar o espaço extracelular não estão bem estabelecidos (OKADA et al., 2006).

A ativação dos canais VRAC é dependente do ATP intracelular, mas não requer sua hidrólise, ao contrário do ATP extracelular que induz um bloqueio na abertura do canal. Isto pode sugerir um efeito modulador do ATP e possível ligação a uma determinada parte do canal ou uma subunidade reguladora. Na maioria dos sistemas, o estresse hipotônico leva a um aumento significativo da concentração de Ca^{2+} intracelular. Isto por sua vez, pode levar a

ativação dos canais de cloreto ativados por cálcio (CaCCs) que pode contribuir substancialmente para as variações de volume (NILLIUS, DROOGMANS et al., 2003).

Os mecanismos de ativação dos canais de cloreto VRAC ainda são desconhecidos ou controversos, embora muitos estudos tenham mostrado um grande número de vias regulatórias ou de fatores moduladores. Estudos sugerem evidências de sua modulação por cascatas de sinalização como através das proteínas quinase (PKA e PKC) e por fosfatases serina-treonina. Por exemplo, fosforilação/desfosforilação mediadas pela tirosina quinase, tirosina fosfatase, MAP quinases, quinase PI3, Rho-quinase e MLCK ou fosfatases de cadeia leves de miosina (MLC) na regulação dos canais cloreto VSOR (OKADA, 2004; HOFFMAN et al., 2009). Foi proposto que a ativação de canais VRAC em células hepáticas é induzida pelo estímulo autócrino de receptores purinérgicos do tipo P2 após liberação de ATP em inchaço celular. A atividade deste canal é totalmente independente da liberação de ATP induzida pelo inchaço celular, tanto em células epiteliais intestinais sem CFTR (fator regulador da condutância transmembrana que está modificado na fibrose cística), como em células mamárias expressando CFTR (SHEN et al., 2002; OKADA, 2004).

C) Co-transportador de potássio e cloreto

O co-transportador de potássio e cloreto (KCC) é uma proteína de membrana integral que medeia transporte ativo secundário, acoplado, o qual se utiliza da diferença entre o gradiente de concentração do K^+ e do Cl^- para favorecer co-transporte eletroneutro dos dois íons para fora da célula. Sendo um dos transportes mais característicos durante o RVD em muitos tipos celulares.

Os co-transportadores KCCs constituem membros da família SLC12a (*Solute carrier family 12*) e possuem 4 isoformas, KCC1-4 que são codificadas pelos genes SLC12A4, SLC12A5, SLC12A6 e SLC12A7, respectivamente. Possuem massas moleculares entre 120 e 130 kDa (GAMBA, 2005). Estes transportadores KCC são responsáveis pelo transporte de Cl^- associado ao K^+ extruindo dois íons da célula. O KCC é ativado por inchaço nas células sanguíneas de muitas espécies e também em outros tipos celulares.

Esta classe de cotransportadores está envolvida no transporte iônico em diversos tecidos celulares, como neurônios, músculo liso, epitélios, coração, músculo esquelético, sugerindo um papel não só na regulação do volume celular, mas também na absorção de sais transepiteliais, secreção renal de K^+ , relaxamento da musculatura vascular lisa, regulação da concentração de Cl^-

neuronal e até mesmo na regulação do pH intracelular, devido sua capacidade de transportar íons amônio (GAMBA, 2005).

A sua primeira descrição do co-transportador KCC foi como via de eliminação do potássio durante RVD em células sanguíneas de ovelhas, sendo os eritrócitos ainda hoje o modelo mais utilizado para estudo deste mecanismo de transporte (LAUF, ADRAGNA, 2000). Apesar da presença desse transportador ter sido verificada em células neuronais, musculares, endoteliais e epiteliais. A atividade do KCC estimulada por inchaço celular foi observada em eritrócitos fantasmas sob condições livres de ATP e também por uma grande variedade de estímulos, incluindo agentes oxidantes e baixa concentração de íons magnésio Mg^{2+} (OKADA, 2004).

As quatro isoformas estão relacionadas à resposta celular em condições hipotônicas (GAMBA, 2005). A expressão de KCC1 é ubíqua, e a principal função desse transportador parece ser o RVD. Embora expresso ubiquamente, apresenta uma expressão predominante em eritrócitos de diversas espécies (KAHLE et al., 2006). O KCC2 é expresso principalmente em neurônios, e possui uma função mais voltada para a regulação da concentração citoplasmática de cloreto e à regulação do pH. O KCC2 é o único de todos os KCC que apresenta uma especificidade no seu padrão de expressão, restrita aos neurônios, no sistema nervoso central, e à retina, possuindo um papel crucial na excitabilidade e desenvolvimento neuronal (HEBERT et al., 2004). Sendo assim, esta proteína é expressa na membrana celular dos neurônios e dendritos, estando envolvida nas sinapses e na regulação dos neurotransmissores, por exemplo, o GABA. O KCC3 e KCC4 são expressos em uma grande variedade de tecidos, e possuem as funções de transporte transepitelial, regulação da contração de músculos lisos vasculares, e regulação do volume (HOFFMANN et al., 2009). O transportador KCC3 é expresso no cérebro, rim, coração, pâncreas, medula espinhal e placenta, sendo os seus níveis de expressão mais altos em neurônios e nos vários segmentos do néfron (KAHLE et al., 2006). O KCC3 apresenta dois transcritos, KCC3a e KCC3b, que representam duas isoformas. O KCC3a possui uma expressão mais ubíqua do que o KCC3b, que é particularmente expresso no rim, e além disso contém 50 aminoácidos que não estão presentes no KCC3b. Além disso, a proteína KCC3a possui vários locais de fosforilação pela proteína quinase C (PKC), que não estão presentes no KCC3b, sugerindo que estas isoformas estão sujeitas a regulações pós-traducionais diferentes (GAMBA, 2005). O KCC4 assim como o KCC1, é expresso ubiquamente. No entanto, apresenta diferentes níveis de

expressão, tendo elevados níveis no coração e no rim e baixos níveis no cérebro (GAMBA, 2005).

A regulação da ativação dos KCCs ainda não foi elucidada. Muitos estudos indicam que essa regulação se daria através de um mecanismo de desfosforilação por fosfatases específicas (LAUF, ADRAGNA, 2000; ADRAGNA et al., 2004). Isto é uma diferença intrigante em relação ao transportador da mesma família de co-transportadores sódio-potássio e cloreto (NKCCs) que são ativados por fosforilação e estão envolvidos no RVI (WEHNER et al., 2003).

D) Trocador aniônico Cl⁻/HCO₃⁻

A superfamília de transportadores de bicarbonato consiste de dois grupos, conhecidos, como família de trocadores aniônicos Cl⁻/HCO₃⁻ (AE) e a família de transportadores HCO₃⁻ que são acoplados ao Na⁺ (NBCs). Enquanto nenhuma contribuição direta de NBCs para regulação do volume celular foi relatado até o momento, o trocador Cl⁻/HCO₃⁻ é considerado importante tanto para o RVD quanto RVI. Quatro isoformas foram clonadas até o momento (AE1-AE4), onde pertencem à família SLC4 (*Solute carrier family 4*) (ALPER, 2006).

Os trocadores eletroneutros (AE) contribuem em funções celulares importantes como a regulação do pH intracelular e a regulação do volume. São responsáveis pela troca eletroneutra de HCO₃⁻ por cloreto através de membranas (ALPER, 2006).

O AE1, conhecido desde 1985, é a isoforma mais conhecida entre estes trocadores e está presente nos eritrócitos para manutenção da forma e flexibilidade via interações funcionais com o citoesqueleto. Um subtipo bastante conhecido de AE1 é chamado de banda 3 (MOTAIS et al., 1997), sendo um transportador e não um canal, ele está envolvido no efluxo de osmólitos orgânicos ativados pelo inchaço celular. Organismos com expressão de formas mutadas ou com expressão reduzida do gene AE1 exibem alta instabilidade eritrocitária e acidoses. O AE2 é abundante no trato gastrointestinal e acredita-se que seja o responsável pela entrada de Cl⁻ pela membrana basolateral, destinado à secreção de HCl e também pela liberação de HCO₃⁻. O AE2 foi encontrado como único tipo de AE envolvido no RVD de células de câncer cervical humana. O AE3 é bastante expresso no coração e no encéfalo. Distúrbios na expressão de AE3 estão relacionados a algumas doenças neurológicas e cardiológicas (SHEN et al., 2002).

Durante o RVD, ocorre uma maior saída de potássio do que de cloreto, o que se deve pelo menos em parte à atividade dos contra transportadores AEs (HOFFMANN et al, 2009). Uma acidificação do meio intracelular é essencial para o desenvolvimento do RVD, provavelmente

devido à ativação de canais de potássio que dependem de um pH no meio extracelular alcalino. A saída de HCO_3^- é responsável pela alcalinização do meio extracelular, e ocorre através da ativação dos AEs. A atividade dos AEs, por sua vez, depende da ativação de canais para cloreto. Em alguns tipos de células, transportadores de sódio e hidrogênio podem ser ativados concomitantemente para essa regulação do pH durante a RVD (L'HOSTE, 2007).

Outra forma observada da participação do AE no RVD é através da atuação desse transportador como canal permeável a íons e a solutos orgânicos.

Já foi suposto que esses transportadores seriam o eixo central de regulação do transporte de íons, posto que apenas a inibição deles por ácido disulfônico di-isocianatoestilbeno (DIDS) seja capaz de impedir o RVD completamente em alguns tipos celulares (MOTAIS et al., 1997).

E) Osmólitos orgânicos no RVD

A liberação de osmólitos orgânicos intracelulares, tais como os aminoácidos: glutamato, aspartato e taurina constituem parte da resposta do RVD. Após a exposição ao meio hipotônico, as células começam quase imediatamente a liberar osmólitos orgânicos em adição aos osmólitos inorgânicos. Esta liberação não é consequência de um aumento geral da permeabilidade da membrana a solutos orgânicos, mas apresenta uma especificidade marcante e, portanto, envolve vias de liberação específicas. Alguns deles têm limiares osmóticos muito baixos. Em certas células, a liberação de osmólitos orgânicos é responsável por cerca de 50% do total de osmólitos liberados durante RVD, desse modo, sua importância na regulação geral do volume celular torna-se evidente (WEHNER et al., 2003).

O inchaço celular é conhecido por induzir liberação de ATP através dos canais aniônicos em uma ampla variedade de tipos celulares (células renais, epiteliais intestinais humanas, mamárias de camundongos, entre outras), contribuindo assim para o mecanismo de RVD (SABIROV, DUTTA, OKADA 2001). A saída de ATP influencia as concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} que pode ativar os canais de potássio dependentes de Ca^{2+} , facilitando assim o RVD. Além do ATP, outra molécula orgânica significativa para o processo de RVD é a taurina (ácido 2-aminoetanosulfônico) – produto final não metabolizado sintetizado a partir da cisteína, sendo um dos principais osmólitos orgânicos em células animais (LAMBERT, 2004).

A liberação da taurina induzida por inchaço celular é um fenômeno já bem estudado em células do tumor ascítico de Erlich, condrócitos articulares, células HeLa, células gliais,

astrócitos, células do fígado, células endoteliais, neurônios e células da medula renal (WEHNER et al., 2003). Durante RVD, 30-50% de taurina saem da célula. O efluxo de taurina é passivo e direcionado pelo gradiente de concentração. Adicionalmente, o fluxo de taurina em diferentes tipos celulares é inibido por uma variedade de bloqueadores de canais aniônicos, o que sugere que o efluxo de taurina é mediado por um sistema de transporte que é mais similar a um canal iônico que um transportador (SHEN et al., 2002). Em uma variedade de tipos celulares o canal VRAC e a via de efluxo da taurina apresentam uma sensibilidade quase idêntica aos bloqueadores de canais aniônicos (WHENER et al., 2003). Apesar disso, ainda não se sabe, precisamente, por quais vias a taurina é liberada pelas células. Porém, existem indícios de que essa liberação esteja associada a canais aniônicos ativados pelo aumento de volume VRAC, entretanto os perfis farmacológicos das correntes aniônicas sensíveis ao volume e da atividade do suposto “canal de taurina” sensível ao volume são bastante divergentes (HOFFMAN et al., 2009). No entanto, embora o poro do VRAC seja suficientemente grande para permitir a saída de aminoácidos, está claro que em muitos tipos celulares, o efluxo de taurina em diversos tipos celulares se dá por uma via diferente do VRAC.

É possível que a liberação de taurina e outros osmólitos orgânicos ocorram através de transportadores aniônicos, especificamente através dos AEs. Em eritrócitos, a via do transporte de taurina é realizada através do trocador aniônico $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ (AE, banda 3). Em células mamárias, a identidade molecular do efluxo de taurina não VRAC ainda é desconhecida. Curiosamente, a atividade do canal VRAC é regulada pelo metabolismo celular. Quando a concentração do ATP está baixa, o efluxo de taurina diminui (WHENER et al., 2003). Os carreadores favorecem ainda mais o acúmulo de Cl^- pela despolarização da membrana e em parte pelo transporte de cloreto. Os transportadores, assim, medeiam a captura de NaCl em paralelo aos osmólitos orgânicos. O encolhimento celular estimula a transcrição destes carreadores. Uma vez que a expressão dos transportadores é lenta, a adaptação completa requer horas a dias. Contudo, a eficiência do sistema depende da disponibilidade dos osmólitos no fluido extracelular. Similarmente aos osmólitos orgânicos, alguns aminoácidos são acumulados pelo transporte acoplado ao sódio sensível ao volume celular. Por exemplo, a expressão e atividade do sistema de transporte dos aminoácidos são altamente regulados pelo encolhimento celular, enquanto o inchaço celular estimula a liberação de osmólitos orgânicos tais como glicerolfosforilcolina, sorbitol, inositol, betaína e taurina.

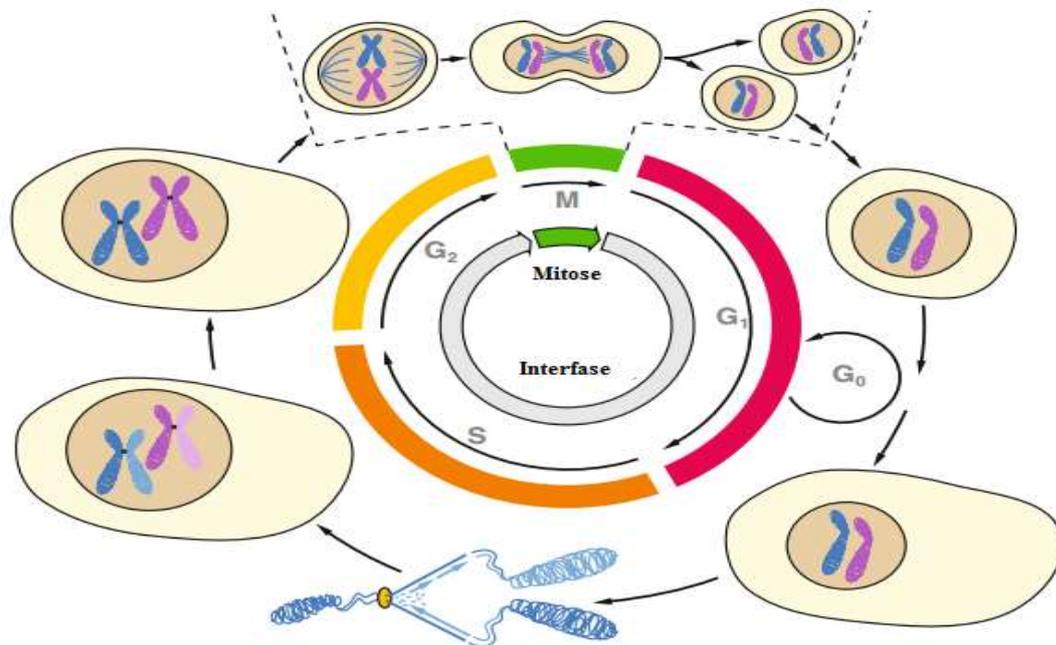
3.6 Ciclo Celular

O ciclo celular corresponde a uma sequência de eventos pela qual uma célula duplica todos os seus componentes, levando a sua divisão e replicação (BEHL, ZIEGLER, 2014). Durante a divisão celular, uma célula original (“célula mãe”) se divide em duas novas células (células filhas) idênticas de maneira altamente controlada e organizada (REIS et al., 2005).

O ciclo celular eucariótico pode ser subdividido em duas fases principais: a interfase, um longo período durante o qual o conteúdo das células se duplica, e a fase M ou mitose, curto período durante o qual o conteúdo da célula é segregado (REIS et al., 2005; BUDIRAHARDJA, GONCZY, 2009) (**FIGURA 12**). A interfase é um período de intenso metabolismo para a célula, sendo composta por três fases G1, S e G2 (G de gap que significa intervalo). A fase G1 (entre interfase e fase S) e G2 (entre a fase S e fase M). Estes intervalos permitem a preparação celular, síntese de proteínas e prevê um tempo necessário no ciclo celular para a entrada de sinais intra e extracelulares. A fase M é a fase onde ocorre a divisão propriamente dita e ocorre a separação dos cromossomos filhos e a citocinese. A mitose é composta por quatro subfases: prófase, metáfase, anáfase e telófase (COPPER, 2000; REIS et al., 2005; BEHL, ZIEGLER, 2014).

Algumas células animais completamente diferenciadas podem deixar o ciclo celular em G1, dividindo-se apenas ocasionalmente. Quando isso ocorre, as células entram em estágio quiescente ou de repouso também chamado de G0. Células nervosas, musculares e sanguíneas são os exemplos mais característicos de células nesta fase. As células também entram em G0 quando o microambiente não é favorável a continuidade no ciclo celular, por exemplo, quando estão desprovidos os fatores de crescimento ou nutrientes que são necessários para a entrada na fase S. É interessante notar que o arraste de células para fase G0 não é idêntico a senescência ou envelhecimento fisiológico celular. Neste caso, as células em G0 podem voltar a se dividir quando submetidas a estímulos específicos, num processo reversível (BEHL, ZIEGLER, 2014).

FIGURA 12. Representação esquemática do ciclo de divisão eucariótico.



Fonte: BEHL E ZIEGLER, 2014. A divisão celular pode ser dividida em mitose e interfase. A duplicação de cromossomos e síntese de outros componentes celulares são necessárias antes da mitose onde ocorre a separação de uma célula mãe em duas células idênticas filhas (Fase – M). Células que temporariamente ou reversivelmente escapam o ciclo de divisão ficam na fase G₀.

A regulação do ciclo celular é crítica para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares. A divisão de todas as células deve ser cuidadosamente regulada para assegurar que a formação das células filhas possua os genomas intactos (COPPER, 2000). Ao mesmo tempo, a perda do seu controle pode acarretar uma série de desordens. Divisão e morte celular (autofagia, apoptose e necrose) são dois processos fisiológicos que regulam a homeostase do organismo nos indivíduos. A desregulação destes processos pode trazer ao indivíduo diversas patologias, como câncer, infarto do miocárdio, acidente vascular periférico (AVC), aterosclerose, infecções, inflamações e doenças neurodegenerativas, entre outras. Diante destas patologias associadas à desregulação da homeostase, busca-se encontrar moduladores do ciclo celular, como também alternativas para reprogramar a morte celular (FOSTER, 2008; ZHIVOTOVSKY, ORRENIUS, 2010).

A progressão através do ciclo celular, a ordem exata das fases, bem como a atividade metabólica e síntese nas diferentes fases precisam ser altamente controladas (GOLIAS et al., 2004; BEHL, ZIEGLER, 2014). A integridade genômica, proliferação e sobrevivência celular,

são reguladas por pontos de checagem no ciclo celular. Como resposta ao estresse replicativo ou danos ao DNA, as células ativam uma rede complexa de fatores conhecidos como quinases dependentes de ciclinas - Cdk's (*cyclin dependent kinases*), que retardam ou detêm a progressão do ciclo celular (vias pontos de checagem) promovendo, assim a reparação ao DNA, ou em casos de danos irreparáveis, levando à morte celular (ZHIVOTOVSKY, ORRENIUS, 2010).

As ciclinas são proteínas de 56kDa e são subunidades reguladoras das Cdk's que controlam a progressão através dos pontos de checagem do ciclo celular por fosforilação e desfosforilação dos substratos alvos (GOLIAS et al., 2004). Hoje, pelo menos oito tipos de ciclinas (ciclina A-H) e nove variantes diferentes de CDK (CDK1-9) são descritas. Com base numa grande quantidade de dados, é sabido que, principalmente, as ciclinas A-E e as CDKs 1,2,4,6 afetam diretamente o ciclo celular (BEHL, ZIEGLER, 2014). O complexo ciclina-cdk regula atividade de múltiplas proteínas envolvidas na replicação do DNA e mitose fosforilando-as em sítios específicos, ativando algumas e inibindo outras para coordenar os eventos do ciclo celular (GOLIAS et al., 2004; REIS et al., 2005).

Durante o ciclo celular, existem três pontos de checagem. O primeiro ocorre na fase final G1/S quando a célula deve iniciar ou não a duplicação do DNA. O segundo na fase G2/M onde os eventos iniciais de mitose devem ser encaminhados impedindo a mitose, caso a replicação do DNA não esteja completa e o terceiro ocorre já na fase M, quando as células estão na iminência de realizar transição entre metáfase e anáfase. Esses pontos de checagem servem para assegurar que os danos não sejam repassados para as células filhas, ou caso não seja possível reparar a célula interrompe a divisão e entra em apoptose (COOPER, 2000).

Uma metodologia para verificar em que fase do ciclo celular as células estão, é baseada na quantificação do DNA. Em G1, a célula diploide contém duas cópias de cada cromossomo (2n), com sua quantidade específica de DNA. Na fase S, a quantidade de DNA passa de 2n para 4n. Células em G2/M apresentam uma quantidade de DNA 4n. Depois da etapa de citocinese, as células retornam a ter 2n. Esta forma de quantificação vem sendo utilizada por diversos grupos de pesquisa, utilizando a citometria de fluxo e marcadores fluorescentes para DNA, como por exemplo, o iodeto de propídio (IP) (DA SILVA et al., 2010).

Outra abordagem simples para distinguir em que fase do ciclo as células se encontram é através da medida de seu volume. Este método, apesar de ser muito trabalhoso e não muito preciso, apresenta uma grande vantagem, pois permite a realização de uma análise com o

mínimo de interferência bioquímica, preservando ao máximo as condições fisiológicas da célula. Sabemos que células que acabaram de se dividir possuem um menor volume (G0-G1), células que passaram pelo crescimento em G1 e entraram em S apresentam seu volume maior (S) e células prontas para se dividirem possuem seu volume máximo (DOROSHENKO et al., 2001; HABELA, SONTHEIMER, 2007; DA SILVA et al., 2010).

3.7 Células-tronco

Células-tronco (CTs) são células progenitoras capazes de se diferenciar em células de tecidos adultos especializados. Em relação às outras células do organismo, apresentam três características peculiares: são células indiferenciadas que podem se multiplicar por longo período mantendo-se indiferenciadas (tanto *in vivo* quanto *in vitro*), de forma que poucas células são capazes de originar muitas populações semelhantes; e, diante de estímulos específicos, possuem a capacidade de se diferenciar em células maduras e funcionais de um tecido particular (LEMISKA, 2005; COVAS, 2006; HERBERTS et al., 2011; WEI et al., 2013). ~~Elas~~ possuem a propriedade de divisão assimétrica, na qual são geradas duas células filhas diferentes, uma delas idêntica à mãe e a outra comprometida com uma via de diferenciação na qual o microambiente celular fornece os sinais que definem a direção da diferenciação (BYDLOWSKI et al., 2009). Ou seja, originam células precursoras com capacidade restrita de diferenciação a um determinado tecido, ao mesmo tempo em que repõem a população de células-tronco com a produção de células indiferenciadas (auto-renovação) (DEANS, MOSELEY 2000; KIM et al 2007). Sob influência de sinais biológicos específicos, elas podem diferenciar-se em células especializadas, as quais são fenotipicamente distintas de suas precursoras (KIM et al., 2007). Estes sinais incluem, por exemplo, danos aos tecidos, tais como: trauma, fraturas, inflamação, necrose, tumores (PALERMO et al., 2005).

Os primeiros estudos experimentais com células-tronco iniciaram após exposição de populações civis a doses letais de radiação ionizante durante a Segunda Guerra Mundial em 1945. Desde então diversos outros estudos foram desenvolvidos, aumentando as perspectivas de uso dos diferentes tipos celulares para fins terapêuticos (FODOR, 2003; WEISS, TROYER, 2006; TROUSON et al 2011).

Ao longo dos anos, diversos órgãos e tecidos do corpo humano perdem progressivamente sua capacidade de funcionamento, seja por causa de alguma doença ou pelo processo normal de envelhecimento. A maioria dos órgãos tem sua capacidade regenerativa limitada, com cicatrizes que impedem o funcionamento do órgão completo. Por exemplo, após infarto do miocárdio, frequentemente o miocárdio é substituído por tecido cicatrizado não contrátil, o que pode resultar em insuficiência cardíaca congestiva (FANAROW, 2000). Existe então uma alta demanda de reposição de tecidos e órgãos, que hoje em dia é atendida por programas de transplante de órgãos. No entanto, por várias razões, esses programas de transplante de órgãos atendem a uma fração ainda pequena dos pacientes, seja por escassez de doadores ou pela atual incapacidade de transplante de certos órgãos ou tecidos, como dos tecidos muscular e nervoso. Além disso, os transplantes de órgãos existentes têm um alto custo, o que é de particular importância para a saúde pública no Brasil, onde são pagos pelo Ministério da Saúde (PEREIRA, 2008). Dentro desse contexto, há uma crescente necessidade por novas terapias tal como as CTs, que devido às suas características peculiares têm despertado grande interesse na comunidade científica. As CTs podem ser induzidas em laboratório com o objetivo de formar tipos celulares específicos, podendo ser utilizadas na regeneração de tecidos, na chamada terapia celular (PEREIRA, 2008). As CTs se apresentam como uma fonte altamente promissora no campo da medicina regenerativa visando proporcionar tratamentos terapêuticos para doenças e/ou lesões, que medicamentos convencionais e até mesmo novas terapias com drogas biológicas não podem efetivamente ter sucesso de cura (FODOR, 2003).

Embora as células-tronco sejam capazes de dar origem a células diferenciadas, existem divergências relacionadas à sua plasticidade. Sob este aspecto, pode-se classificá-las de acordo com seu potencial de desenvolvimento em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e onipotentes, conforme descrição abaixo (FUCHS, SEGRE, 2000, CHOUMERION et al., 2008; KALRA et al., 2014).

a) Totipotentes - formadas nas primeiras horas após a fecundação, apenas no estágio de zigoto. Possuem capacidade de dar origem a todos os tecidos embrionários e extra-embrionários necessários para gerar um novo organismo. Após 4-5 dias de fecundação, estas células são capazes de se especializar, formando o blastocisto, composto por uma camada celular delgada externa, denominada de trofoblasto, e um grupo de células de localização central denominada de massa celular interna (MCI).

b) Pluripotentes - são as células encontradas na MCI do blastocisto, com uma menor capacidade de diferenciação quando comparadas às totipotentes. Podem se diferenciar em todos tecidos humanos, exceto placenta e anexos embrionários, sem capacidade de formar um organismo completo. Estas células mantêm a capacidade sob condições definidas de gerar células das três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma, incluindo células fetais e adultas.

c) Multipotentes - Grupo de células que apresenta plasticidade mais restrita, tem um potencial de diferenciação mais limitado e pode produzir múltiplas linhagens celulares do tecido no qual residem.

d) Unipotentes - são aquelas que se diferenciam em um apenas um tipo de célula (do tecido a que pertencem).

Desta maneira, as CTs basicamente podem ser divididas em dois grupos no que diz respeito ao seu local de origem: células-tronco embrionárias (CTEs), encontradas nos embriões em estágios iniciais, derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário; e células-tronco adultas (CTAs), encontradas em diversos tecidos. Esta última tem o benefício de poder ser isolada do próprio paciente, além de ser mais segura quando aos riscos carcinogênicos (CHOUMERION et al., 2008; DEL CARLO et al., 2009; WANG, QU, ZHAO et al., 2012).

As células tronco embrionárias (CTEs) são definidas como células pluripotentes dotadas de grande plasticidade, apresentam características peculiares, como uma ilimitada capacidade de proliferação *in vitro* sob estímulos, mantendo-se num estado indiferenciado, além da possibilidade de se diferenciar em todos os tipos de células dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma (ODORICO et al., 2001).

As CTEs foram isoladas pela primeira vez por Evans & Kaufman (1981) a partir da MCI de blastocistos murinos e cultivadas *in vitro*, e posteriormente em 1998, utilizando os conhecimentos adquiridos a partir da cultura murina, James Thomson da *University of Wisconsin-Madison* conseguiu isolar as primeiras CTE pluripotentes do interior da MCI de blastocistos humanos, com posterior cultivo e estabelecimento de linhagens (THOMSON et al., 1998).

No Brasil, a Lei de Biossegurança nº 11.105 de 24 de março de 2005, que autoriza o uso de células-tronco de embriões humanos para a pesquisa e para terapias, foi declarada constitucional pelo Supremo Tribunal Federal em 29 de maio de 2008, desde que os embriões sejam inviáveis para a gestação ou estejam congelados a mais de três anos. Após validação da

lei, em outubro de 2008, pesquisadores do Instituto de Biociências da USP em parceria com o Programa de Oncobiologia da UFRJ obtiveram a 1ª linhagem de CTE, denominada BR-1 (FRAGA et al., 2011).

Um dos obstáculos ao uso eficaz e seguro de CTEs é a possibilidade de reações de rejeição imunológica e formação de tumores nos indivíduos receptores (MIMEAULT et al., 2007). Testes indicam que se injetadas em seu estado nativo, podem formar teratomas, ou seja, antes de utilizar estas células é necessário o controle rigoroso do processo de diferenciação para que gere apenas os tecidos de interesse. Além disso, as CTEs têm sido um dos temas de maior controvérsia discutidos na comunidade científica e religiosa (RINGE et al., 2002). Trabalhar com essas células *in vitro* traz a necessidade de desestruturar a massa celular interna do blastocisto de 5-6 dias após a fecundação, o que inviabiliza o desenvolvimento do organismo gerando questões éticas e religiosas quando se trata de embriões humanos.

As CTAs são menos polêmicas, porém tanto quanto promissoras, são CT multipotentes derivadas de tecidos humanos adultos que, provavelmente, possuem um potencial de diferenciação mais amplo do que se suponha há alguns anos atrás, quando se acreditava que estas células estavam restritas a se diferenciar somente naquelas do seu próprio tecido (RINGE et al., 2002). Podem ser isoladas do próprio paciente, apresentando uma menor possibilidade de rejeição e são responsivas aos fatores de crescimento inerentes ao hospedeiro. Não incorre em limitações morais, contornando as questões de âmbito religioso ainda tão ligadas às pesquisas com CTEs.

As CTAs participam da homeostase tecidual, gerando novas células em resposta ao repovoamento celular fisiológico ou a uma injúria (ODORICO et al., 2001). Nos últimos anos, diversas pesquisas têm demonstrado que algumas linhagens de CTs são capazes de originar tecidos diferentes de sua formação embrionária (PEREIRA, 2008). As fontes de células-tronco adultas obtidas dos diferentes tipos de tecidos incluem: medula óssea (MINGUELL et al., 2001), cérebro (UCHIDA et al., 2000), coração (MESSINA et al., 2004), tecido adiposo (ZUK et al., 2002), pulmões (KIM et al., 2005), pâncreas (KRUSE et al., 2006), rins (AL-AWQATI, OLIVER, 2002), fígado (MATHEWS, YEOH, 2005), músculo esquelético (CHEN, GOLDHAMER, 2003), decídua dos dentes (MIURA et al., 2003), folículos de cabelos (JAHODA et al., 2003), pele (JOHNSTON, 2004), sangue periférico (ZHAO et al., 2003), testículos (GUAN et al., 2006), sangue menstrual (MENG et al., 2007), fluido amniótico (DE

COPPI et al. 2007), sangue do cordão umbilical (KANG et al., 2006; LEE et al., 2004), tecido do cordão umbilical, incluindo os vasos sanguíneos e geléia de Wharton (SECCO et al., 2009), placenta (YEN et al., 2005) e tecidos fetais (IN'T ANKER et al., 2003).

As CTAs se apresentam em estado quiescente ou de baixa proliferação, predominantemente nas fases G0 e G1 do ciclo celular, localizando-se em regiões específicas (nichos celulares) para o seu desenvolvimento e manutenção dos seus atributos, particularmente da sua capacidade de auto-renovação. Outra característica marcante é sua capacidade de migrar de seus nichos para sítios de diferentes tecidos, promovendo manutenção e regeneração (RINGE et al., 2002). As CTAs ainda são divididas em duas linhagens: as células-tronco hematopoéticas (CTHs) e células tronco mesenquimais (CTMs) (ZHANG et al., 2012).

No organismo humano, muitas doenças resultam da perda de células especializadas levando à disfunção de órgãos e sistemas. Desta forma, as CTAs presentes nos diversos tecidos possuem um papel fisiológico regenerativo durante estas lesões ou injúrias (FODOR, 2003). Por muitos anos, a principal fonte de CTAs foi a medula óssea. As primeiras CTAs estudadas, e conseqüentemente as mais bem caracterizadas são as CTHs, provenientes da medula e são células capazes de diferenciar-se nos constituintes mielóides e linfóides do sangue e há muito vêm sendo utilizadas com sucesso em transplantes para pacientes com falência medular ou câncer. As CTHs destacam-se pelo potencial terapêutico para tratamento de doenças onco-hematológicas (HIRAO, 2004). Mais tarde foi isolado outro tipo de CTAs, também isolada da medula óssea, porém com propriedades diferentes das hematopoéticas: as CTMs ou células-tronco estromais. Elas receberam esta denominação porque derivam do folheto embrionário intermediário, o mesoderma, que é responsável pela formação dos tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo (SINGER, CALPLAN, 2011).

Atualmente, existe uma nova categoria de CTA que atinge o estágio de pluripotência artificialmente e são ditas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS). As células iPS são geneticamente modificadas e reprogramadas, que se originam de células somáticas, por meio de mecanismos de transfecção celular, gerando exemplares similares às células embrionárias (TAKAHASHI et al., 2007). Esta reprogramação nuclear é de grande interesse médico, porque tem o potencial de gerar uma fonte de células específicas do próprio paciente (JAENISCH, YOUNG, 2008). Esta descoberta envolve a reprogramação das células somáticas pela incorporação de fatores transcripcionais que são altamente expressos pelas CTEs, como os

fatores Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4, por meio de transdução retroviral (TAKAHASHI, YAMANAKA, 2006).

Dentre as linhagens de CTAs estudadas até o presente momento, as CTMs apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não mesodermis (da SILVA MEIRELLES, CHAGASTELLES, NARDI, 2006). Estas células podem ser transplantadas para os sítios lesionais logo após a ocorrência da lesão tecidual e podem ser aplicadas na forma indiferenciada, recebendo o estímulo do meio para posterior diferenciação, ou sofrer diferenciação em cultura antes da implantação (DEL CARLO et al., 2009).

3.7.1 Células-tronco mesenquimais

Sua capacidade de se diferenciar em células de linhagens mesodérmica, ectodérmica e endodérmica as caracteriza como células pluripotentes (FARRINGTON-ROCK et al., 2004), sugerindo que o termo “mesenquimal” pode ser inapropriado para descrever este tipo particular de CT. No entanto, os mecanismos de plasticidade não são totalmente compreendidos. A exata natureza e localização de CTMs *in vivo* permanece ainda desconhecida, crescendo evidências que indicam sua relação com pericitos, também chamados de células periendothelias (FARRINGTON-ROCK et al., 2004). Tais características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pela renovação e manutenção de todos os tecidos do organismo (CALPLAN, 2009). Elas tornaram-se foco de inúmeras pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular.

As CTMs derivadas de medula óssea foram primeiramente descritas por Friedenstein e colaboradores (1976) como células morfológicamente semelhantes a fibroblastos, com alta aderência à superfície plástica, isolada por densidade de *Percoll*, reativa para os SH2 e SH3. Pela primeira vez foi demonstrada a capacidade de diferenciação osteogênica dessas células. Ele descreveu uma população de células como estromais multipotentes, fusiformes e clonogênicas *in vitro* sob a designação de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F *colony forming unit fibroblast*). Mais tarde, elas foram chamadas de células-tronco estromais da medula óssea ou células progenitoras mesenquimais (RINGE et al., 2002), também conhecidas como células-tronco esqueléticas (BYDLOWSKI et al., 2009). Em 2005, a Sociedade internacional para terapia celular (ISCT – *International Society for Cellular Therapy*) propôs uma nova nomenclatura para designar a população de células: células mesenquimais estromais multipotentes. A ISCT propôs ainda que o termo CTM seja para aquelas que indubitavelmente

preenchem as características de células-tronco e ressalta que essas células compõem uma subpopulação das células aderentes ao plástico. A sigla CTM (MSC – Mesenchymal Stem Cell) pode ser utilizada para estas situações, mas devem ser devidamente identificadas (HORWITZ et al., 2005). Atualmente, o termo células-tronco mesenquimais (CTMs), que foi popularizado por CAPLAN, tornou-se o mais comum (PAYUSHINA et al., 2006).

A medula óssea constitui um dos principais sítios doadores dessas células, assim como de células-tronco hematopoéticas e endoteliais (MINGUELL et al., 2000), sendo ainda considerada uma fonte principal de CTM para a grande maioria dos estudos experimentais e clínicos (HORWITZ et al., 2005). Além da medula óssea, as CTMs são encontradas em vários outros tecidos adultos tais como: sangue periférico (ZVAIFLER et al., 2000), tecido adiposo (NARDI, da SILVA MEIRELLES, 2006; ZUK et al., 2002), ligamento periodontal (SEO et al., 2004), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), sangue do cordão umbilical (LEE et al., 2004), pele (TOMA et al., 2001), líquido sinovial (JONES et al., 2004), polpa dentária (SETHE, SCUTT, STOLZING, 2006), músculo e cérebro (JIANG et al., 2002) e também nos tecidos fetais (líquido amniótico, placenta, fígado, baço, timo, pulmão) (DE COPPI et al., 2007; BYDLOWSKI et al., 2009). As células isoladas de diferentes compartimentos celulares demonstram algumas diferenças na expressão de certas moléculas de superfície, no potencial de diferenciação e proliferação, embora suas propriedades, em geral, sejam semelhantes (PAYUSHINA et al., 2006).

Quanto a imunofenotipagem, as CTMs apresentam poucos marcadores imunofenotípicos específicos (NARDI, da SILVA MEIRELLES, et al., 2006), sendo sua caracterização estabelecida pela identificação de um perfil de marcadores específicos e não específicos.

Critérios mínimos para definir CTMs foram sugeridos e publicados por Domici e colaboradores (2006). Estes critérios incluem:

- ✓ expressão positiva de CD105 (SH2), CD73 (SH3), CD44 e CD90 e expressão negativa de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e moléculas de superfície HLA-DR;
- ✓ aderência ao plástico sob condições padrões de cultura;
- ✓ sob estímulo específico, as células sejam competentes *in vitro* para se diferenciar em osteoblastos, condroblastos e adipócitos.

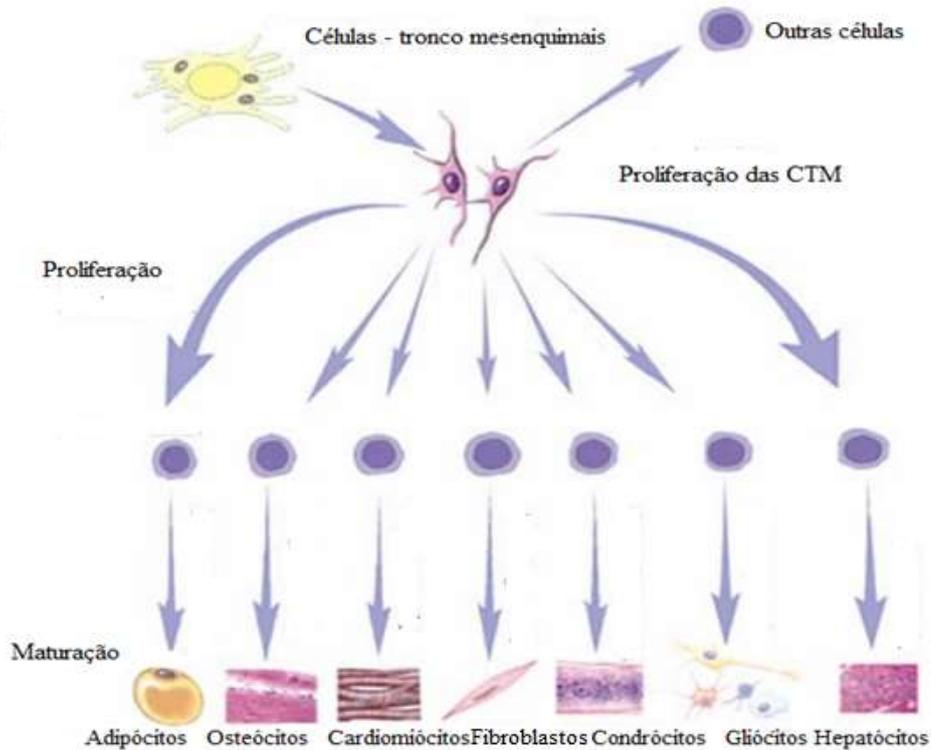
A população de MSC isoladas da medula óssea de humanos e camundongos expressa em sua superfície marcadores moleculares, tais como: CD44 (receptor de hialuronato), CD105

(endoglinta: marcador angiogênico), CD106 (VCAM-1: molécula de adesão vascular), CD166 (ALCAM: moléculas de adesão de leucócitos ativados), CD29 (integrinas VLA- β), CD73 (SH3 e SH4), CD90 (Thy-1), CD29, CD71 e STRO-1 (estroma de suporte da hematopoese) e SCA-1 (KOLF et al., 2007). O marcador STRO-1 é o melhor marcador para se investigar quando se deseja pesquisar a presença de MSC. Entretanto, esse marcador não é exclusivo de CTMs e sua expressão é gradativamente perdida durante a expansão em culturas (KOLF et al., 2007). Paralelamente, existe um consenso na literatura de que as MSC não possuem marcadores típicos de linhagens hematopoéticas e endoteliais, como, por exemplo: CD11b (marcador de célula imune – integrina Mac-1), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo LPS), CD31 (PECAM-1: molécula de adesão plaquetária), CD33 (receptor transmembrana de células mielóides), CD34 (receptor de células endoteliais), CD133 e CD45 (presentes em todas as células hematopoéticas), nem CD80, CD86 e CD40 (moléculas co-estimulatórias); e CD18 e CD56 (moléculas de adesão). A ausência dos antígenos CD14, CD34 e CD45 na superfície dessas células mesenquimais permite distingui-las das precursoras hematopoéticas (KOLF et al., 2007). Existe uma variação na expressão desses marcadores de acordo com o tipo de tecido, método de isolamento e cultura das células e com espécie de origem celular (BYDLOWSKI et al 2009).

Como citado acima, as CTMs podem ser extraídas de diversos órgãos, expandidas em cultura como uma população aderente de células e induzidas a diferenciar em múltiplos tipos celulares (SALEM, THIERMERMANN, 2010).

Quando submetidas a diferentes estímulos, exibem uma ampla capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares (**FIGURA 13**) incluindo condrócitos, adipócitos, osteócitos (PURPURA et al., 2004), miócitos (POUNTOS, GIANNOUDIS, 2005). Além desses, também tem sido demonstrada sua capacidade de se diferenciar em cardiomiócitos, neurônios, astrócitos (NARDI, da SILVA MEIRELLES, 2006) bem como em células endoteliais (KESTENDJIEVA et al., 2008), células produtoras de insulina (WU et al., 2009), hepatócitos (LEE et al., 2004) e células germinativas (HUANG et al., 2010).

FIGURA 13. Potencial de diferenciação das CTMs.



Fonte: FU- JIANG, SHI-QING, 2009. Podem se replicar ao longo das vias de diferentes linhagens para produzir fenótipos altamente especializados (ossos, neurônios e outros tecidos conjuntivos).

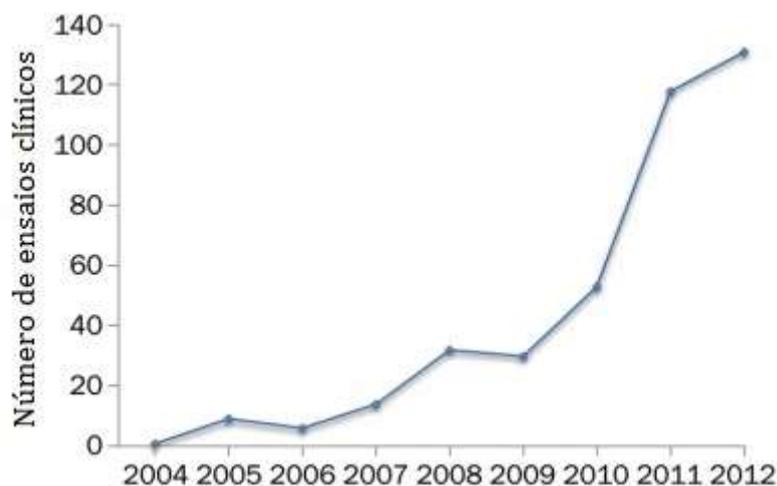
As CTMs podem ser usadas na regeneração tecidual, engenharia genética e terapia celular graças ao potencial proliferativo e seu potencial de diferenciação em múltiplas linhagens celulares. Essas células podem migrar para tecidos lesionados, inflamação e tumores, fato que as tornam altamente promissoras para uso na medicina regenerativa e também serve como eficiente veículo de entrega de drogas na terapia tecido-específica. Entretanto, aplicações clínicas das CTMs permanecem ainda questionadas (CAN, KARAHUSEYINOGLU, 2007). As CTMs são excelentes candidatas para a terapia celular devido a facilidade de obtenção, isolamento íntegro e expansão celular em escala clínica em curto intervalo de tempo (COLTER et al., 2000), podendo ser biopreservadas com perda mínima de potencialidade e armazenado para uso posterior.

Os ensaios clínicos humanos com CTMs até agora não apresentaram reações adversas a transplantes alogênicos versus autólogos, aumentando a criação de um inventário de doadores de CTMs. Transplante com essas células tem sido amplamente testado em ensaios clínicos de

desordens cardiovasculares (CHEN et al., 2004), neurológicas (LEE et al. 2008) e imunológicas (RINGDEN et al. 2006), com resultados encorajadores.

O número de ensaios clínicos utilizando as CTMs tem aumentado desde 2004 (**FIGURA 14**). Embora o uso de CTMs em ensaios clínicos tenha avançado com grande entusiasmo em muitos países, inúmeras questões científicas ainda precisam ser resolvidas antes do estabelecimento de padrões clínicos e regulamentações governamentais. Com o avanço dos estudos pré-clínicos, por exemplo, CTMs foram aplicadas com sucesso para reverter doença enxerto *versus* hospedeiro em pacientes que receberam transplantes de medula óssea, especialmente em pacientes diagnosticados com resistência severa à terapia esteróide tradicional (WU et al., 2011). Similarmente, em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e Doença de Crohn's, o transplante de CTMs tanto autólogo quanto alogênico foram capazes de suprimir a inflamação e reduzir danos nos rins e intestino através da possível indução de células T reguladoras nestes pacientes (LE BLANC et al., 2008).

FIGURA 14. Número do registro de ensaios clínicos baseados na terapia celular com CTMs



Fonte: WEI, 2013 (ClinicalTrials.gov).

Um dos problemas quanto ao seu uso em abordagens terapêuticas decorre do fato de que sua expansão pode levar à perda de multipotencialidade e de senescência (perda da capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares). No entanto, fatores de

crescimento têm o potencial de melhorar a manutenção dessas células *in vitro* (YANG et al., 2007). Embora essas células manifestem um tempo finito de vida em cultura *in vitro* e aproximam-se da senescência muito mais rapidamente que as CTEs, técnicas atuais para a manutenção do fenótipo indiferenciado dessas células permitem que elas cresçam em número suficiente para aplicação clínica. Podem ser expandidas por mais de 40 gerações mantendo a capacidade multipotente, embora reduzam as taxas de mitose e haja uma grande probabilidade de acúmulo de mutações, tornando desaconselhável seu uso clínico, nestas condições (DEANS, MOSELEY, 2000).

Estudos de ciclo celular revelam que, enquanto uma pequena fração das CTMs está ativamente engajada na proliferação (aproximadamente 10% se encontram nas fases S e G2/M), a maioria das células se encontra na fase G0/G1 do ciclo celular, o que sugere uma alta competência destas células em se diferenciar (MINGUELL, et al. 2000). Outro motivo para as CTMs se tornarem foco da atenção terapêutica é devido ao seu potencial imunomodulatório (SALEM, THIERMERMANN, 2010), embora os mecanismos de imunossupressão sobre a resposta inflamatória e sobre os mecanismos de rejeição ao transplante não estejam totalmente esclarecidos. Mediante contato direto das CTMs com um tecido (allogênico ou autólogo) ou mediante interação parácrina com o interferon gama (INF- γ) produzido por células imunes no organismo, as CTMs desencadeiam a liberação de diversos fatores solúveis que atuarão sobre as células do sistema imunológico (linfócitos e células dendríticas apresentadoras de antígeno – APC). Dentre esses fatores, estão as prostaglandinas, interleucinas e fatores de crescimento.

Além dos efeitos imunossupressores, as CTMs expressam pequenas quantidades de complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I) e níveis negligenciáveis de MHC-II /ou não expressão em sua superfície (CALPLAN et al, 2009). Durante o processo de seleção clonal (positiva e negativa) realizado pelas células de defesa do organismo (reconhecimento do próprio e não próprio) utiliza-se o MHC. Dessa forma, essas células seriam toleradas pelo organismo receptor. Dessa forma, as CTMs interagem com as células residentes (nicho) e podem induzi-las, por mecanismo parácrino, a se diferenciar em linhagens celulares distintos de acordo com essa sinalização (TAKAHASHI et al., 2007). Em seres humanos, os potenciais terapêuticos das CTMs contornam as questões éticas, morais e legais associadas ao uso das células-tronco embrionárias.

3.7.1.1 Células-tronco do cordão umbilical humano

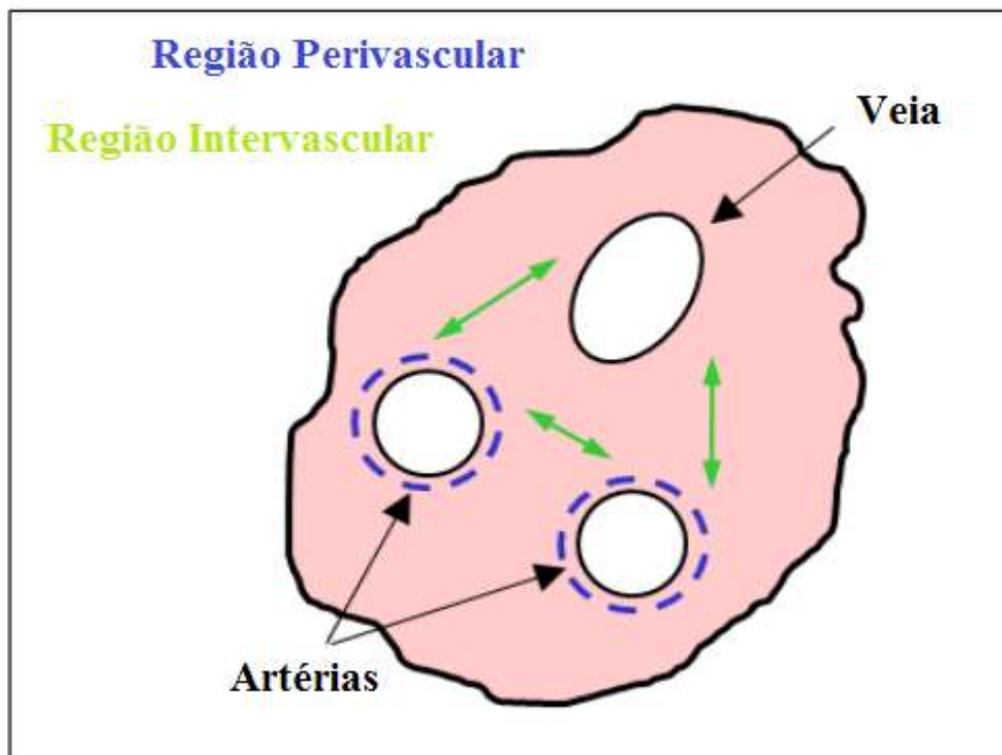
Em anos recentes, pesquisas médicas têm focado no uso de células tronco na terapia celular para amenizar um grande número de doenças. Em particular, recentes esforços têm se voltado para o cordão umbilical humano (hCU) como uma fonte alternativa de células tronco estromais CTMs (ANTONINUS et al., 2012; YANG et al., 2014; DING et al., 2015; WATSON et al., 2015).

O hUC é um tecido extra-embrionário que funciona como suplemento alimentar para o feto durante a vida intrauterina, sendo formado no início da gestação e envolve o saco vitelino que é uma fonte embrionária para dois diferentes tipos de populações de CTMs. Contêm tanto células mesenquimais (somáticas não restritas) e células da géleia de Wharton. As CTMs podem ser isoladas do hCU: camada subendoteial, zona perivascular e geléia de Wharton (WJ – matriz gelatinosa no cordão umbilical que fornece isolamento e proteção a veias e artérias e contém células estromais tipo fibroblastos, fibras de colágeno e matriz proteoglicana) (WANG et al. 2004) **(FIGURA 15)**.

Diferentes ensaios demonstraram que as CTMs encontradas nessas regiões são multipotentes e podem se diferenciar em diversas linhagens, tais como: adipogênicas, osteogênicas, condrogênicas, neurogênica, miogênica, pancreática e hepatogênica com meio condicionado, indicando assim sua multipotencialidade (MITCHELL et al., 2003; WANG et al., 2004; KARAHUSEYINOGLU et al., 2007; YANG et al 2014).

As células-tronco mesenquimais obtidas do cordão umbilical apresentam diversas vantagens quando comparadas às células-tronco de outros tecidos. Primeiramente, o cordão umbilical, usualmente é desprezado como descarte biológico após o parto, apresenta alta disponibilidade e poucas preocupações éticas (KESTENDJIEVA et al., 2008). Segundo, hUC exibem baixa imunogenicidade, porque estas CTMs perderam o complexo MHCII e outras moléculas co-estimuladoras em sua superfície, assim não apresentam resposta imune no tecido hospedeiro. Estudos em laboratórios mostraram que o transplante alogênico de células hUC em animais não imunossuprimidos não produziram rejeição (TROYER, WEISS, 2008). Terceiro, hUC apresenta uma maior capacidade proliferativa, evidenciada pela maior frequência de unidades formadoras de colônias (CFU) e menor tempo de duplicação quando comparadas a outras células (CONCONI et al., 2011).

FIGURA 15. Perfil do cordão umbilical mostrando a géleia de Wharton.



Fonte: HOLLWECK, HAGL, EISSNER. 2012. Ilustração de uma secção transversal do cordão umbilical humano. As duas artérias e uma única veia rodeadas por geléia de Wharton's (rosa), contendo células-tronco mesenquimais na região perivascular e intravascular.

Estudos recentes têm demonstrado que as CTMs da géleia de Wharton do hUC são capazes de expressar diversas características de células-tronco. Apresentam propriedades interessantes tais como: método de isolamento não invasivo, indolor, que pode fornecer um grande número de células sem risco para o doador, sua população de célula pode ser expandida facilmente, estocada criogenicamente, descongeladas, manipuladas geneticamente e diferenciadas *in vitro* (WANG et al., 2004), além de contornar as questões éticas envolvidas com as CTEs e não causa danos para mãe nem para o recém-nascido (WEISS, TROYER, 2006).

A géleia de Wharton do cordão umbilical tem sido identificada como uma das principais fontes de CTMs (WANG et al., 2004; KARAHUSEYINOGLU et al, 2007). Tem sido relatado que estas células derivadas do cordão umbilical humano são diferentes das CTHs e expressam marcadores de superfície tais como CD73, CD90 e CD105 (WEISS, TROYER, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado propriedades biológicas superiores tais como: maior capacidade proliferativa, vida útil e potencial de diferenciação de CTMs de tecidos neonatais sobreposto à CTM de medula óssea, por exemplo (HASS et al., 2011; ANTONINUS et al., 2012).

Diante disso, esta pesquisa teve como modelo celular as CTMs de hUC humano para o estudo de canais iônicos no processo de proliferação e regulação do volume celular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do cordão umbilical humano

As células-tronco mesenquimais foram isoladas (de acordo com um protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE) (proc. nº 49503715.0.0000.5208) de cordão umbilical humano de partos cesáreos ocorridos no Hospital De Àvila, no qual as mães doadoras assinam um termo de consentimento livre e esclarecido. Os cordões foram transportados no gelo ao laboratório em um recipiente estéril contendo solução salina em EDTA (2mM) antibióticos – penicilina (150 U/ml) e estreptomicina (150 µg/mL) e anfotericina (5 µg/ml) sendo processados em até 6hs após o parto.

4.2 Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais

Para isolar as células, os cordões foram lavados e as veias perfundidas com solução salina tampão fosfato (PBS) fresca. Então, os cordões são cortados em pequenos pedaços longitudinalmente (aproximadamente 2 cm de comprimento) removendo veias e artérias, que foram descartadas e o tecido gelatinoso contendo a geléia de Wharton foi então fragmentado e transferido para garrafas de cultura estéreis (75 cm²) contendo DMEM- low glicose (Gibco) suplementado com 15 % soro fetal bovino (FBS; LGC Biotecnologia), 20% de fator de nutrientes Ham's F-12 – (Gibco) e os antibióticos penicilina e estreptomicina (100 U/ml e 100 µg/ml, respectivamente; Gibco) sendo mantidos em condições favoráveis de cultura (armazenadas em estufa 37 °C, 80 % umidade e a 5 % de CO₂). O método de isolamento das hWJ-MSCs foi realizado sem tratamento enzimático, baseado na migração espontânea das células do tecido e sua propriedade de aderência ao plástico (**FIGURA 16**).

Figura 16. Esquema mostrando sequência de procedimento desde a coleta do cordão umbilical até o acompanhamento da expansão das células – tronco mesenquimais.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Identificação das células-tronco mesenquimais

A caracterização das células foi baseada nas características conhecidas de CTMs tais como: habilidade de aderência ao plástico, morfologia (aspecto fibroblastóide), imunofenotipagem e capacidade de diferenciação (osteogênica, adipogênica e condrogênica).

Citometria de fluxo - Células (1×10^6 cels/mL) na terceira passagem (P3) foram caracterizadas por citometria de fluxo através da análise de expressão de moléculas de superfície celular utilizando citômetro de fluxo (FACSCalibur with CellQuest software; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) no Centro de Pesquisa Ageu Magalhães (**FIGURA 18**). As células foram incubadas com os anticorpos monoclonais marcados com fluorescência CD90 (eBioscience, San Jose, CA,

USA), CD44 e CD29 (Southern Biotech, Alabama, USA), CD45, CD34 e CD31 (FK Biotec, RS, Brasil) (1/2000 diluição) por 1h a 4°C de acordo com as recomendações do fabricante. Foram usados os seguintes fluorocromos: isotiocianato (FITC) e ficoeritina (PE) combinados aos anticorpos positivos e negativos, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata com 10.000 eventos por amostra testada e os resultados analisados através do FlowJo software (versão 7.6.1, c, Ashland, OR, USA) baseado no percentual médio de células positivas e desvio padrão dos três experimentos.

Figura 18. Citômetro FACSCalibur



Potencial de diferenciação *in vitro*

Foram realizados ensaios para diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, utilizando protocolos específicos para cada caso.

Diferenciação osteogênica – Células (P3) foram cultivadas em meio enriquecido osteogênico DMEM-LG suplementado com 10 mM β -glicerolfosfato (Fluka-Sigma-Aldrich, MO, USA), 100nM dexametasona (Medley S/A, SP, Brazil), e 200 μ M ácido ascórbico (LAFEPE, PE, Brazil) foram mantidas em cultura por três semanas com troca de meio 2 vezes por semana. No 21º dia foram coradas com Alizarin Red para observação da deposição de cálcio.

Diferenciação adipogênica - Células (P3) foram cultivadas em meio enriquecido adipogênico DMEM-LG suplementado com 10% FBS, 100 nM dexametasona, 0.5 mM 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 0.2 mM indometacina e 10 μ g/ml de insulina durante

14 dias, com troca de meio 2 vezes por semana. O fenótipo adipogênica das culturas foi confirmado pela presença de gotículas de gordura, após fixação das células em paraformaldeído (4%) e coradas com Oil Red-O (30 min).

Diferenciação condrogênica - Células (P3) cultivadas em meio de indução condrogênica DMEM suplementado com 15% FBS, 1% ITS Premix (insulina, transferrina e ácido selenoso) (BD), 100 nM dexametasona, 2 mM piruvato (SIGMA) e 10 ng/ml fator de crescimento de transformação beta 1 (TGFβ1) durante três semanas. Após os 21 dias células fixadas em paraformaldeído (4%) e coradas com Alcian blue para visualização de matriz extracelular constituinte de cartilagem deixando as células com coloração azul.

4.4 Ensaios de proliferação celular

Células hWJ-MSCs (P3) foram semeadas em placas de cultura de 24 poços (5×10^3 células/poço) em volume de 500 µl de meio Low DMEM (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia), fator de crescimento (F12, Gibco) e antibióticos (penicilina e estreptomicina) por 24h. Em seguida, as células foram incubadas sem (controle) e com inibidores de canais de potássio (TEA, 4-AP, IBTX) ou cloreto (NPPB, DIDS, Gb e TAM). A contagem das células (duplicata) ocorreu durante 4 dias consecutivos, em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada através da técnica de exclusão do Tripán blue (0,4%). No grupo teste, as células foram submetidas aos inibidores de canais iônicos nas seguintes concentrações: TEA (10 mM); 4-AP (5 mM); IBTX (10 nM); NPPB, DIDS e Gb (100 µM) e TAM (10 µM). As placas foram acomodadas em incubadora a 37°C em 5 % de CO₂ e 80 % de umidade e os dados foram plotados no Origin (OriginLab.V8.1) para confecção da curva de crescimento celular.

4.5 Ensaio de Viabilidade Celular

A análise da viabilidade celular foi baseada na atividade mitocondrial das células através da técnica colorimétrica do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (MOSMANN, 1983). Este método foi usado para analisar o efeito dos diferentes inibidores de canais de cloreto (NPPB 100 µM, DIDS 100 µM e TAM 10 µM) na proliferação das células (hWJ-MSCs).

Com o ensaio do MTT, o efeito dos bloqueadores de canais de cloreto sobre a proliferação celular foi avaliado por comparação entre a viabilidade celular entre os grupos controle e experimental. Células (P3) (1×10^4 céls/ml) foram semeadas em placa de 96 poços e incubadas por 24h a 37 °C em 5 % de CO₂. Após incubação, os inibidores de canais iônicos foram adicionados em cada poço (grupo teste). Como controle negativo foi usado apenas meio DMEM (sem células e inibidores). Após 72h de incubação, 20 µl do corante MTT (5 mg/ml) foi adicionado em cada poço e incubados por 4h (37 °C, 5 % CO₂). Em seguida, o meio foi completamente removido, e 100µl de DMSO foi adicionado para dissolver os cristais de formazan. A leitura foi realizada (triplicata) no leitor automático de placa (Varioskan Flash, Thermo Scientific), no comprimento de onda de 595 nm.

4.6 Experimentos para análise do RVD

4.6.1 Soluções

Para os experimentos com células - tronco mesenquimais foi utilizada como Solução 1 a solução tampão de Ringer, contendo, em mMol/L: 130 NaCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 2.8 KCl, e 10 Hepes, com pH ajustado para 7,4 com tris-OH e osmolaridade ajustada para 300 mOsm com manitol (Osmômetro Fiske, Mark3®). A Solução 2 era uma diluição 1: 2 (v/v) da Solução 1 com água destilada, e osmolaridade conseqüentemente reduzida para 200 mOsm (DOROSHENKO et al., 2005; DA SILVA et al., 2010).

Os inibidores tetraetilamônio (TEA, 10 mM) (um clássico bloqueador de canais de potássio dependentes de voltagem – K_v); Glibenclamide (GB, 100 µM) (um clássico bloqueador de canais de potássio dependente de ATP e também conhecido como bloqueador de canais CFTR); 4-aminopyridine (4-AP, 5 mM) (um bloqueador relativamente seletivo de membros do Kv1 (Shaker, KCNA), família dos canais de potássio dependentes de voltagem), Iberotoxina (IBTX, 10nM) (bloqueador de canais de potássio dependentes de Ca²⁺), Ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzóico (NPPB, 100 µM), ácido disulfônico di-isocianatoestilbeno (DIDS, 100 µM) e Tamoxifeno (TAM, 10µM) conhecidos bloqueadores de canais de cloreto foram utilizados como ferramentas moleculares. A adição dos inibidores nessas concentrações não alteraram a osmolaridade final da solução. Os inibidores foram preparados com DMSO (dimetil sulfóxido), e as concentrações finais de DMSO foram menores que 0,1%. A osmolaridade das

soluções foi mensurada com um osmômetro (*Fiske^R Mark3, Fiske Associates, Massachusetts, USA*).

4.6.2 Análise morfométrica do volume celular – RVD

Os experimentos de RVD foram realizados usando um sistema de vídeo imagem que consiste de uma câmara de vídeo CCD (Moticam 2000®) acoplada a um microscópio invertido (Leica DMIL®) conectada à placa de captura de um computador. Após 48h de expansão em placas de cultura, até obtenção de 80 % de confluência, as células (P3) foram removidas por tripsinização e ressuspensas em meio DMEM e mantidas a 25 °C. O índice de viabilidade considerado foi de \geq a 85 %. As células foram colocadas em uma câmara de acrílico com fundo de vidro mantida na mesa do microscópio, com volume igual a aproximadamente 2,0 mL. As células permaneceram em meio de cultura na câmara até aderirem ao fundo (15-20 min), e, em seguida, através de um sistema de perfusão gravitacional simples, que permite a troca rápida da solução que banha as células com uma velocidade de aproximadamente 1,5 mL/min. O meio foi então trocado pela Solução 1 para retirar as células que não aderiram à câmara.

As 5 primeiras imagens foram obtidas com as células expostas a essa Solução 1 (isotônica), e em seguida ocorreu novamente a troca de solução por perfusão, para uma Solução 2 (hipotônica). As imagens foram gravadas a cada minuto durante um intervalo de 30-40 min utilizando o software da própria Moticam®. As imagens das células antes e depois ao choque hiposmótico foram analisadas posteriormente através do software ImageJ para medir a área de secção transversal das células unitárias, assumindo que as células possuem uma geometria esférica. Os experimentos foram realizados na ausência (controle) e presença de inibidores de canais iônicos (grupo teste). Os inibidores foram acrescentados à solução hiposmótica antes da perfusão.

O volume celular foi calculado a partir dos diâmetros das células pela equação:

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

Onde S é a área (μm^2).

Também foi analisado o nível de RVD (%) = $(\text{Vol}_{\text{máx}} - \text{Vol}_{\text{min}}) / (\text{Vol}_{\text{máx}} - \text{Vol}_0) \times 100\%$, onde Vol_0 é o volume celular na condição isotônica antes do choque hiposmótico, $\text{Vol}_{\text{máx}}$ é o pico

do volume encontrado na solução hipotônica e Vol_{min} é o volume de retorno atingido. A mudança de volume relativo (Vol/Vol_0) foi calculada a partir da área de superfície da secção transversal das células. Os valores médios de v , foram indicados em porcentagem, sendo 100% igual a média nos 5 primeiros minutos de gravação.

4.7 Análise do ciclo celular

A proporção de células nas fases G0/G1, S e G2/M foi obtida por análise do conteúdo de DNA das células baseado na intensidade de fluorescência (marcação com iodeto de propídio). Após expansão em garrafas de cultura de 25 cm², as células foram incubadas em meio sem (controle) ou com inibidores de canais iônicos por 48 h. Após incubação, as células foram tripsinizadas, coletadas, lavadas com solução salina (PBS) e fixadas em etanol (70 %) em baixa temperatura (-20 °C) no intervalo mínimo de 60min. Antes da análise, células foram lavadas (2x) em PBS, centrifugadas e ressuspendidas em PBS (~1 x 10⁶ cel/ml). Em seguida, as células foram incubadas com iodeto de propídio (50 µg/mL) e RNase (20 µg/mL), protegidas da luz por 30 minutos. A quantificação do conteúdo do DNA foi determinada através do citômetro BD Accuri C6 (Bioscience). Para cada amostra, 10.000 eventos foram analisados. Os experimentos foram realizados pelo menos em triplicata. A frequência de distribuição (histograma) foi obtida e a porcentagem de células em cada fase quantificada através do software FlowJo (V 7.6.1 Tree Star's Inc, Ashland, UK) do próprio citômetro.

4.8 Extração de RNA e qRT-PCR

A extração do RNA total de hWJ-MSCs (P2) foi realizada usando o mini kit RNeasy seguindo as instruções do fabricante (QIAGEN, SP, Brazil). A RT (transcriptase reversa) usou o SuperScript (RT) (Invitrogen, Carlsbad, CA). A PCR seguiu o seguinte protocolo: 50° C, 2 min; 95° C, 2 min; 40-45 ciclos de 95° C por 15 seg e 60° C por 30 seg. A expressão do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usada como controle interno. Os níveis de expressão de RNAm dos genes que codificam os canais iônicos nas hWJ-MSCs foram mensurados por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

4.9 Patch clamp - Registros eletrofisiológicos

Os registros eletrofisiológicos foram realizados nas células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano na 2ª passagem. As células cultivadas em placas de petri foram tratadas com Tripsina + EDTA 0,25% para removê-las, logo após, a tripsina foi inativada com meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram, então, centrifugadas e ressuspendidas em meio DMEM. Cerca de 1mL do meio, contendo células, foi adicionado em uma câmara de registro, montada na platina de um microscópio invertido. Esperou-se um tempo médio de 15-20 minutos para que as células pudessem aderir ao fundo da placa. As correntes iônicas através da membrana celular foram registradas, como descritos por Hamil (1981), utilizando um amplificador EPC8 – HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) e analisados com uma interface ITC-18, e um computador pessoal executando o software PatchMaster Lock-in (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemanha). Todas as medidas foram realizadas utilizando-se as configurações ‘whole-cell voltage clamp’. Neste método, o contato da ponta da micropipeta com a célula foi realizado com um micromanipulador (MX3-Narishige). As micropipetas foram confeccionadas com capilares (vidro/borosilicato) usando-se um puxador (Micropuller PP-830, Narishige, Tokyo, Japão). Nos experimentos, foram usadas somente pipetas com resistência entre 3-5 MΩ. A capacitância celular foi obtida com compensação eletrônica e o transiente capacitivo também foi compensado eletronicamente. Todos os experimentos foram executados em temperatura ambiente (22-25°C). A solução da micropipeta (em mM) foi: 30 KCl; 110 Aspartate-K; 1 Tris; 5 MgCl₂; 4 ATP-Na₂; 2 CaCl₂; 5 EGTA; 0.1 GTP-Na₂, pH 7.2 com Tris-OH (285 mOsm/L), enquanto que a solução externa (em mM) foi: 130 NaCl; 2.8 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES com pH ajustado para 7.4 usando Tris-OH e osmolaridade ajustada em 300mOsm/L com manitol.

4.10 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão quando apropriados analisados usando o teste t Student's ou ANOVA seguido pelo teste de Tukey ou Bonferroni conforme hipótese a ser testada, parâmetro a ser analisado e distribuição dos dados. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas usando software Origin 8.0.

5. RESULTADOS

5.1 Manuscrito 1:

Role of chloride channel in regulatory volume decrease and proliferation of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly human umbilical cord

G. J. B. Albertim^{1,2}, W. D. C. Gaião¹, D. C. Machado¹, M. B. Silva¹, P. E. Cabral Filho¹, A. Fontes¹, R. P. Silva³, L. L. Malagueta-Vieira⁴, V. R. A. Pereira⁵, P. L. Medeiros⁶, C. G. Rodrigues^{1,2*}

¹ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Laboratório de Biofísica de Membranas e Células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov (LBM-CT). Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

³ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

⁴ Departamento de Fisiologia, Universidad del País Vasco (UPV/EHU) – Espanha.

⁵ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FioCruz, Recife, Brasil.

⁶ Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Abstract

Cell volume regulation is one of the most fundamental homeostatic mechanisms and essential for normal cellular function and has received increasing attention because it is relevant in cell proliferation. A key component of the cell's response to volume changes is the activation of ion channels. Furthermore, there are growing numbers of observations that show that progression through the cell cycle is linked to ion permeability of the plasma membrane and that the ion transport across the cell membrane participates in regulation of cell volume. Thus, a chloride (Cl⁻) channel has lately attracted considerable attention in this regard. A potential role of the ion channels in cell proliferation was shown in many cell types including mesenchymal stem cells (MSCs). In humans, this cell type can be obtained from different sources such as Wharton's jelly from the umbilical cord (hWJ-MSCs). Many studies conducted in recent years showed that hWJ-MSCs are a promising source for regenerative medicine; however, their physiology is not fully understood. The present study aimed to investigate the role of Cl⁻ channels in regulatory volume decrease (RVD) and in the proliferation of hWJ-MSCs. Classical inhibitors of Cl⁻ channels were used as molecular tools in some functional studies (RVD, MTT assay, growth curve, flow cytometry and RT-PCR). hWJ-MSCs have RVD and Cl⁻ channel blockers were able to suppress them, reducing the cell proliferation. Furthermore, to the best of our knowledge, these results are the first data indicating that Cl⁻ channel blockers promote the increase of cell population in G₀/G₁ phase.

Keywords: Chloride Channel, Cell Volume Regulation, RVD, Cell proliferation, Cell Cycle, Mesenchymal Stem Cells.

Running Head: Chloride Channels in MSCs of Human Wharton's Jelly

*Corresponding author: Phone/Fax: +55 81 2126 8536, e-mail: claudio.rodrigues@ufpe.br

1. Introduction

Ion channels are extensively expressed in different types of cells and play important roles in maintaining of physiological homeostasis. Their importance is reflected by their ubiquity and by their crucial role in basic physiological processes such as setting the membrane potential, signal transduction, hormone secretion and salt and water absorption, apoptosis, cell proliferation and cell volume regulation (5,15,19,20,36,46).

Cell volume regulation had received an increasing attention because it is relevant in cell proliferation. There are growing number of observations indicating that cell cycle progression is associated to the ion membrane permeability and volume changes (5,21,40). The role of volume changes in cell cycle is suggested by the observations that proliferation was inhibited when cells were cultured in a hypertonic medium (29) that limits volume increase, and that increased proliferation was observed when cells were cultured in a slightly hypotonic medium (52).

It has been established that the concurrent activation of potassium and chloride channels occurs during cell cycle progression while their pharmacological blockade may lead to inhibition of cell proliferation in different cells types, including human mesenchymal stem cells from bone marrow (5,10,12,53,54). Lots of evidence has indicated that chloride channel activity plays an important role in cell cycle progression. For example, pharmacological blockade of volume regulated anion channels causes arrest of cervical cancer cells proliferation in the G₀/G₁ stage (37). Two nonspecific Cl⁻ channel blockers, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB) and tamoxifen (TAM), inhibited the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells (7). Still the NPPB (100 μM) could inhibit the proliferation of ovarian cancer cell in a concentration-dependent manner, increase the G₀-phase cells population, and decrease the number of S-phase cells (27).

Cell proliferation needs an accurate control of cell volume that is achieved by the fine control of osmolality. One of the mechanisms by which ionic channels regulate cellular proliferation is via cell volume control. The maintenance of a constant cell volume in the face of fluctuating intra- and extracellular osmolality is essential for normal cell function and it has been built in the course of evolution (34). The animal cell swelling following exposure to hypotonic solution, and the next return to their initial volume is a process called RVD (Regulatory Volume Decrease) (15, 20, 31,36). RVD is mainly achieved by the activation of K⁺ and Cl⁻ channels in many cell types (20).

Because the ionic channels and the cell volume regulatory mechanisms are involved in the cells proliferation - the study of these processes in mesenchymal stem cells becomes extremely relevant since it may contribute to the development of cell therapy and tissue engineering. Mesenchymal stem cells (MSCs) are attractive cells due to their capacity for proliferation, multilineage differentiation, and immunomodulatory properties (37). Recent efforts have focused on the human umbilical cord (HUC) as an alternative source of mesenchymal stem cells (MSCs) (45,49). The MSCs derived from umbilical cord have several advantages when compared to stem cells from other tissues. First, the umbilical cord is usually discarded as biological disposal after birth delivery, features high availability and few ethical concerns (45). Second, HUC exhibit low immunogenicity, because these MSCs lost MHCII complex and other co-stimulatory molecules on their surface, thus it has no immune response in the host tissue. Third, HUC has a higher proliferative capacity, evidenced by the higher frequency of colony forming units (CFU) and shorter doubling time when compared to other cells (18).

It is well documented the importance of potassium channels in the proliferation of stem cells, however, the influence of the chloride channels in this process is still not understood. In here, we analyzed the role of chloride channels in the proliferation and mechanism of RVD of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly (hWJ-MSCs) in order to better understand the pathways for controlling cell proliferation *in vitro* by modulating the ionic transport.

2. Materials and Methods

2.1 Isolation and primary culture of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of the human umbilical cord

The research protocol for all procedures of this work was approved by Ethics Committee at Federal University of Pernambuco, Brazil (protocol number 49503715.0.0000.5208). Fresh human umbilical cords were obtained from mothers who received Cesarean sections (38-40 weeks). Cord were transported to the cell culture laboratory in receptacles containing sterile, cold (4° C) salt solution (PBS, 2 mM EDTA, 150 µg/mL streptomycin, 150 U/mL penicillin and 5 µg/mL amphotericin at 4°C) for further processing until six hours after the cord collection. The isolation method was based on migratory capacity of mesenchymal cells (11). Briefly, the cords

were rinsed and the vessels perfused in PBS. Next, the cord was cut into small pieces (~ 2 cm length) and sectioned longitudinally, before placing them in sterile flasks. The vessels and arteries were removed and the explants were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM low-glucose - Gibco) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS - LGC Biotechnology), 20% Ham's F-12 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin in 5% CO₂ in a 37 °C incubator. The medium was completely changed after 24 h. Approximately 3 weeks after explantation, the cord segments and non-adherent cells were completely removed. At this time, we observed colonies of cells with fibroblastic-like morphology. The subconfluence process (70 - 80%) was monitored by phase-contrast microscopy Leica DMIL (Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany). Adherent cells were trypsinized, harvested, counted and then were expanded by successive passages. In this study, we used hWJ-MSCs in third passage (P3) for analysis of their phenotype, proliferation, differentiation capacities and subsequent studies of RVD and cell cycle.

2.2 Cell characterization

The cell characterization was based from the known characteristics of mesenchymal cells: ability to adhere to plastic, cell morphology (fibroblast-like), immunophenotyping and induction of differentiation (osteogenic, adipogenic and chondrogenic).

To determine whether stromal cells in Wharton's jelly of the umbilical cord have multipotent potential, we extracted cells from umbilical cords and cultured them in DMEM- Low glucose medium supplemented by 15% SFB and 20% F-12. The report is representing the results obtained using 30 umbilical cords.

Flow cytometry

For detection of surface antigens, third (P3) - to fourth-passage (P4) cells were trypsinized, centrifugated and incubated for 10 minutes at 4°C with phycoerythrin (PE) or isothiocyanate (FITC) conjugated antibodies. Excess antibody was removed by washing. Standard flow cytometry techniques were used to determine the typical cell surface epitope profiles and to characterize them as mesenchymal stem cell. At least 5x10⁴ cells/mL were incubated with the respective isotype monoclonal antibodies CD90, CD44 and CD29 (San Jose, CA, USA); CD45, CD34 and CD31 (FK Biotec, RS, Brazil) (1/2000 diluted, 4 °C, 60 min). The cells without incubation with fluorescence-labeled monoclonal antibodies were used as negative

control. At least 10.000 events were collected using a FACSCalibur cytometer (FACSCalibur with CellQuest software; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for each sample and the results were analyzed using FlowJo software (Version 7.6.1, Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) based on the mean percentage of positive cells and standard deviation from three experiments.

Differentiation potential *in vitro*

Osteogenic differentiation was induced by culturing subconfluent (P3 hWJ-MSCs) populations in growth medium DMEM-LG supplemented with 10 mM β -glycerophosphate (Fluka-Sigma-Aldrich, MO, USA), 0.1 μ M dexamethasone (MEDLEY S/A, SP, Brazil), and 200 μ M ascorbic acid (LAFEPE, PE, Brazil). Cells were fed with complete replacement of the medium on alternate day for 21 days. At days 7, 14, and 21, the cells were inspected under an optical microscope and their osteogenesis was assessed by Alizarin red staining.

Adipogenic differentiation was induced by DMEM-LG supplemented with 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 0.2 mM indometacin, and 10 μ g/ml of insulin (Sigma). Cells were fed with complete replacement of the medium on alternate day for 14 days. After 2 weeks cells were fixed in 4% paraformaldehyde, washed and stained with Oil Red-O for 30min, to reveal lipid droplets.

Chondrogenic differentiation occurred under following conditions: the cells were cultured in serum-free chondrogenic medium for three weeks. This medium consisted of DMEM supplemented with 15% FBS, 1% ITS (BD), 100 nM dexamethasone, 2 mM pyruvate (SIGMA), and 10 ng/ml transforming growth factor beta 1 (TGF β 1, Sigma). Cell pellets were harvested at three weeks post induction, fixed overnight with 4% paraformaldehyde and then sections were prepared for Alcian blue staining.

Cells cultured without the factors of differentiation were used as control. The medium was changed each 3 days, and the cells after completion of differentiation had been established by histochemical studies.

2.3 Regulatory Volume Decrease

Drugs, Reagents and Solutions

Inhibitors NPPB (100 μ M) 5-nitro-2-(3-phenylpropyl-amino) benzoic acid, DIDS (100 μ M) 4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate and TAM (Tamoxifen) (10 μ M)) and NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, ATP, EGTA, DMSO, Tris and HEPES were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Inhibitors were prepared by dimethyl sulfoxide (DMSO). At used concentrations, these inhibitors did not altered the final osmolality of the solution.

The isotonic solution, named Ringer's solution, contained (mM): 130 NaCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 2.8 KCl and 10 HEPES with the pH adjusted to 7.4 with TRIS-OH and osmolality was adjusted to 300 mOsm/l with D-mannitol. The osmolality was measured by depression of the freezing point using an osmometers (Fiske Mark3, Fiske Associates, Massachusetts, USA).

Measurement of Cell volume

hWJ-MSCs cultured in the flasks were harvested with 0.2% trypsin/1 mM EDTA solution from P3 to P4, centrifuged and re-suspended in DMEM. For recordings, suspension cell was transferred to a chamber mounted onto an inverted microscope (Leica DMIL; Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany). The chamber volume was 0.2 ml and the bath solution was supplied and exchanged by a continuous perfusion system with a flowing rate of 1-1.5 mL/min. All experiments were carried out at room temperature (24-26 °C). The cells attached to the bottom of the chamber, were perfused with Ringer's solution. The hypoosmotic shock was evoked by perfusion of the cells with a hypoosmotic solution (200 mOsm/L) prepared by mix of the Ringer's solution and water (2:1 v/v).

To study the anionic channels involvement in the mechanism of RVD, Cl⁻ channels inhibitors such as NPPB, DIDS at 100 μ M and TAM 10 μ M were separately added in hypoosmotic solution. NPPB and DIDS are considered classical chloride channel blockers. For example, NPPB is potent Cl⁻ channel blocker and inhibits the swelling-activated Cl⁻ channels (51) and DIDS is one of the most nonspecific commonly used Cl⁻ inhibitors. It is effective in blocking of chloride channel CLC -2, CLC- 3 and CFTR (22). In an addition, the triphenyl-nonsteroidal anti-estrogens Tamoxifen (TAM) represent other class of Cl⁻ channel blockers that act selectively on volume-activated channels (8).

Cell images were captured at 1 min intervals, during 30 min by a CCD digital camera Moticam 2000 (Quimis, Diadema, SP, Brazil) attached to Leica DMIL inverted microscope. Each individual cell was later analyzed off-line using a freeware image analysis program (ImageJ, NIH, USA). The cross-sectional area of single cells was measured and their volume approximated assuming spherical geometry. Cell volume was computed from cell diameter and calculated using the equation:

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

where, S is the area (μm^2). The peak volume in hypotonic solution was assigned as (V_{max}). The cell volume v was normalized with respect to the original volume in isotonic medium (V_0) as follows:

$$v = V/V_0$$

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

2.4 Cell viability assay

Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to analyze the effect of the different Cl^- channels inhibitors such as NPPB (100 μM), DIDS (100 μM) and TAM (10 μM) on hWJ-MSCs viability. Cell suspension (1×10^4 cells/mL) was distributed into each well of flat-bottomed 96-well culture plate and incubated for 24 h in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C. After the incubations, inhibitors were added into each well. After 72 h of incubation, 20 μl of the MTT dye (5 mg/mL) was added into each well and incubated for 4 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . Thereafter, the medium was completely removed and 100 μl de DMSO was added into each well to dissolve the purple formazan crystals. Absorbance (expressed as optical density, OD) values of each well at wavelength 595 nm were recorded by an automated plate reader (Varioskan Flash Multimode Reader – Thermo Fisher). The negative control wells (only medium without cells and inhibitors) were used for zero absorbance. The OD values of the experimental groups were calculated as percentage relative to the control and expressed as mean \pm SE. Experiments were performed at least three times and

representative data were presented.

2.5 Cell proliferation assay

The studies about the growth cells were performed with P3 hWJ-MSCs in 24-well tissue culture plate (TPP, Switzerland). Cells seeded at 5×10^3 cells/well for 24 h and then incubated without (control) or with anionic channels inhibitors NPPB (100 μ M), DIDS (100 μ M) and TAM (10 μ M) up to 72 h. Cells were trypsinized and counted for 3 days consecutive using a hemocytometer. In each treatment and each time were realized triplicates. Quantity of the viable cells determined by trypan blue 0.4 % exclusion.

2.6 Cell Cycle Analysis

The cell position in the cell cycle can be estimated on the basis of the DNA content measurement. The proportion of cells in G0/G1, S and G2/M phases was obtained by analyzing cells for their different DNA content based on intensity of fluorescence (propidium iodide staining). Specific anionic channel inhibitors were added to the culture medium for 48 hours. After this time, cells were collected by trypsinization, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 70 % ethanol in low temperature (-20°C) for at least 60 min and stored at this temperature until required for analysis. Before analysis, cells pelleted from the ethanol, washed twice in PBS, centrifuged and resuspended in PBS to 1×10^6 cells/mL. Then, the cells were incubated with 50 $\mu\text{g/mL}$ propidium iodide-PI and RNase (20 $\mu\text{g/mL}$) at room temperature for 30 min shielded from light. Stained cells were analyzed by the flow cytometry (BD Accuri C6 – BD Bioscience). Ten thousand cells were analyzed for each cell population. Frequency distribution – DNA content histograms were drawn. Data were deconvoluted mathematically by the flow cytometer system software and percentage of cells in each cell cycle phase was quantified.

2.7 RNA Extraction and RT PCR analysis

Total RNA was extracted from hWJ-MSCs (P2-P3) using RNA easy mini kit following the manufacturer's instructions (QIAGEN, SP, Brazil). Reverse transcription (RT) was performed using SuperScript reverse (Invitrogen, Carlsbad, CA). The relative quantity from selected transcripts of three independent cDNA samples was assayed by quantitative Real-time

TaqMan RT-PCR (Applied Biosystems, CA, USA). PCR followed the cycling protocol: 50° C for 2 min, 95° C for 2 min, 40-45 cycles of 95° C for 15 sec and 60° C for 30 sec. Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the internal control.

The primers used are described in **Table 1**. Gene expression of the following Cl⁻ channels proteins: p1-VDAC (voltage dependent anion selective channel 1), CLCN3 (chloride channel, voltage sensitive 3), CLCA1 (chloride channel, calcium activated) have been investigated. For relative quantification, standard curves based on cycle threshold (ct) values were used to evaluate gene expression. The housekeeping gene (GAPDH) expression was used for normalization of the data.

Table 1. Primers of ion channels used in Real Time PCR

Gene	Accession number	Amplicon size (bp)
p1-VDAC	NM_0036624.1	143
CLCN3	NM_001829.3	76
CLCA1	NM_001285.3	165
GAPDH	NM_002046.4	122

2.8 Data analysis

Nonlinear curve-fitting programs (Origin Pro 8.1, Origin Lab Corporation) were used to perform curve-fitting procedures. Data obtained with the FACSCalibur flow cytometer were analyzed with CellQuest Pro Software (BD Biosciences, CA, USA). Unless otherwise indicated, data are presented as the mean \pm SEM of at least three separate experiments and, where appropriate, have been analyzed using Student's t-test or One Way ANOVA followed by post hoc test Tukey multiple comparison tests. A p-value less than 0.05 were regarded considered for statistically significant differences.

Results and Discussion

Characterization of hWJ-MSCs

The cultured cells showed adherence to the plastic and triangular fibroblastic or elongated, spindle-shaped morphology with a single nucleus. Images of hWJ-MSCs on the third passage (P3) a fibroblast-like phenotype is shown in **(Supplementary, Figure. 1 A and B)**. The cells proliferate well in vitro and the number of cells increased as the culture time passed. After treatment with trypsin-EDTA, the cells turned out to be ball-shaped **(Supplementary, Figure. 2)**. The Wharton's Jelly of human umbilical cord contains mucous connective tissue and fibroblast-like cells as shown in the previous studies (23,39,43,45).

Phenotypic acquisition of these cells at P3 was performed by FACS analysis. These cells produced homogeneous 70-80% confluent monolayer and were positive for specific mesenchymal antigens such as adhesion molecules (CD44), integrin markers (CD29), and extracellular matrix protein (CD90), were negative for CD34, CD45 (two of the major hematopoietic markers) and CD31 endothelial marker **(Supplementary, Figure. 3)**.

Next, we tested the differentiation potential that is one of important characteristics of mesenchymal stem cells. Three-four weeks after the osteogenic induction, the cells showed calcification and exhibited increased calcium accumulation as revealed by Alizarin Red staining **(Supplementary, Figure 4A)** that is not observed on the control conditions. The results confirmed the osteogenic differentiation which is characterized by the presence of mineralization of the extracellular matrix (23,43). In the presence of adipogenic induction medium, the hWJ-MSCs differentiated into adipocytes characterized by a large, round shaped morphology and accumulation of small lipid vacuoles stained with Red Oil **(Supplementary, Figure 4B)**. In the chondrogenic induction medium, the hWJ-MSCs differentiated into chondrocytes that showed cartilage-specific proteoglycan accumulation (Alcian Blue) **(Supplementary, Figure 4C)**. These results clearly demonstrated the classical features of MSCs (13). Recently, under various culture conditions, the MSCs have been found to be able to differentiate in culture not only to adipogenic, osteogenic, chondrogenic (43), but into several lineages such as neurogenic (30), myogenic (32), pancreatic (48) and hepatogenic (49), which indicates their multipotentiality.

RVD of individual hWJ-MSCs

It is known that several cell types function as miniature osmometers in response to osmotic stress (7, 10). To discover whether the hWJ-MSCs exhibit this behavior, initially we submitted the cells to hypotonic solution (**Figure 1**). The study was based on monitoring of volume increase and its recovery after hypotonic stress.

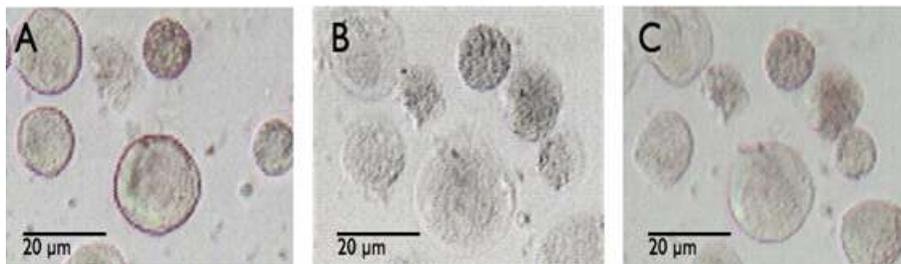


Figure 1. Regulatory volume decrease (RVD) in hWJ-MSCs. Phase-contrast images showed response of hWJ-MSCs to a hypotonic solution (200 mOsm). Cells in isotonic condition (**A, 300 mOsm**). Perfusion of the cells with 67 % hypotonic solution swelled the cells (**B, 200 mOsm, 1 min**). Cells swelling induced a regulatory volume decrease (**C, 200 mOsm, 30 min**).

The examination of RVD was done on single cells with simple geometry. Therefore, we demonstrated that hWJ-MSCs are able to accomplish RVD. To characterize RVD we evaluated the following parameters in relative units: determined the maximal swollen volume (a few minutes after osmotic change), the rate of cell shrinkage and the cell final volumes (V_f) attained by the end of the measuring period (30 min after the osmotic shift). Cells swelling reached a peak volume in approximately 1.0 min. After the peak of swelling, cells showed a subsequent RVD. Cell volume decreased gradually, though the cells were still bathed in hypotonic solution, but cells could not fully regain completely their original size. So, under influence of hypotonic solution (200 mOsm) the cells initially swelled to $113 \pm 3\%$ and gradually recovered their volume reaching the V_f ($104 \pm 1.3\%$). Characteristic recovery time for this process was 24 ± 3 min (**Figure 2A**). After studying the RVD kinetics of cells, anionic channel inhibitors such as NPPB (100 μ M), DIDS (100 μ M) and TAM (10 μ M) were tested to evaluate whether RVD induced by hypotonic solution is associated with chloride channels in hWJ-MSCs. It has been shown that all three blockers altered hWJ-MSCs response to hypotonic challenger and suppresses RVD process (**Figure 2 B, C, D**).

NPPB 5-nitro-2-(3-phenylpropyl-amino) benzoic acid (Cl^- channel blocker) inhibited

RVD (**Figure 2B**). In this case the initial increase of cell volume was practically equal ($112 \pm 2\%$) to control ($113 \pm 3\%$). However, the cells did not hold RVD and after the initial increasing their volumes remained practically the same during the entire recording period (30 min). The V_f (114 ± 1.2 , $N = 72$) was reached 30 min after the cells were placed in a hypotonic medium. When DIDS was added in the bath solution the cells showed reduction even of the initial volume increase (volume jump after osmotic change), only $105 \pm 0.9\%$, less than 8% if compared with control. Reaching the V_{max} ($111 \pm 1.3\%$, $N=63$) occurs in 30 min (much lower the control) and remained in this state during recording period. In case of TAM added in hypotonic solution, the increase in the initial volume was $110 \pm 1.2\%$ about 3% lower when compared to the control group. But at the end of the registration cell volume (V_{max}) achieved $138 \pm 2.4\%$ ($N=89$).

Results (**Figure 2 B-D**) shown that the cells in presence of Cl^- channel inhibitors increase volume, but did not recover during entire recording period (30 min) compared with cells in the control condition (**Figure 2A**). As result occurred complete block of regulatory volume decrease (RVD) process. These results suggest that the Cl^- efflux through the chloride channels is one of the key mechanisms for RVD in hWJ-MSCs and for recovery of cell volume in hyposmotic conditions. Reports have shown that extracellular applications of chloride inhibitors can block chloride channels and their effect varies depending on the cell type (22).

In this study, NPPB, DIDS, and TAM inhibited cells volume recovering (RVD) in hWJ-MSCs. Results indicate the presence and participation in RVD of Cl^- channels in plasma membranes of the cells, suggesting that mechanism of RVD is associated with the activation of chloride channels. It was found that nonspecific Cl^- channels blocker, 5-nitro 2-(3-phenylpropylamine) benzoic acid (NPPB, 10–100 μM) totally prevent RVD for rat trachea and nasopharyngeal carcinoma cells (9,21). It is known that these may be the result of inhibition the next chloride channels: ClC , $ClCA$ or $ClCN3$ (4) and $VDAC$ (3). The same results were obtained for human adipose tissue-derived stem cells (1).

The decrease in the amplitude of the initial sharp cell swelling in the presence of these three inhibitors (NPPB, DIDS and TAM) may indicate their ability partially block water influx too. This supposition is consistent with observation for instance that TAM (17) and CFTR inhibitor glibenclamide (GB) (50) can also to affect an aquaporins function. Seen especially in the presence of DIDS in response to a sharp decrease in osmolality of the buffer there is less swelling than in the control (8%), which is possible due to the effect on aquaporins. Until now,

there are few reports about whether Cl^- channel blockers also block aquaporin channels. However, the other possible mechanism of such effect of the anionic channel blockers is indirect one and based on the observation that water transport pathways may be structurally coupled to other membrane transport processes (6).

Our results in general agreement with studies of volume regulation in other cell types as Vero cells (10), nasopharyngeal carcinoma cells (7,21,44,54), cervical carcinoma cells (37).

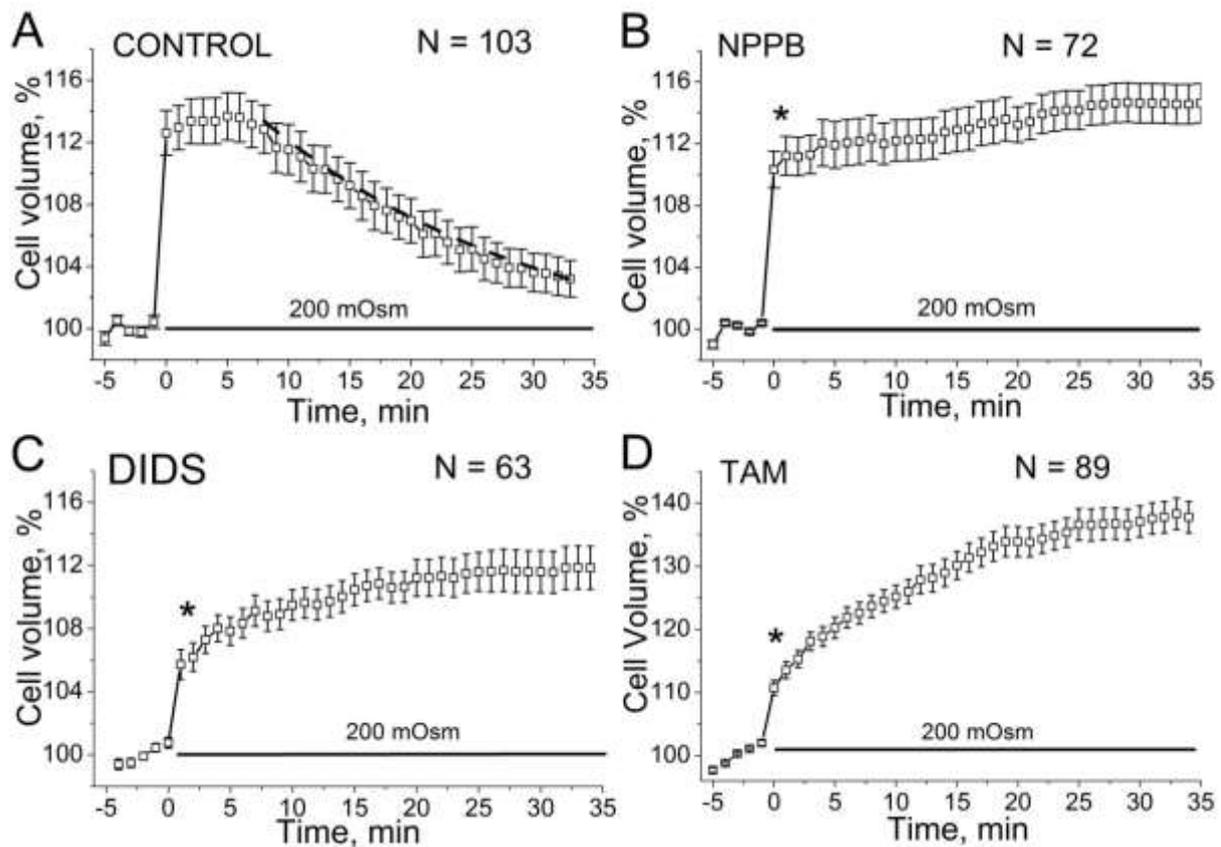


Figure 2. Regulatory Volume Decrease (RVD) in proliferating hWJ-MSC in control conditions (A) and in the presence of specific inhibitor of cellular anion permeability (B, C, D). NPPB and DIDS were used at concentration of 100 μM . Final concentration of TAM was 10 μM . The inhibitors were present in the hypoosmotic solution. The osmolality of the extracellular solution was switched from 300 to 200 mOsm/L after a few minutes of recording at isosmotic condition. Note the changes in RVD induced by pharmacological blockade of the cell membrane permeability. The horizontal line shows the exposure to hypotonic medium. Dashed curve demonstrate the exponential kinetic of cell volume restoration. The decreasing part of the volume recovered process in the absence of cell permeability inhibitors was fitted well with a single-exponential function: $V_i = V_\infty + (V_{\max} - V_\infty) * e^{-t_2/\tau_{rec}}$, where t_2 is the time since the

process of the volume decreasing started; V_i is the cell volume at the time, t_2 ; V_∞ is an attainable restored cell volume at the end of the RVD process; V_{\max} is the maximal cell volume under osmotic challenge. The characteristic time, τ_{rec} , of the process is equal to the time required to restore approximately 63% of the altered volume, in other words, when $(V_i - V_\infty)/(V_{\max} - V_\infty) = e^{-1} \approx 0.3679$. N is a number of cells in the experimental groups. The data are presented as mean \pm SE. *The difference between the volume of the whole populations of cells treated by inhibitors and the control is significant at $p < 0.05$.

The role of chloride channels on hWJ-MSCs proliferation

We examined whether different Cl^- channels inhibitors can influenced on hWJ-MSCs cell proliferation. Among these inhibitors, were tested NPPB, DIDS and TAM. These inhibitors are widely used as potent inhibitors of many different Cl^- channels in several cell lines (7,21,26,33,44,54). In MTT assay test, the proliferative abilities were evaluated by the normalized optical density (OD) value. As shown in Figure 3, application of DIDS and TAM inhibited modestly the cell viability (89.8 ± 2.9 % with DIDS and 96.4 ± 3.1 % in presence the TAM). However, in MTT study NPPB demonstrated a tendency to promote the proliferation of hWJ-MSCs (105.4 ± 2.0 % versus the control) (**Figure 3**). In many papers it has been shown that these blockers may attenuate the growth of different type of cells such as nasopharyngeal carcinoma cells (42), gliomas cells (33), and human ovarian cancer cells (27), by inducing of cell death. However, our results indicated that the blockers used in low concentrations did not significantly alter hWJ-MSCs viability and not caused significant cell death. So we did not observe a reliable difference between cells growth with inhibitors when compared to control.

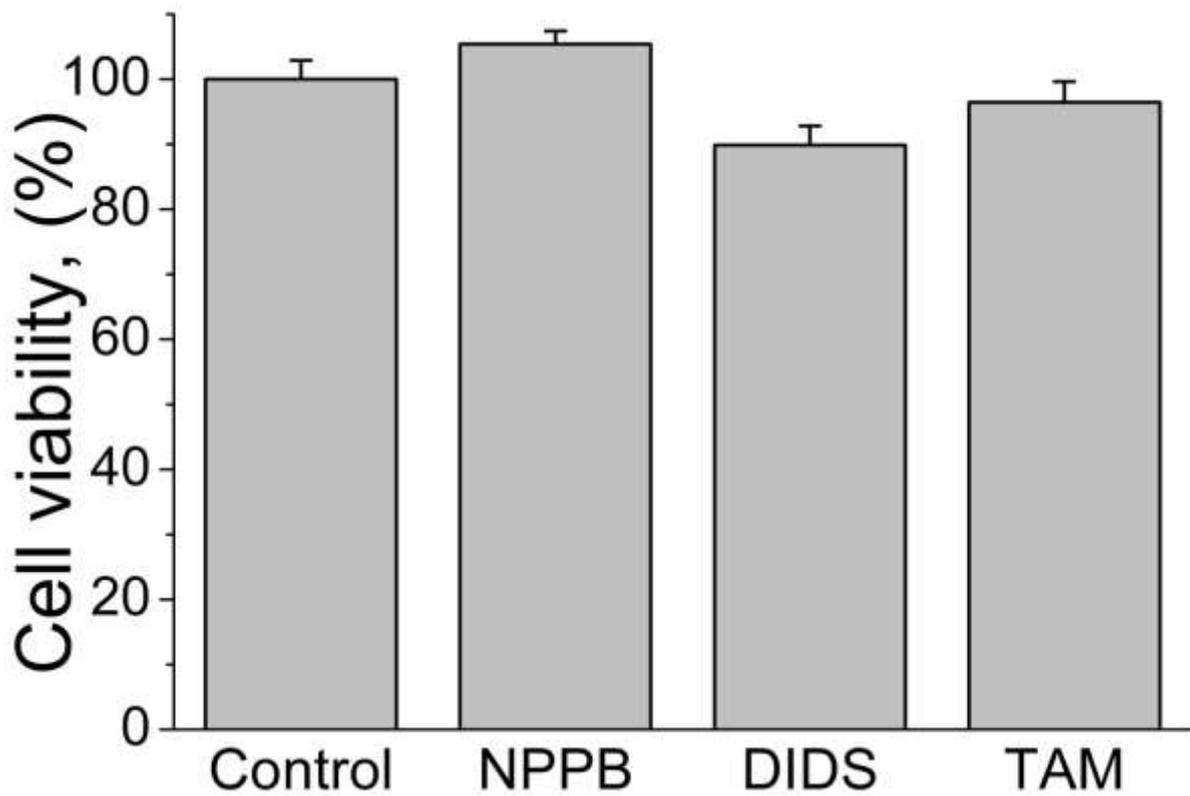


Figure 3. Influence of chloride channel blockers in cell viability. Absorbance values in the absence of blockers were normalized to 100%. Data represent mean values \pm SD of three replicates. No statistical difference between the viability of whole populations of cells treated by inhibitors and the control. One way ANOVA followed Tuckey pos hoc test, $p < 0.05$.

We evaluate hWJ-MSCs cell morphology in the presence of the chloride channel inhibitors NPPB, TAM and DIDS (**Figure 4**).

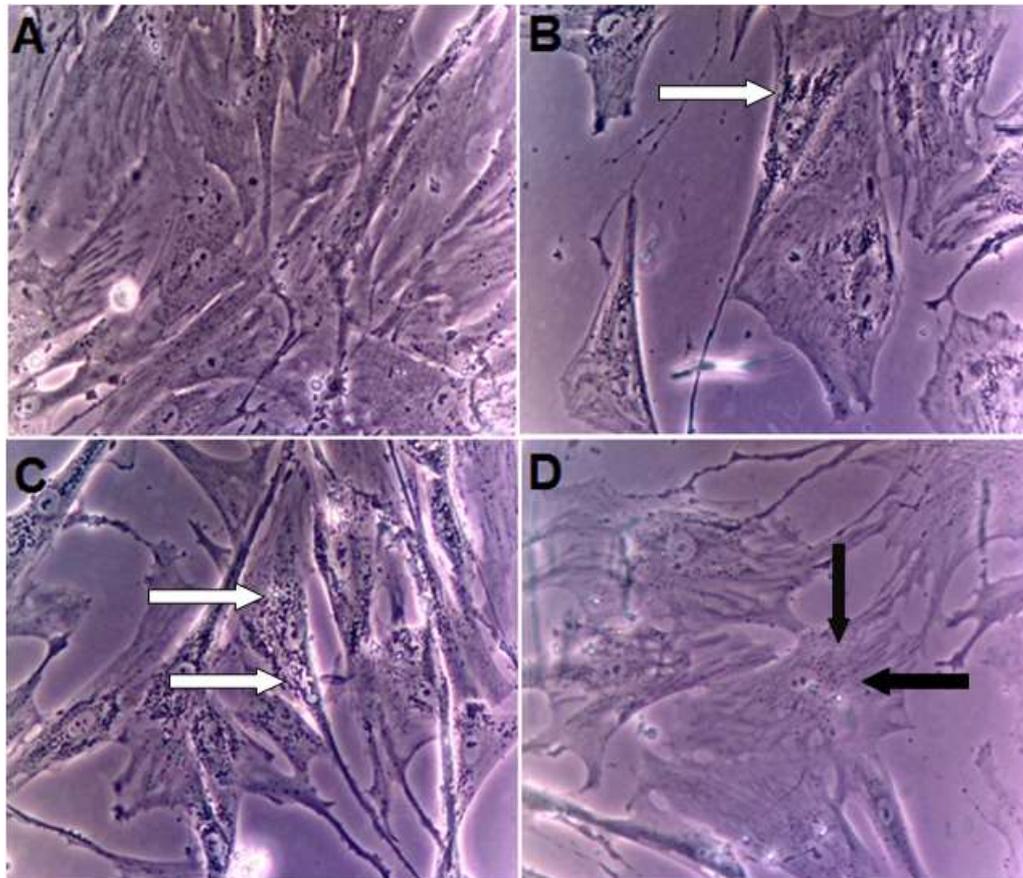


Figure 4. Optical phase contrast photomicrographs of hWJ-MSCs cultured in the presence of specific inhibitor of cellular anion permeability. Morphological aspects observed after 48 h of inhibitors addition (final concentrations of NPPB and DIDS were 100 μ M and TAM at 10 μ M). Amplification, 100x. **A.** Control: we noted confluent cells with elongated morphology **B.** NPPB, fibroblast like cells and **C.** TAM, cells with higher granularity (white arrows), **D.** DIDS, we observed the cells body larger and more widespread (black arrows). All photomicrographs scale bar: 200 μ m

The hWJ-MSCs treated with the inhibitors (mainly in the presence of DIDS) presented larger and more widespread cell body when compared with the control cells (**Figure 4 A and B**). In addition, their major features being the presence of granulating particles inside the cells and some small vacuoles in the presence the following inhibitors such NPPB and TAM (**Figure 4 B, C and D**).

Cell proliferation assay

The doubling time of cell growth of hWJ-MSCs is around 2.5 ± 0.5 days (**Figure 5**). The characteristic growth pattern of homogenous cell phenotype (hWJ-MSCs-P3) reduced twofold by the end of the experiment in the presence of all tested inhibitors (NPPB, DIDS and TAM), showing that anion channels have a functional relationship with this physiological parameter of these cells.

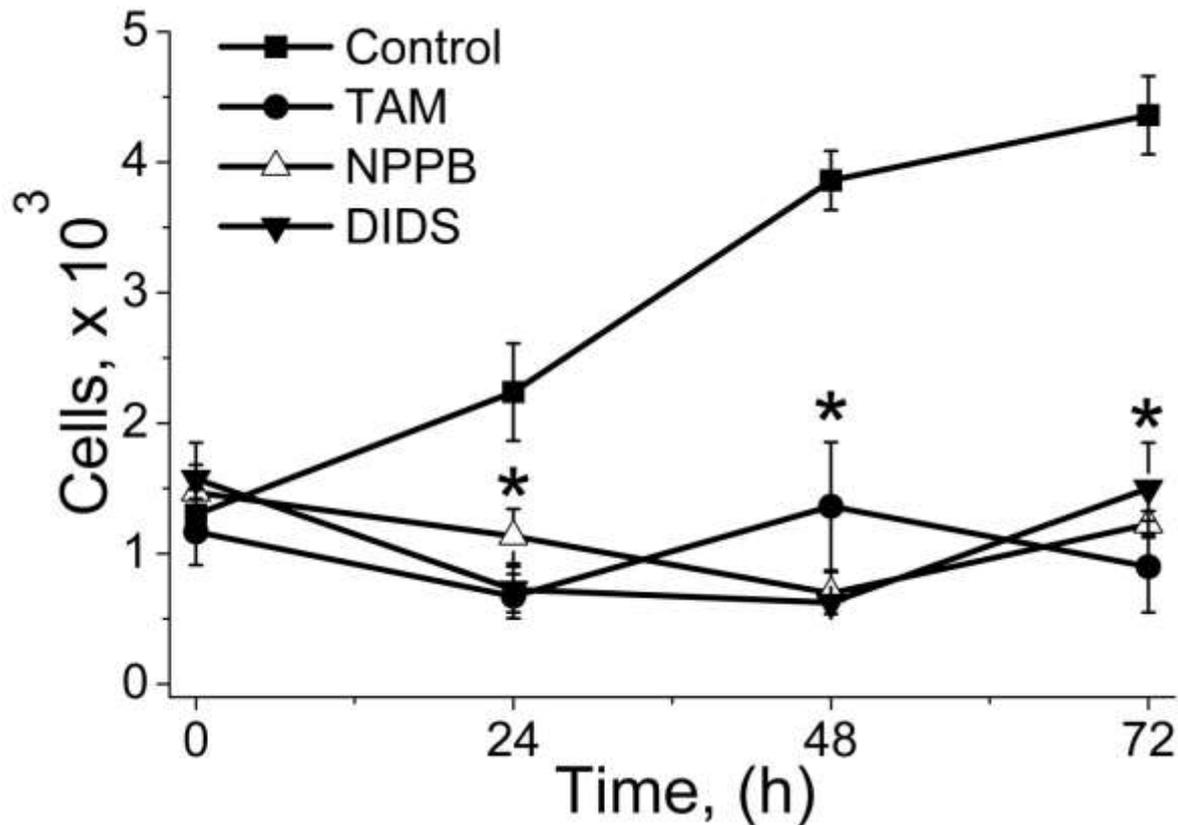


Figure 5. Time course of hWJ-MSCs proliferation in the presence of DIDS (100 μ M), NPPB (100 μ M) and TAM (10 μ M). Cell proliferation was assayed in duplicate using 24-well plates and at least three umbilical cords. The growing curves were initiated with $\sim 1 \times 10^3$ cells for each condition and viability at the indicated times was evaluated by the trypan blue method in control (■, without inhibitors), TAM (●), NPPB (△), DIDS (▼), conditions. Data are means \pm SE. * Data is statistically different of the control condition. Two way ANOVA followed Bonferroni test, $p < 0.05$.

The result suggests that this method was more sensitive for showing that the Cl^- channels play an important role in controlling hWJ-MSCs proliferation. Our data corroborate with previous studies using the same methodologies showing involvement of chloride channels in proliferation of MSCs (38). We found that the Cl^- channel blockers NPPB, DIDS and TAM, inhibited hWJ-MSCs cell proliferation. Thus, the involvement of chloride channels in regulation of cell proliferation in hWJ-MSCs was confirmed by our above experiments. Also it has been recognized the link between chloride channels and the proliferation in other cell types such as endothelial cells (41), nasopharyngeal carcinoma cells (42), gliomas cells (33), pulmonary artery smooth muscle cell (25), human ovarian cancer cells (27), cardiac myocytes (14), hepatocytes (47) and others types cells. Cell proliferation must, at some point, increase the cell volume cells

since all cellular organelles must be duplicated prior to cell division. Changes in cell volume really require participation of ion transport and rearrangements of the cell cytoskeleton (24).

The effect of Cl⁻ channel blockers on cell cycle

A convenient method for assessing cell cycle phase is flow cytometry because it allows analysis of a large number of cells rapidly, reliably and consistently. To study further, we used flow cytometric analysis to examine whether cell cycle of hWJ-MSCs could be influenced by Cl⁻ channel inhibitors. The inhibitors NPPB, TAM and DIDS were tested. To validate the method and to begin simultaneous proliferation of all tested cells we used the serum deprivation (0.4% - G0/G1), calpain (40 µg/ml - G1/S) and demecolcine (50 ng/ml- G2/M) (**Supplementary, Figure 5**).

The data showed that in the control group (without addition of inhibitors), the percentage of cells distributed in the G0/G1 phase of the cell cycle was 76.03 ± 2.5 % (n = 5). However, the population of cells in the G0/G1 phase increased slightly and significantly when cells were treated with the inhibitors of chloride channels. In the three groups of cells treated with anionic channel inhibitors – NPPB, DIDS and TAM - the number of cells in the G0/G1 phase increased to 80.16 ± 1.6 %, 82.10 ± 1.9 % and 82.02 ± 1.3 % by 48h, respectively (**Table 2**).

Table 2: Percentual of hWJ-MSCs in different stages of the cell cycle

Condition	G0/G1	S	G2/M
Control	76.03 ± 2.5 (n=5)	6.4 ± 1.4	17.41 ± 1.2
DIDS	$82.10 \pm 1.9^*$ (n=5)	4.3 ± 1.0	$13.26 \pm 1.4^*$
TAM	$82.02 \pm 1.3^*$ (n=5)	$3.8 \pm 0.5^*$	$13.20 \pm 1.4^*$
NPPB	$80.16 \pm 1.6^*$ (n=5)	5.2 ± 0.6	$14.42 \pm 1.2^*$

*Data is statistically different of the control condition. Two way ANOVA followed Bonferroni test, $p < 0.05$.

In parallel with the increase in the cell number in phase G0/G1, there is some decrease of cells in phases S and G2/M. The data are consistent with the slight decrease in cell proliferation under influence of all tested inhibitors at the end of cells cycle, indicating that the progress of the

cell cycle is suppressed (**Figure 6 and 7**). The observations suggest that anions channels play a key role in the modulation or control of cell cycle progression of hWJ-MSC.

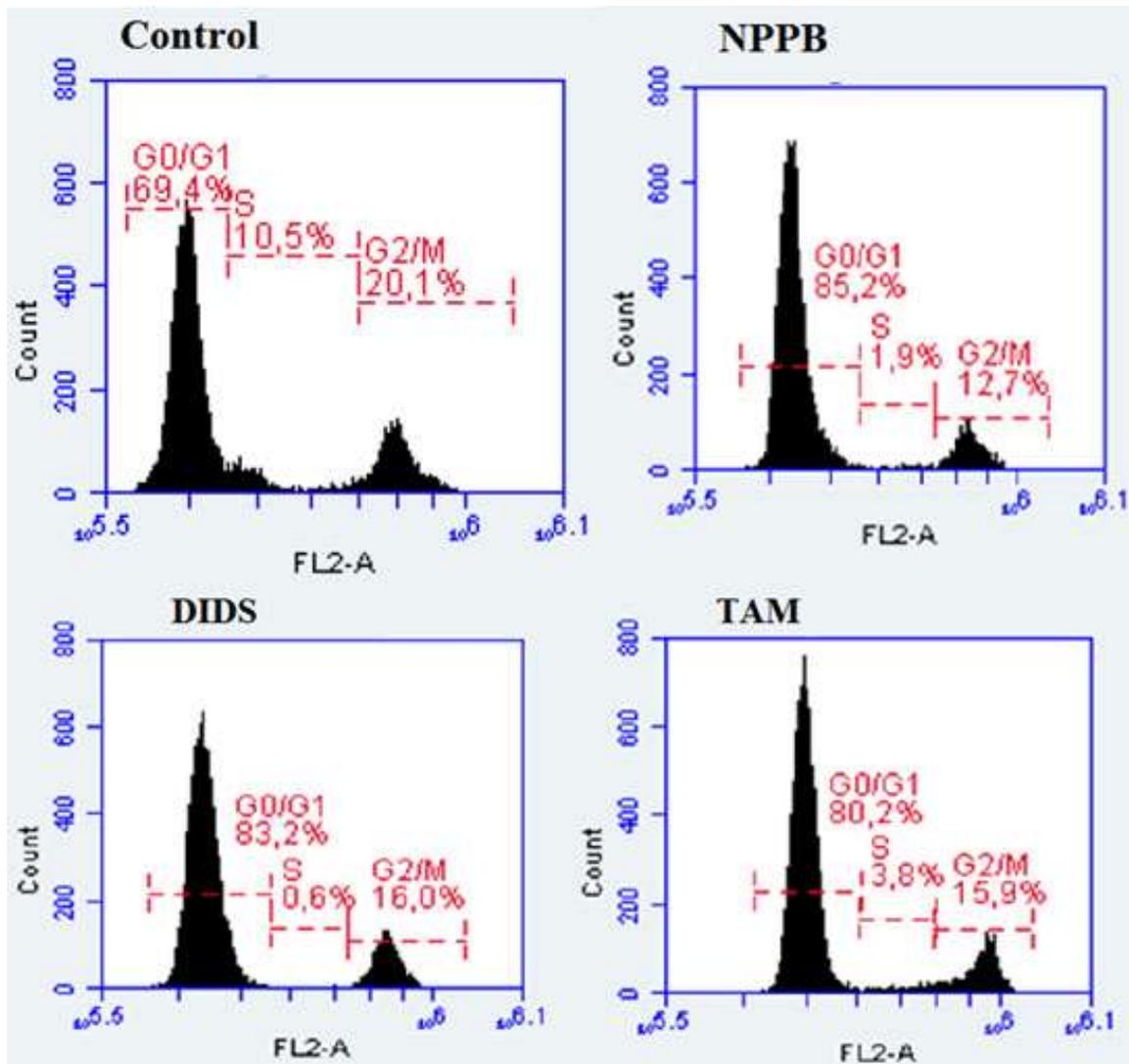


Figure 6. Typical flow cytometric analysis showing the histogram distribution of cell cycle phases. The first peak in the histograms represents G0 and G1-phase cells, and the second peak represents G2 – and M-phase cells. Between them are S-phase cells. **A.** Cells were incubated without any Cl⁻ channel blockers (control). **B.** Cells incubated in culture medium (NPPB, 100 μM). **C.** DIDS (100 μM). **D.** TAM (10 μM), for 48 hs. Inhibitors induced increase the cells number arrested in the G0/G1 phase and decrease of the cells arrested in the S and G2/M. For each sample 10.000 events were analyzed.

These results showed that blockage of chloride channels suppressed cell growth, but did not significantly induce cell death, suggesting that the blockers may suppress cell proliferation by a cell-death-independent mechanism. Data also suggest that the volume-activated chloride

channels play important roles in regulation of the cell cycle, especially in controlling cells to pass through the G1 checkpoint.

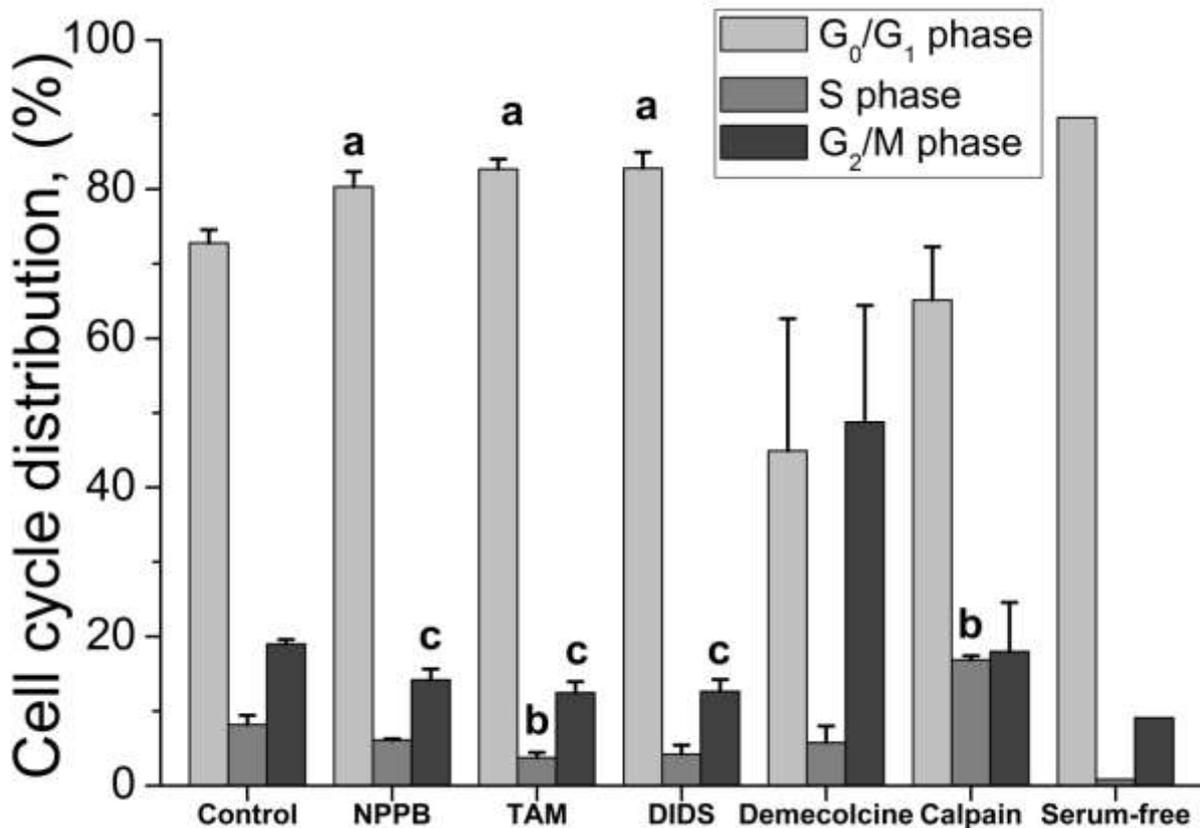


Figure 7. The effect of Chloride channel blockers in the percentage distribution hWJ-MSCs in the different cell cycle cellular phases. Population of hWJ-MSCs increased significantly in the G₀/G₁ phase in the presence of the three tested inhibitors: NPPB, 100 μ M; DIDS, 100 μ M; TAM, 10 μ M. The a, b and c indicated data is statistically different of the control condition. *Student T* test, at level $p < 0.05$. Data represent mean of five experiments.

Cell proliferation was correlated with level of RVD mechanisms too, as seen by other researchers (7,44). Potential role for ion channels in cell proliferation has been well documented across many cell types (2) including MSCs. Many drugs, found in various studies, presumably can be a specific ion channel blockers, and can also inhibit cell-cycle progression and often arrest proliferation at distinct stages of the cell cycle. Chloride channels may also regulate cell proliferation by affecting the expression of cell cycle regulators (including Ca^{2+} , ATP, cyclins, cyclin dependent kinases) or by regulating the intracellular pH and ion concentrations (17). For example, it has been reported that block of Cl^- channel with NPPB decreases cell proliferation in

mouse MSC by accumulated cells at G₀/G₁ phase (26) and that the effect is mediated by suppressing cyclin D and E (38).

Thus, it was observed that the progression of hWJ-MSCs through the cell cycle is significantly modified by influence of anionic channel inhibitors. Most studies described were carried out with potassium channels, but there is growing evidence that chloride channels are critically involved in cell cycle regulation (21,29,42), suggesting that the link between channel activity and proliferation also extends to this important class of channels.

Expression Cl⁻ channel – RT-PCR

The mRNA expression level of the genes that codifies the VDAC1, CICN3 and CICA1 proteins in hWJ-MSCs, were measured by quantitative PCR (qRT-PCR) in real time. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction of hWJ-MSCs mRNA identified a CICN3 and p1-VDAC anionic channels but the CICA1 absence (Data not showed). In other cells populations it is assumed that CIC-3 mediate swelling-induced outwardly rectifying Cl⁻ channels (). This suggests that CIC-3 or some other closely related Cl⁻ channels may mediate the effects of swelling of hWJ-MSCs. We have demonstrated for the first time that hWJ-MSCs express a significant level of a voltage-dependent anion channels (p1-VDAC1 and CICN3) (**Figure 8**).

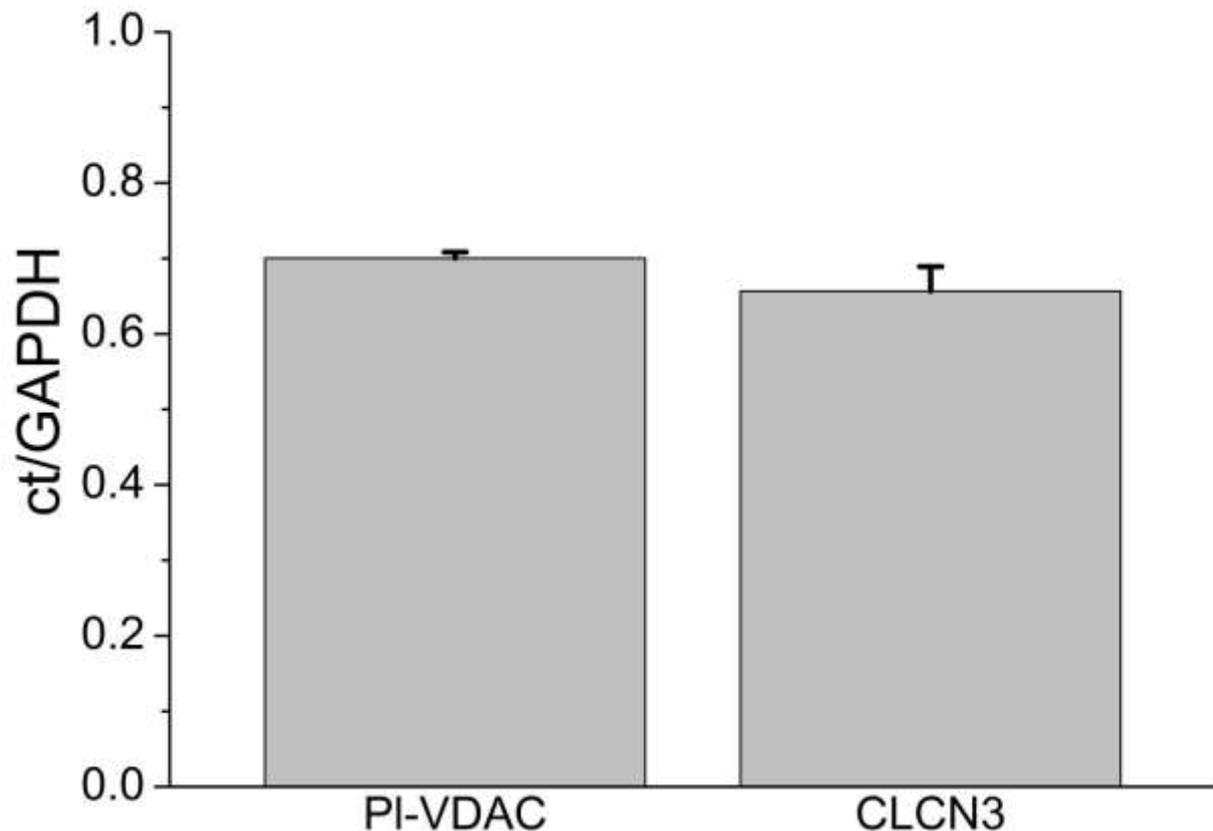


Figure 8. mRNA Expression of Cl⁻ channels in hWJ-MSCs. The data (means ± SD) were acquired by qRT-PCR using three umbilical cords (analyzed in triplicate) and normalized with GAPDH as internal control.

As the effects of anionic channels in regulation of the cell volume (RVD) and cell proliferation, the aim of this experiment is to identify whether those effects on the two cellular processes may be due to a reduction in the protein responsible in the formation of respective channels.

Our results showed a reduction in the expression of mRNA encoding the CLCN3 anionic channel in the presence of anion channel inhibitors (NPPB, DIDS and TAM) (**Figure 9**). It has been shown that one of the Cl⁻ channels gene expression (CLCN3) do not differ in control with cells grown in the presence of anion channel inhibitors used in all our experimental conditions. These results confirm that although the inhibitors at the used concentrations (100, 100 and 10 μ M) do not result in cell apoptosis, but as showed above, they may lead to changes in volume regulation due nonspecific inhibition of Cl⁻ anionic channels.

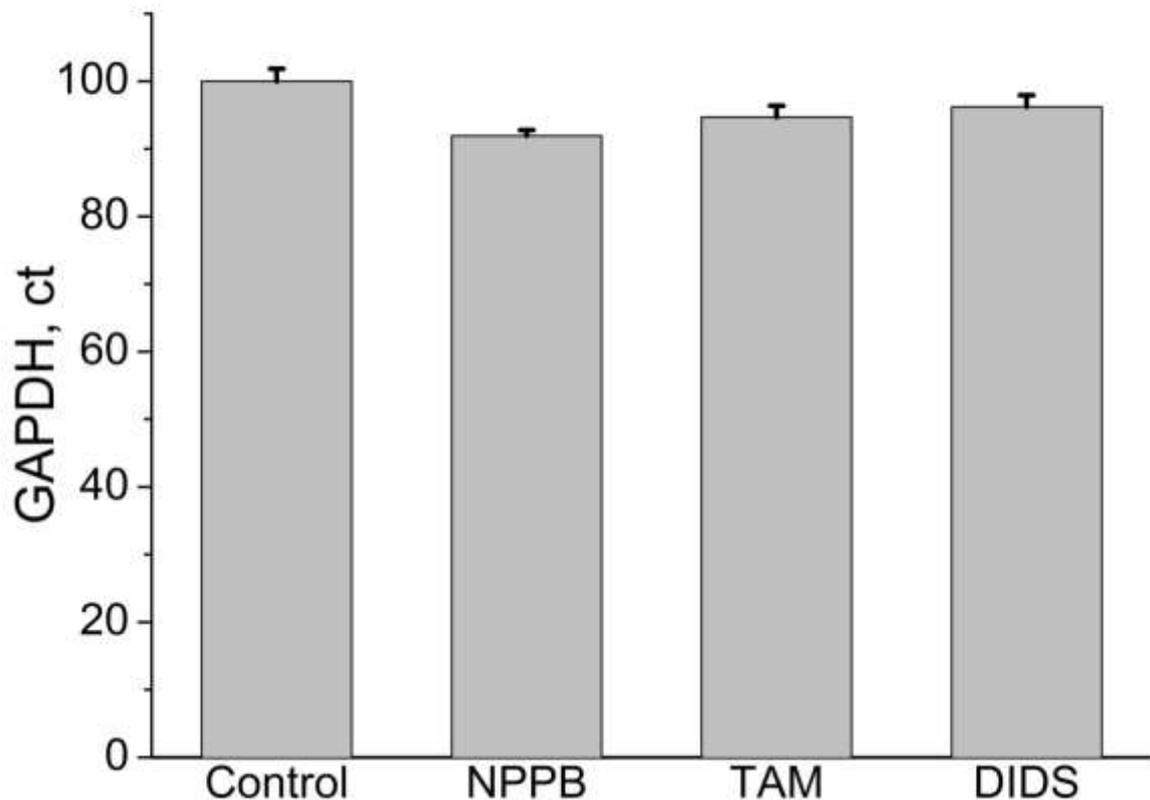


Figure 9. mRNA expression of *CICN3* channels in hWJ-MSCs in the presence of anion channels inhibitors (NPPB, TAM and DIDS). Data is no different of the control condition. Student T test, at $p < 0.05$.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). We are grateful to Hospital de Ávila for providing umbilical cords collections. This work was conceived in memory Doctor Oleg Vladimirovich Krasinikov.

REFERENCES

1. Bai X, Ma J, Pan Z, Song YH, Freyberg S, Yan, Y, et al. Electrophysiological properties of human adipose tissue-derived stem cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2007, **293** (5).
2. Becchetti, A. Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and Cell

- proliferation in cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2011, 301 (2), C255-C265.
3. Benítez-Rangel E, López-Méndez MC, García L, Guerrero-Hernández A. DIDS (4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate) directly inhibits caspase activity in HeLa cell lysates. *Cell Death Discovery.* 2015, 1, 15037.
 4. Berg J, Yang H, Jan LY. Ca^{2+} -activated Cl^- channels at a glance. *Cell Sci.* 2012; 125:1367-1371
 5. Blackiston DJ, McLaughlin KA and Levin M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell cycle.* 2009, 8 (21): 3519-3528.
 6. Blank M, Ehmke H. Aquaporin-1 and HCO_3^- - Cl^- transporter-mediated transport of CO_2 across the human erythrocyte membrane. *The Journal of Physiology.* 2003, 550(2): 419-429.
 7. Chen LX, Zhu LY, Jacob TJC, Wang LW. Roles of volume activated Cl^- currents and regulatory volume decrease in the cell cycle and proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Proliferation.* 2007. 40 (2), 253–267.
 8. Chen L, Wang L, Zhu L, Nie S, Zhang J, Zhong P, et al., Cell cycle-dependent expression of volume-activated chloride currents in nasopharyngeal carcinoma cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* 2002. 283 (4), C1313-C1323.
 9. Coelho RR, Souza EP, Soares PMG, Meireles AVP, Santos GCM, Scarparo H C, et al. Effects of chloride channel blockers on hypotonicity-induced contractions of the rat trachea. *Br J Pharmacol.* 2004; 141(2), 367–373.
 10. Da Silva MB, Costa VM, Pereira VR, de Albertim GJB, de Melo EB, Bezerra DP et al., Ion Channels in volume regulation of clonal kidney cells. *Cell Proliferation.* 2010. 43(6), 529-41.
 11. De Bruyn C, et al. A Rapid, Simple, and Reproducible Method for the Isolation of Mesenchymal Stromal Cells from Wharton's Jelly Without Enzymatic Treatment. *Stem cells and development.* 2011. 20(3):547-557.
 12. Ding F, Zhang G, Liu L, Jiang, L, Wang R, Zheng Y, et al. Involvement of cationic channels in proliferation and migration of human mesenchymal stem cells. *Tissue and Cell.* 2012. 44(6), 358-364.
 13. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International*

- Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006. 8(4):315-317.
14. Duan DY, Liu LL, Bozeat N, Huang ZM, Xiang SY, Wang GL et al., Functional role of anion channels in cardiac diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2005.26(3): 265–78
 15. Friedrich B, Matskevich I, Lang F. Cell volume regulatory mechanisms. In: Florian Lang (Ed.). Mechanisms and significance of cell volume regulation. First edition. Contrib Nephrol. Basel, Karger,. 152:1-8.
 16. Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int. J. Clin Pract*. 2004. 58 (12): 1134–1141.
 17. Guptarak J, Wiktorowicz JE, Sadygov RG, Zivadinovic D, Paulucci-Holthausen AA, Vergara L, Neet al., The Cancer Drug Tamoxifen: a potential therapeutic treatment for spinal cord injury. *J Neurotraum*; 2014. 31(3): 268-283.
 18. Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*. 2011. 9:12.
 19. Hille B. Ion Channels of Excitable Membranes, Third Edition, Sinauer Associates, INC. Sunderland, Massachusetts, USA. 2001.
 20. Hoffman EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiology Reviews*. 2009. 89 (1): 193-277
 21. Huang W, Liu M, Zhu L, Liu S, Luo H., Ma L, et al. Functional expression of chloride channels and their roles in the cell cycle and cell proliferation in highly differentiated nasopharyngeal carcinoma cells. *Physiological Reports*. 2014. 2 (9): e12137.
 22. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. *Physiology Reviews*. 2002. 82:503.
 23. Karahuseyinoglu S., Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO et al., Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells* 2007. 25(2):319–33.
 24. Lang F, Lepple-Wienhues A, Paulmichl M, Szabó I, Siemen D, Gulbins E. Ion channels, cell volume, and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem*. 1998. 8 (6): 285-292.
 25. Liang W, Ray JB, He JZ, Backx PH, Ward ME. Regulation of Proliferation and Membrane Potential by Chloride currents in Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Hypertension*, 2009;54: 286-293.

26. Li G R, Deng XL. Functional ion channels in stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 2011; 3(3) :19-24
27. Li M, Wang B, Lin W. Cl⁻channel blockers inhibit cell proliferation and arrest the cell cycle of human ovarian cancer cells. *Eur J GynaecolOncol*.2008; 29(3): 267–271.
28. Mao J, Chen L, Xu B, Wang L, Wang W, Li M et al., Volume –activated chloride channels contributed to cell-cycle dependent regulation of HeLa cell migration. *Biochem Pharmacol*. 2009; 77(2):159-68.
29. Michea L, Ferguson DR, Peters EM, Andrews PM, Kirby MR, Burg MB. Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2000; 278(2) F209-F218.
30. Mitchell K.E et al. Matrix cells from Wharton’s jelly form neurons and glia. *Stem cells*, 21(1): 50-60. 2003.
31. Pendersen SF, Kapus A, Hoffman. Osmosensory Mechanisms in Cellular and Systemic Volume Regulation. *J am Soc Nephrol*. 2011; 22: 1587-1597.
32. Pountos I, Giannoudis, PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury*. 2005. 36(3):8-12.
33. Ransom CB, O'Neal JT, Sontheimer H. Volume-activated chloride currents contribute to the resting conductance and invasive migration of human glioma cells. *Journal of Neuroscience*. 2001, 21(19):7674-7683.
34. Ritter M, Ravasio A, Jakab M, Chwatal S, Furst J, Laich A, et al. Cell swelling stimulates cytosol to membrane transposition of ICln, *J. Biol. Chem*. 2003; 278(50):50163-74
35. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010, 28(3):585-596.
36. Sardini RZ, Ameysa JS, Weylandt KH, Nobles M, Valverde MA, Higgins CF. Cell Volume regulation and swelling activated chloride channels. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1618(2): 153-162.
37. Shen MR, Droogmans G, Eggermont J, Voets T, Ellory JC, Nilius B. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *J. Physiol*. 2000, 529 (2):385-394.
38. Tao R, Lau CP, Tse HF, Li GR. Regulation of cell proliferation by intermediate-conductance Ca²⁺-activated potassium and volume sensitive chloride channels in mouse mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 295(5):C1409-C1416.

39. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*. 2008. 26:591-599.
40. Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, Stühmer W, Pardo LA. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos Trans R Soc Lond BBiol Sci*. 2014, 369(1638).
41. Voets T, Szücs G, Droogmans G, Nilius B. Blockers of volume-activated Cl⁻ currents inhibit endothelial cell proliferation. *Pflügers Arch*. 1995; 431(1):132-4.
42. Xu B, Mao J, Wang L, Zhu L, Li H, Wang W et al., ClC-3 chloride channels are essential for cell proliferation and cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2010; 42: 370-380.
43. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004; 22(7):1330-1337.
44. Wang L, Chen L, Zhu L, Rawle M, Nie S, Zhang J, et al., Regulatory Volume Decrease is actively modulated during the cell cycle. *J Cell Physiol*. 2002, 193(1): 110-119.
45. Watson N, Divers R, Kedar R, Mehindru A, Mehindru A, Borlongan MC, et al. Discarded Wharton Jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2015, 17(1) 18-24.
46. Willumsen NJ Ion channels in physiology, pathophysiology, and future drug Discovery. *Biotech International*. 2003; 18-22.
47. Wondergem R, Gong W, Monen S H., Dooley SN, Gonce JL, Conner TD et al. Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation. *J Physiol*. 2001; 532(3), 661–672.
48. Wu XX, Shao JZ, Xiang C. Generation of pancreatic β cells from mesenchymal stem cells to treat type 1 diabetes. *OA Stem Cells*. 2014; 2(1):5
49. Yang LM, Liu Y, Zhao J, Hao LM, Huang KX, Jiang WH. Characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells following tissue mass culture. *Cell Mol Biol*. 2014; 60(1): 12-18.
50. Yool AJ. Functional domains of aquaporin-1: Keys to physiology, and targets for drug discovery. *Curr Pharm Des*. 2007; 13(31) 3212-3221.
51. Zhang H, Cao HJ, Kimelberg HK, Zhou M. Volume Regulated Anion Channel Currents of Rat Hippocampal Neurons and Their Contribution to Oxygen-and-Glucose

- Deprivation Induced Neuronal Death. Launikonis B, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(2): e16803.
52. Zhang WQ, Zhu ZM, Chao YL, Lei Y; Cui J. Effects of hypotonic solution on the proliferation, alkaline phosphatase activity and $[Ca^{2+}]$ concentration of osteoblast-like cells. *Journal of Sichuan University*. 2007, 38(4): 649-652.
53. Zhanping W, Xiaoyu P, Na C, Shenglan W, Bo W. Voltage-gated K^+ channels are associated with proliferation and cell cycle of ovarian cancer cell. *Gynecol Oncol*. 2007; 104:455-460.
54. Zhu L, Yang H, Zuo W, Yang L, Zhang H, Ye W, et al. Differential expression and roles of volume-activated chloride channels in control of growth of normal and cancerous nasopharyngeal. *Biochemical Pharmacology*. 2012; 83:324-334.

Supplementary figure.

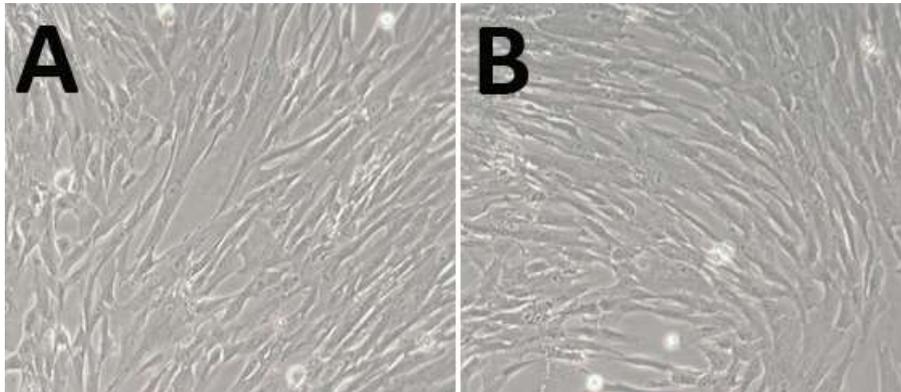


Figure S1. Phase contrast micrographs of hWJ-MSCs after 48hs of expansion in P3. The adherent cells reached 80-90% confluency and show the typical aspect fibroblastoid, appear elongated, triangular and spindle shaped (Amplification, 200x)



Figure S2. Morphology of hWJ-MSCs after treatment with trypsin - EDTA. Cells with rounded shape. Objective 40X.

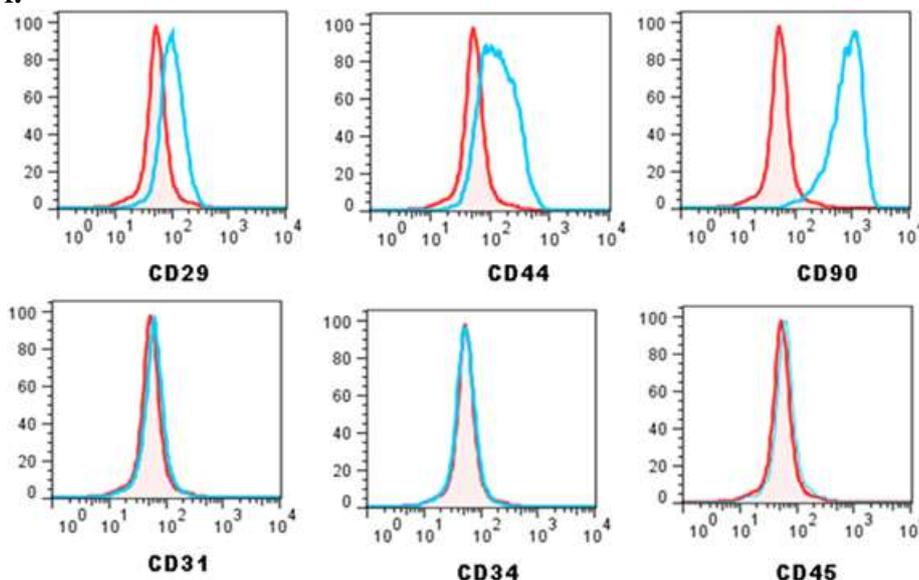


Figure S3. Immunophenotypic profile of hWJ-MSC. Flow cytometry histograms showing the immunophenotype of hWJ-MSCs that were obtained from the homogeneous confluent monolayer in third passage for mesenchymal, endothelial and hematopoietic markers. Control is show in red.

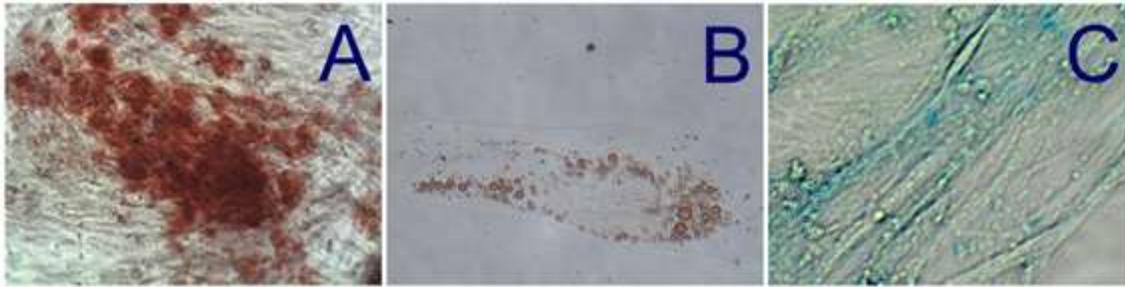


Figure S4. Three-lineage differentiation of hWJ-MSCs. A: hWJ-MSCs at passage third were cultured 3 weeks in medium for osteogenic differentiation evaluated with Von Kossa staining, due to calcium deposits B: Cells were cultured for 14 days in medium specifically designed for adipogenic differentiation and revealed with Oil red O staining clear seen the lipid vesicles . C: Chondrogenic differentiation was performed culturing hWJ-MSCs more than 3 weeks in specific culture conditions and revealed with Alcian blue. Scale bar: 20 μ m.

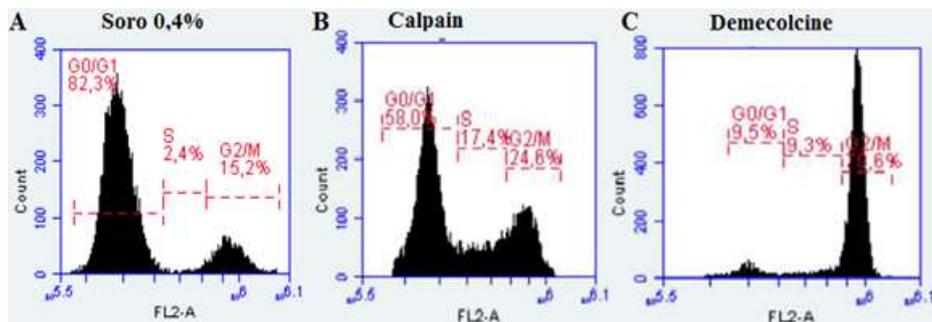


Figure S5. Typical flow cytometric analysis showing the histogram distribution of cell cycle phases. Cells were incubated with (A) serum deprivation (0.4%), (B) calpain (G1/S) and (C) demecolcine (G2/M) already known as cell cycle synchronizer (validate the methodology).

5.2 Manuscrito 2:

Mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of human umbilical cord: expression, function and physiological role of potassium channels

Gisely Juliane Barbosa de Albertim¹, Lindalva Layse de Lima Malagueta Vieira¹, Aldenise Lizandra de Miranda Oliveira¹, Darlene Paiva Bezerra¹, Williamis do Nascimento¹, Juliana Pereira Aguiar¹, Jéssica Varão Vasconcelos¹, Reginaldo Pereira da Silva¹, Valeria Rego Alves Pereira², Márcia Bezerra da Silva¹ and Cláudio Gabriel Rodrigues^{1*}.

¹Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

²Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, CPqAM/FIOCRUZ, Recife, PE, Brazil.

* Address correspondence to: Cláudio Gabriel Rodrigues¹.

Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil. Tel.: +55 81 2126 8535

E-mail: cgrufpe@gmail.com

Running Head: K⁺ Channels in MSCs of Human Wharton's Jelly

Keywords: Wharton's jelly; spontaneous migration; K⁺ channels expression; Regulatory volume decrease; Mesenchymal stem cells; patch-clamp recording

ABSTRACT

Advances in tissue regeneration studies require a understanding of the relationships between multiple interacting regulatory factors and their effects on cell function and tissue formation. In this study, the role of the potassium channels in mesenchymal stem cells of a human Wharton jelly (hWJ-MSC), in which such findings can be used for cell therapy, was investigated. Changes in cell volume following hypotonic stress were measured using a video-imaging technique. We demonstrated that hWJ-MSCs are moderately swell when subjected to a sustained hypotonicity from 300 to 200 mOsmol, but are able to undergo regulatory volume decrease (RVD) after hypo-osmotic shock swelling. With addition of the suitable K^+ channels inhibitors: tetraethylammonium (TEA), 4-aminopyridine (4-AP), glibenclamide (GB), iberotoxine (IBTX) - RVD was abolished. This method indirectly supported the importance of voltage-gated potassium channels (K_v), ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP}) and calcium-activated potassium channels ($BK_{Ca1.1}$), for hWJ-MSCs volume regulation. Besides the RVD, we also confirmed the presence of functional ion channels in cultured hWJ-MSCs with whole-cell patch clamp method and reverse transcription-polymerase chain reaction. The patch-clamp method confirmed the presence of Ca^{2+} -activated K^+ channel (IK_{Ca}) (blocked by iberiotoxin), a transient outward K^+ current (I_{to}) (inhibited by 4-AP) and a delayed rectifier K^+ current (IK_{DR}) (abolished by TEA). By the RT-PCR analysis, the RNA transcripts of slo1, KCND2, KCND3, KCNS1, KCNH2, KCNH1 were detected. These results demonstrated vital roles for the diverse outward K^+ channels transcripts found in hWJ-MSCs for their survival facing an osmotic shift and for their proliferation.

1. INTRODUCTION

Stem cells are defined as unspecialized cells that are capable of long term self-renewal and differentiation, under defined conditions, into specialized cell types (Augello et al., 2010) such as adipocytes, osteocytes, chondrocytes, neurons, hepatocytes (Park et al., 2006; Lee et al., 2004; Hou et al., 2003), cardiomyocytes (Wang et al., 2004), endothelial cells (Kestendjieva et al., 2008), insulin-producing cells (Wu et al., 2009), germ-like cells (Huang et al., 2010), dopaminergic neurons (Paldino et al., 2014), among others. The main function of these stem cells is to support normal repair and rejuvenation of diseased and aging tissues.

The non-hematopoietic somatic stem cells are frequently called mesenchymal stem cells (MSC). Emerging evidences suggest that MSCs are immunosuppressive (Tyndall, Gratwohl, 2009; Chen, Tuan, 2008; Ding et al., 2010), and can attenuate the autoimmune processes which usually lead to the destruction of own tissue (Anzalone R, et al., 2011). This capacity makes MSCs more attractive for regenerative medicine, since absence of the xenograft rejection could be an important step for moving from laboratory results to clinical cell therapy.

In humans, it is possible to obtain MSCs from different sources such as bone marrow (BM), skin, umbilical vein or Wharton's jelly from the umbilical cord (hWJMSCs) (Wang et al., 2004; Li et al., 2005; Park et al., 2007). In the last 10 years, the human umbilical cord (HUC) has been widely explored as a suitable source of MSCs since these have poor immunogenicity and did not induce tumor formation in immunodeficient mice (Gauthaman et al., 2012). Moreover, the obtainment of MSCs from HUC is: (i) less expensive and less invasive than those from the BM aspirate (last may cause infection, bleeding and chronic pain); (ii) it is free of ethical issues since HUC is an extra-embryonic organ usually discarded after birth without harm to mother or baby (Can, Karahuseyinoglu, 2007; Secco et al., 2008).

Ions channels are membrane protein structures responsible for ion and metabolite exchange between the extracellular environment and the cytoplasm and are widely expressed in different types of cells. Many experimental data about the role of ion channels in cell physiology have been obtained from the study of immortal tumor cells (Okada, 2006; Wehner, 2006; da Silva et al., 2010). The K⁺ channels already have been detected in MSCs from different sources (Li et al., 2005; Park et al., 2007; Wang et al., 2008, Li, Deng, 2011), however studies on their physiological relevance are still lacking and particularly there have been no studies of ion

channels in mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of HUC (hWJ-MSCs). So, the interest in detecting, measuring the ion channels activity and understanding their role is burgeoning.

Although most mammalian cells, including hWJ-MSCs, exist in a regulated and controlled environment *in vivo*, they can undergo osmotic challenges as consequence of water and salt imbalance, due to changes in intracellular concentrations of osmolytes, alterations of substrate transport or metabolic rate (Lang et al., 1998) and if a large volume of fluid used during critical illness (McManus et al, 1995). Since such osmotic perturbations induce cell volume changes, cells must quickly adjust their volume for normal function and survival. In low osmotic conditions cells swell, and immediately begins the post-swelling escape of cytosolic electrolytes through volume-sensitive ion channels and as result occurs cells re-shrinking by osmotically driven water loss. This process allows to cells, within certain limits, recover their original volume. The process of restoration of normal cell size under hypotonic stress is known as a regulatory volume decrease (RVD) and may be studied *in vitro* using hWJ-MSCs as a model. Therefore, understanding their adaptive mechanisms, especially those that guarantee their survival in hostile environments, are of a major relevance (Taghizadeh et al., 2011; Batsali et al., 2013).

In this context, K^+ channels play important roles in maintaining cellular homeostasis under different challenging environmental conditions, because volume regulation together with survival and growing can be considered some of the most conspicuous K^+ channels-dependent processes (Yingjung and Xun, 2013).

So, the present study was designed to clarify potential role of the K^+ channels in volume regulation and eletrophysiological properties of hWJ-MSCs. It was performed proliferation assay, RVD, qRT-PCR expression of mRNA of ion channels and whole-cell patch clamp studies.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Isolation and primary culture of hWJ-MSCs

Fresh human umbilical cords (HUCs) of both sexes were obtained from mothers who received Cesarean sections (38-40 weeks). The research protocol for all procedures was approved by the Ethics Committee at Federal University of Pernambuco, Brazil (protocol

number 49503715.0.0000.5208). The mesenchymal cells were purified by the method of Paldino et al., 2014. Adherent cells were trypsinized, harvested, counted and were then expanded until passage 3 (P3). hWJ-MSCs (P3) were analyzed phenotypically and used for subsequent studies of differentiation capacity, ion channel expression and function. All materials were from Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo., USA) unless otherwise stated.

2.2 Phenotype analysis by flow cytometry

For cell surface antigen phenotyping, third-passage cells were detached and stained with various combinations of saturating amounts of monoclonal antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE). Standard flow cytometry techniques were used to determine the typical cell surface epitope profiles and to characterize them as MSC. Cells aliquots (5×10^4 cells/100 μ L) were incubated with primary antibodies at 4 °C for 60 min. These primary antibodies were either FITC- or PE-labeled anti-human monoclonal antibodies: CD90-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD44-FITC or CD29-FITC (Southern Biotech, Alabama, USA); CD45-PE, CD34-PE, CD31-PE (FK Biotec, RS, Brazil). Cells incubated (30min at 4°C) with diluted (1:10.000) normal mouse serum were used as negative control. Flow cytometry was performed on a fluorescence-activated cell sorter (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and data analysis was performed with FlowJo software (Version 7.6.1, Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

2.3 Osteogenic differentiation

Osteogenic differentiation (Karahuseyinoglu et al., 2007) was induced by culturing subconfluent P3 hWJ-MSC populations in low-glucose DMEM (LG-DMEM) growth medium (Invitrogen Brasil Ltda, SP) supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 10 mM β -glycerophosphate (Fluka-Sigma-Aldrich, MO, USA), 0.1 μ M dexamethasone (Medley S/A, SP, Brazil), and 200 μ M ascorbic acid (LAFEPE, PE, Brazil). The LG-DMEM medium was changed completely every three days for 21 days. Cells of the control group were cultured in LG-DMEM plus 10% FBS for three weeks. To establish the mineralization, the calcium deposits in cells cultures were stained with Alizarin red (Sigma-Aldrich).

2.4 Adipogenic differentiation

Adipogenic differentiation (Zuk et al., 2002) was induced by culturing P3 hWJ-MSCs populations in LG-DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 100 nM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 0.2 mM indomethacin (DEG, Hong Cong, China), and 10 µg/ml human insulin (Sigma). Cells were fed with complete replacement of the medium on alternate days for 14-21 days. Cells of the control group were cultured in LG-DMEM plus 10% FBS (control medium). Adipogenesis of hWJ-MSCs was assessed by staining cells with Oil Red O (Sigma-Aldrich).

2.5 Chondrogenic differentiation

For chondrogenic differentiation (Secco et al., 2008), 10% FBS, 15mM HEPES, 6,25µg/mL human insulin, 10ng/mL TGF-β and 50nM ascorbic acid, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin were added to the LG-DMEM medium. During 14 days, 50% of the medium was replaced twice each week. Cells cultured without differentiation factors were used as control. Before staining, the cells were washed with deionized water and then incubated for 5 minutes at room temperature with Alcian Blue for the cartilage-specific proteoglycan examination in chondrogenic cells. The dye was removed and cells were washed several times with deionized water. All differentiated cells were observed in an inverted microscope (Leica DMIL; Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany) and images were acquired with a CCD video camera (Motic 2000; Quimis, Diadema, SP, Brasil) attached to the microscope.

2.6. Reagents

The K⁺ channels inhibitors tetraethylammonium (TEA) (classical blocker of potassium channels ATP-dependent), 4-aminopyridine (4-AP) (selective blocker of members of family of voltage-activated K⁺ channels), glibenclamide (GB) (blocker of channel potassium ATP-dependent), and iberiotoxin (IBTX) (selective and reversible inhibitor of high-conductance calcium-activated potassium channels) were used as molecular tools. They were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and were dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide). The following inhibitors concentrations were used: TEA (10mM), 4-AP (5mM), GB (100 µM) and IBTX (10nM).

2.7 Reverse transcription-polymerase chain reaction

Cells used in this study were from the early passage 3 to limit the possible variations. TaqMan quantitative PCR was used to measure mRNA expression levels for three potassium channel of the different subtypes. Total RNA was extracted from hWJMSCs using RNeasy mini kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, São Paulo, Brazil). Reverse transcription was performed with superScript reverse (Invitrogen Brasil Ltda, SP, Brazil). The relative quantity from selected transcripts obtained from three independent cDNA samples was assayed by quantitative Real-time TaqMan RT-PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). PCR was conducted with the following cycling protocol: 50° C for 2 min, 95° C for 2 min, 40–45 cycles of 95° C for 15 s and 60° C for 30 s. The expression level of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the internal control. The primers used are described in **Table 1** (Supplementary Material). The gene expression of the following K⁺ channels was investigated: slo1 (large conductance calcium-activated potassium channel, subfamily M, beta member 1), KCND2 and KCND3 (voltage-gated potassium channel, subfamily D), KCNS1 (voltage-gated potassium channel delayer-rectifier, subfamily S), KCNH2 and KCNH1 (voltage-gated potassium channel, subfamily H, Eag related - EAG1, KCNA7 (voltage-gated potassium channel, subfamily A) and KCNK5 (voltage-gated potassium channel, subfamily K). For relative quantification, standard curves based on cycle threshold (ct) values were used to evaluate gene expression. The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression was used for normalization of the data.

2.8 Preparation of cells for volume measurements and current recordings

hWJ-MSCs, from passages P3, cultured in flasks were harvested with 0.2% trypsin plus 1mM EDTA solution, centrifuged, and re-suspended in DMEM. The cell suspension was kept at 25° C and used the same day. For cell volume recordings, an aliquot of the suspension was transferred to a 0.5ml flow chamber, designed for rapid exchange of medium, mounted on the plate of inverted microscope (Leica DMIL; Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany) for 15–20 minutes. Cells attached to the bottom of the chamber were subsequently superfused with Ringer solution (130 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 2.8 mM KCl and 10 mM HEPES/TRIS, pH 7.4). Hypoosmotic stress was evoked by perfusion of the cells with a hypoosmotic solution (200 mOsm/L) prepared by mixing Ringer solution and water (2/1, v/v).

Effects of reduction in bath electrolytes concentration was done by isoosmotic replacement prepared by mixing Ringer solution and mannitol (300mOsm/L) (2/1, v/v). To study potassium channel involvement in the mechanism of RVD, inhibitors TEA 10 mM, 4-AP 5 mM, GB 100 μ M and IBTX 10 nM were added to 200 mOsm-Ringer solution.

2.9 Cell volume measurements

Cell volume was measured using a video imaging system consisting of a CCD video camera (Moticam 2000, Quimis-Diadema, SP, Brazil) attached to Leica DMIL inverted microscope (Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Germany). Cell images were collected once per minute during the 30-minute recording. Each image was then analyzed off-line using a freeware image analysis program (ImageJ, NIH, USA). The measuring of the cross-sectional area (S , μ m) of single cells and volume calculation was done like da Silva et al 2010.

2.10 Electrophysiology

Patch clamp experiments were performed at room temperature (25 ± 1 °C), following standard procedures. Electrophysiological recording of ionic channels in hWJ-MSCs was done in the whole-cell configuration. Borosilicate glass electrodes (1.5 mm outer diameter; Sutter Instrument, Novato, CA, USA), were pulled with a microelectrode puller (model PP-830, Narishige, Tokyo, Japan) and had tip resistances of 3-5 $m\Omega$ when filled with a pipette solution (mM): 30 KCl; 110 Aspartate-K; 1 Tris; 5 $MgCl_2$; 4 ATP- Na_2 ; 2 $CaCl_2$; 5 EGTA; 0.1 GTP- Na_2 , pH 7.2 with Tris-OH (285 mOsm/L). The bath solution contained (mM): 130 NaCl; 2.8 KCl, 2 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$, 10 HEPES with the pH adjusted to 7.4 using Tris-OH and osmolality adjusted to 300mOsm/L with mannitol. The osmolality of the solutions was measured with an osmometer (Fiske Mark3, Fiske Associates, Massachusetts, USA). Tip potentials were compensated before the pipette touched the cell. Acquired membrane currents were measured with a patch-clamp amplifier (EPC8 – HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany), sampled and analyzed with an ITC-18 interface, and a personal computer running PatchMaster Lock-In Amplifier software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany).

2.11 Growth curves

Population-doubling assay was performed on hWJ-MSCs by passage 3 in 24-well tissue culture plates (Techno Plastics Products, Trasadingen, Switzerland). The cells were seeded at $\sim 5 \times 10^3$ cells/well. The culture medium was changed twice a week. Cell density was determined using a video imaging system consisting of a CCD video camera (Moticam 2000) attached to a Leica DMIL inverted microscope (Leica) and evaluated by counting the viable cells in triplicate using trypan blue exclusion. The number of cells in every three wells, in control and in the presence of each K^+ channel inhibitor (TEA, 4-AP, GB and IBTX) was counted daily for 3 days. The cell growth curve was then drawn according to these numbers.

2.12 Data analysis

Nonlinear curve-fitting analysis (Origin 8.1 Pro, Origin Lab Corporation) were used to perform curve-fitting procedures. Data obtained with the FACSCalibur flow cytometer were analyzed with CellQuest Pro software (BD Biosciences, CA, USA). Unless otherwise indicated, data are presented as the mean \pm SEM of at least three separate experiments and, where appropriate, have been analyzed using Student's t-test or One Way ANOVA followed by Tukey test, when appropriated. A *p*-value of less than 0.05 was adopted for statistically significant differences.

3. RESULTS

3.1 hWJ-MSCs characterization

We regularly obtained plastic adherent cell populations with shape fibroblastic or elongated, spindle-shaped morphology, with a single nucleus (**Suppl. Figure 1**). Cells proliferated well *in vitro*, and the number of cells increased as the culture time passed.

We have showed that more than 74-90% of the obtained cells at third passage expressed characteristic markers and had typical functional properties of MSCs. Phenotypic acquisition of these cells at third passage (P3) was done by FACS. It was established that the P3-cells are positive for the key specific mesenchymal stem cell phenotypic markers such as adhesion molecules (CD44), extracellular matrix protein (CD90) and integrin marker (CD29). The experiments revealed the presence of two cells populations. The dominant pool of the cells (74.4

$\pm 0.4\%$; $n=3$) possessed high-density of these antigens (the fluorescent intensity increased almost twenty-folds, 19.3 ± 2.1), in comparison with control level. Approximately a quarter of the cells ($25.6\pm 0.4\%$; $n=3$) appeared to have a lower density of CD90 and CD44 with the fluorescent intensity only 2.5 ± 0.4 folds above control level. Integrin marker (CD29) was homogeneously distributed among these cells, albeit at low density, with the fluorescence intensity increased similar to that seen for subsidiary pools in case of CD90 and CD44. The cells were negative for hematopoietic (CD34, CD45) and endothelial (CD31) markers. Thereby cell phenotype as assessed by FlowJo analysis could be defined as $CD44^+$, $CD90^+$, $CD29^+$ and $CD45^-$, $CD34^-$, $CD31^-$ (**Suppl. Figure 2**).

3.2 Differentiation potency of hWJ-MSCs

We have identified in HUC a population of stem cells with the ability to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes (**Suppl. Figure 3**). In osteogenic conditions, hWJ-MSCs showed phosphate deposition (Von Kossa/ hematoxylin-eosin) (**Suppl. Figure 3A**) and calcium salt deposits (2% Alizarin Red S, pH 4.2) that is not observed under control conditions. In adipogenic conditions, hWJ-MSCs accumulated intracellular lipid droplets, confirmed by Oil Red O staining (**Suppl. Figure 3B**). Cells cultured in chondrogenic conditions showed cartilage-specific proteoglycan accumulation (**Suppl. Figure 3C**).

3.3 Expression of potassium channels

We explored the expression of some of the most representative types of K^+ channels in hWJMSCs using qRT-PCR, including slo1, KCND2, KCND3, KCNS1, KCNH2, KCNH1, KCNA7 and KCNK5. **Figure 1** shows the presence of all these channels with the exception of KCNA7 and KCNK5. The slo1 or Maxi K channel is the most abundantly expressed in the hWJ-MSCs.

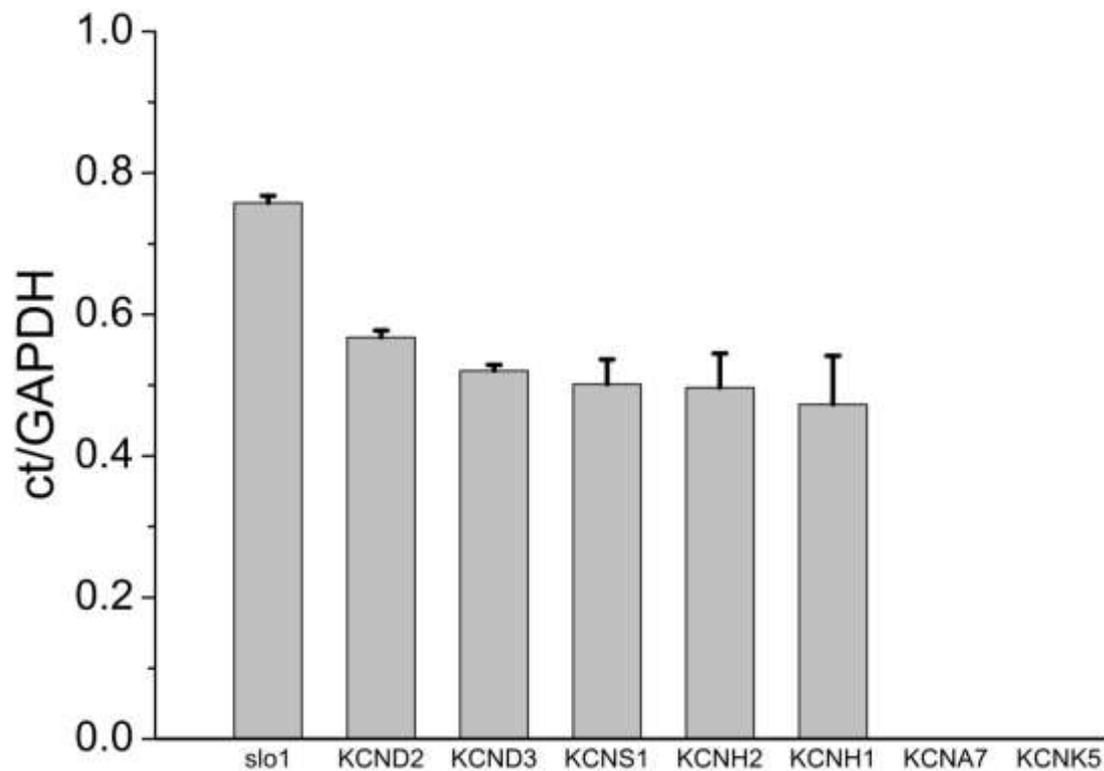


Figure 1. mRNA expression of K⁺ channels in hWJ-MSCs. The data (mean ± SD) were acquired by qRT-PCR (n = 3 assays) using different umbilical cords (n = 3) and normalized with GAPDH.

3.4 RVD of single hWJ-MSCs

The examination of RVD was done using single hWJ-MSCs with simple geometry (N=103) (**Figure 2A**). From the prepared P3 cell suspension, we usually used for the experiments round cells which are quickly attached to the bottom of the camera. Then they were subjected to osmotic shock (300-200 mOsm) or 33% of ion reduction in iso-osmotic conditions in the absence and presence of inhibitors. To characterize RVD, we used relative units to determine maximal swollen volumes, V_{max} , (0.5-2 minutes after osmotic shift), rates of cell shrinkage, and final volumes attained by the end of the measuring period (20-30 min after the osmotic shift). The addition of all used in our experiments ion channel inhibitors practically abolished RVD similar no hypo- and iso-osmotic condition.

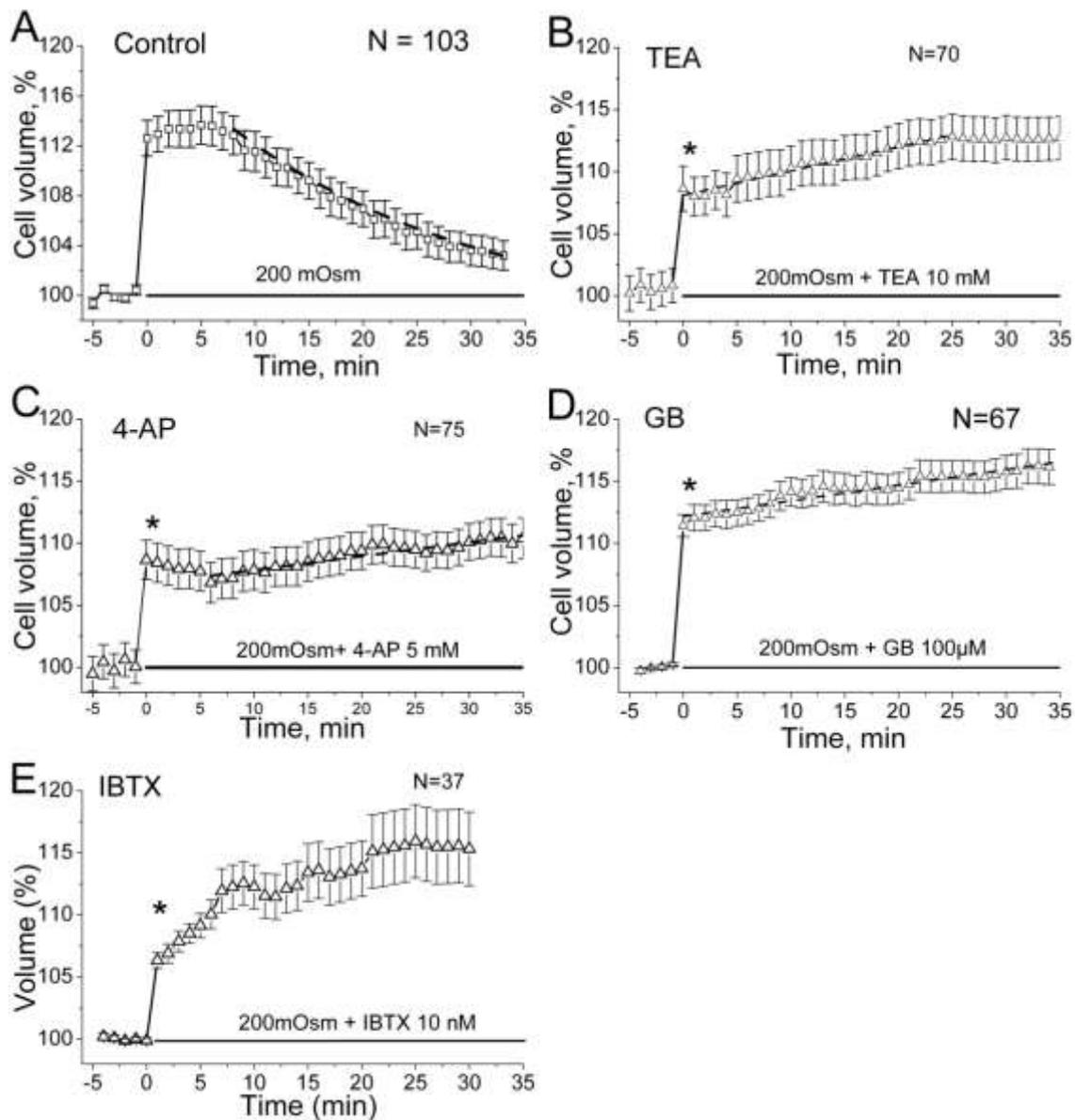


Figure 2. Blockade of K^+ channels hinders volume recovery of the hWJ-MSCs after an osmolar change. The RVD after the hyposmotic switch from 300 to 200 mOsm/l was recorded in cells from umbilical cords ($n = 3$) and calculated as described in the text. The experimental groups were as follows. **A:** Control, $n=103$ cells **B:** 10 mM TEA, $n = 70$ cells. **C:** 5 mM 4-AP, $n = 75$ cells **D:** 100 μ M GB, $n = 67$ and **E:** 100 nM IBTX, $n = 37$ cells. The horizontal line shows the exposure to hypotonic medium. Dashed curve demonstrate the exponential kinetic of cell volume restoration. The decreasing part of the volume recovered process in the absence of cell permeability inhibitors was fitted well with a single-exponential function: $V_i = V_\infty + (V_{\max} - V_\infty) * e^{-t_2/\tau_{rec}}$, where t_2 is the time since the process of the volume decreasing started; V_i is the cell volume at the time, t_2 ; V_∞ is an attainable restored cell volume at the end of the RVD process; V_{\max} is the maximal cell volume under osmotic challenge. The characteristic time, τ_{rec} , of

the process is equal to the time required to restore approximately 63% of the altered volume, in other words, when $(V_i - V_\infty)/(V_{\max} - V_\infty) = e^{-1} \approx 0.3679$. N is a number of cells in the experimental groups. The data are presented as mean \pm SE. *The difference between the volume of the whole populations of cells treated by inhibitors and the control is significant at $p < 0.05$.

3.5 Electrophysiology

Electrophysiological recordings were performed using ball-shaped cells obtained after trypsin - EDTA treatment. Membrane currents were elicited by the voltage protocol elicited by 300-ms voltage steps between -20 and $+60$ mV from a holding potential of -40 mV. The electrophysiological recording presents, at least, three different profiles compatible with: (i) noisy current as a Maxi K current (BK or Kca) (**Figure 3A**); (ii) transient outward K^+ current (Ito) (**Figure 3B**); (iii) a slower activating delayed rectifier (K_{DR}) (**Figure 3C**). Since all these are outward currents in the range of voltages tested, all of them seem to be carried by K^+ .

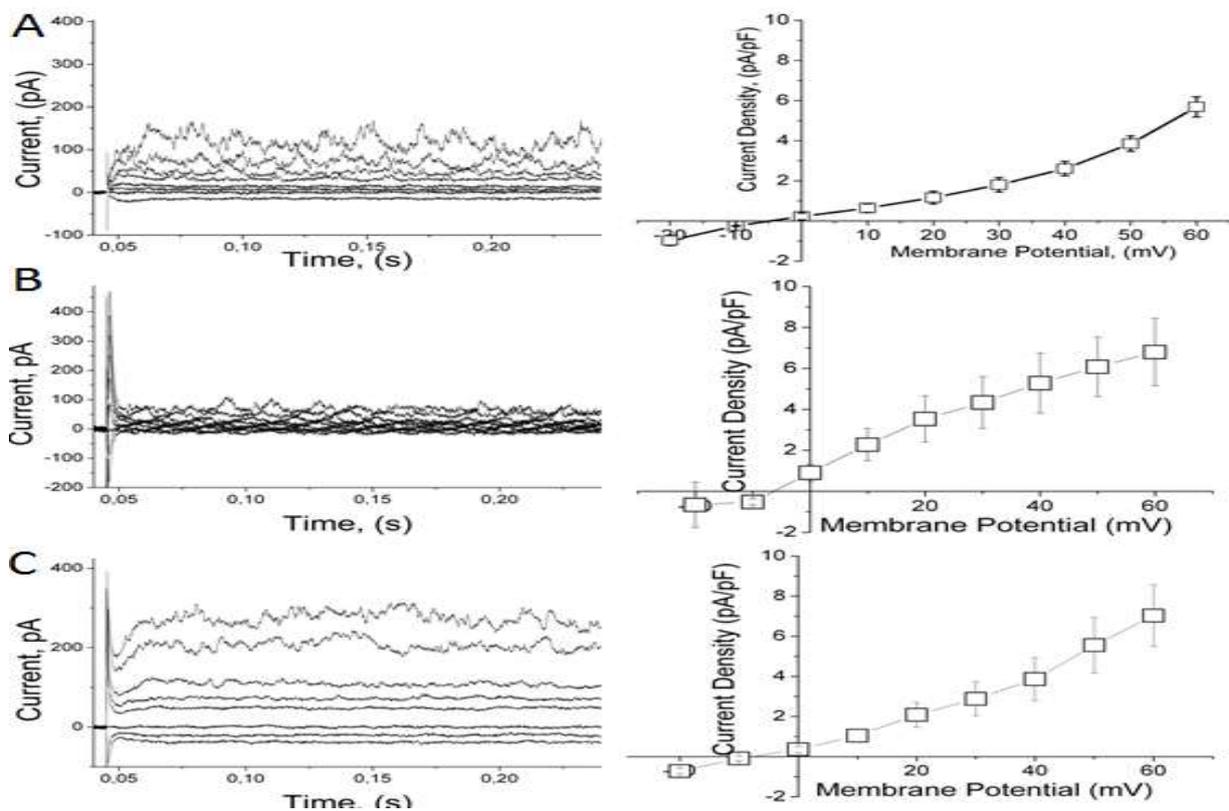


Figure 3. hWJ-MSCs present at least three different outward K^+ current components. **A:** Noisy current compatible with BK channels ($n = 9$ cells) **B:** Transient outward current compatible with $Kv4$ channels ($n = 9$ cells). **C:** Delayed rectifier current compatible with Eag/erg channels ($n = 9$ cells). Right panels show the corresponding current-voltage (I-V) relationships.

Figure 4A illustrates the classical traces recorded in an hWJ-MSC, which correspond to the K^+ currents described above in **Figure 3**. The Ca^{2+} -dependent K^+ channels blocker IBTX (100 nM) (**Figure 4C**), and the classical voltage-gated potassium channel blocker 4-AP (5 mM) (**Figure 4D**), remarkably reduced the magnitude of the outward currents activated by the depolarizing voltage steps. Qualitatively similar results were obtained under influence of TEA (10 mM), other widely used inhibitor for voltage-gated K^+ channels (**Figure 4E**).

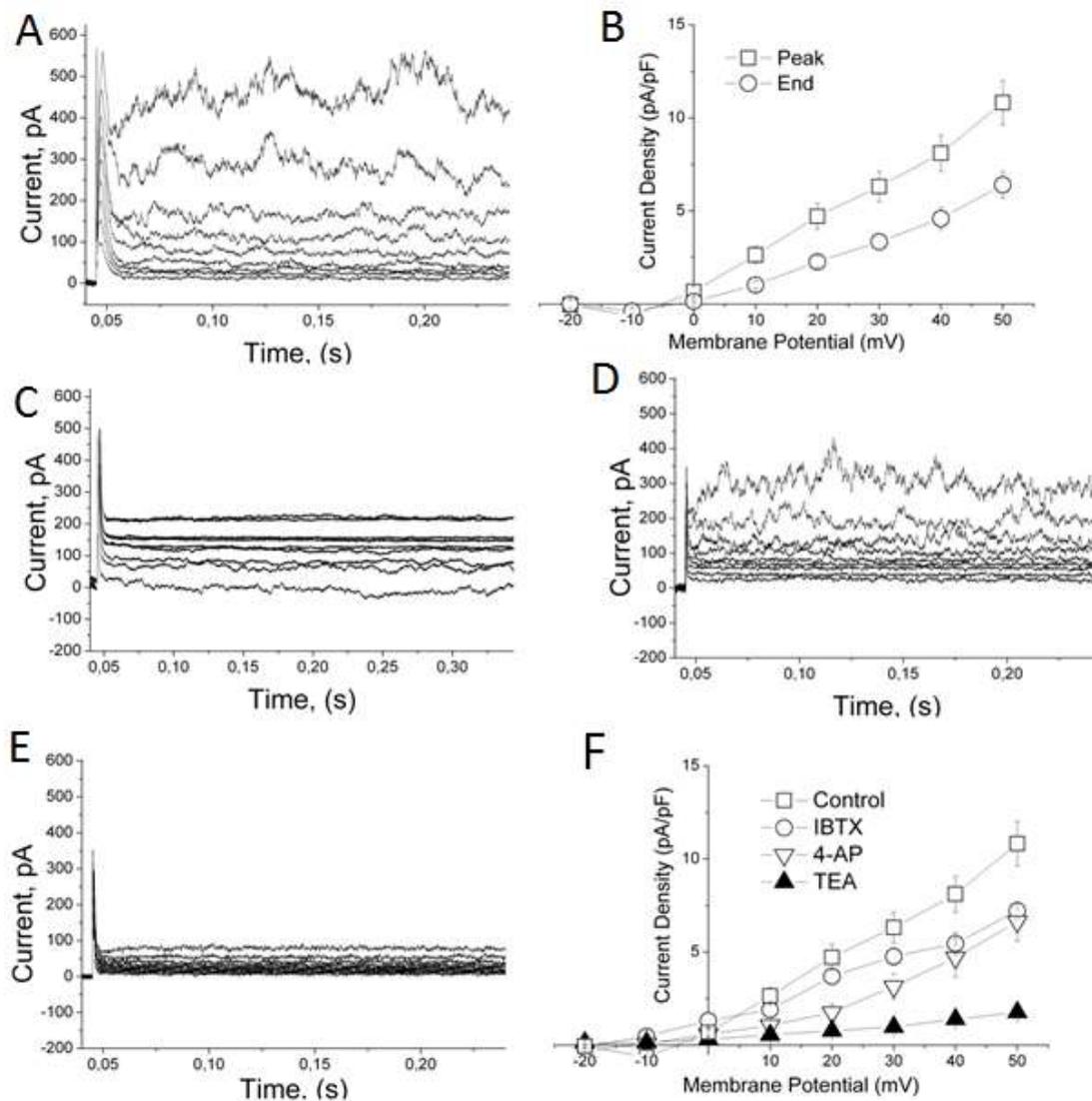


Figure 4 A: Representative current recording and current-voltage relationship of peak and steady state currents in control conditions; **B** I-V relationships **C:** Current recordings in control and in the presence of the different inhibitors in the presence of 100 nM IBTX; **D:** 5 mM 4-AP, and **E:** 10 mM TEA ($n = 6-9$). Data are mean \pm SEM. **F:** I-V relationships in control conditions, in the presence of 100 nM IBTX, 5 mM and 10 mM TEA 4AP.

3.6 Proliferation

The growth pattern of hWJ-MSCs was analyzed during 96h. Under control conditions a biphasic cell proliferation profile was observed. The four K⁺ channels inhibitors (IBTX, 4-AP, TEA and GB) impaired proliferation in different manner. Whereas IBTX sustainably stopped cell proliferation after the first phase (72hs), TEA induced a slow decrease in the number of viable cells in culture, and 4-AP and GB drastically decreased the cell number at the end of the first phase (**Figure 5**). All inhibitors showed significant difference compared to control in time of 96 hours.

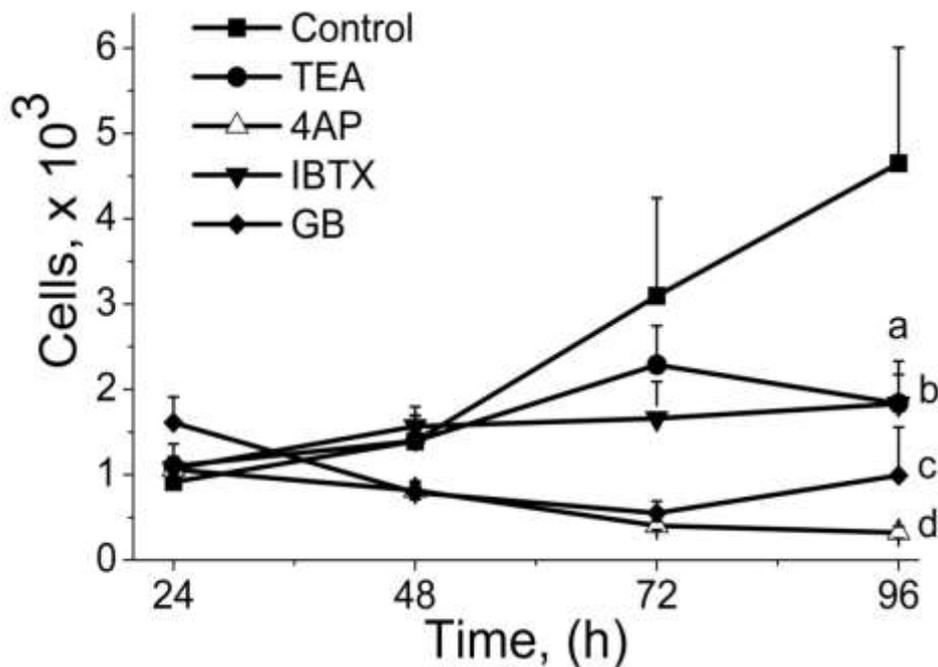


Figure 5. Time course of hWJ-MSCs proliferation. Cell proliferation was assayed in duplicate using 24-well plates and different umbilical cords (n = 3). The growing curves were initiated with $\sim 1 \times 10^3$ cells for each condition and viability at the indicated times was evaluated by the tripan blue method in control (no inhibitors), or in the presence of the K⁺ channel blockers 5 mM 4-AP, 10 mM TEA, 100 μ M Gb or 100 nM IBTX. Data are mean \pm SEM, different letters indicate statistical difference ($p < 0.05$) compared to the control. Two way ANOVA followed Bonferroni test, $p < 0.05$

4. DISCUSSION

The interest for to study human Wharton jelly mesenchymal stem cells (hWJ-MSCs) burgeoned because they retain some of the inherent properties of embryonic stem cells: to renew and differentiate into various lineages of tissues, including adipocytes, chondrocytes, osteocytes, cardiomyocytes, and neurons. For these reasons, hWJ-MSCs have drawn considerable interest as useful materials for tissue engineering and cell-based therapy. Wharton jelly mesenchymal stem cells reside in specialized microenvironments (niche) in the cord tissue but they can undergo osmotic perturbations either under isotonic environment due to changes in intracellular concentrations of osmolytes or in hypo-osmotic conditions as consequence of water and salt imbalance. Umbilical cord compression and in a case of a large volume of fluid used during critical illness provided the high water permeability (Lang et al., 1998; McManus et al., 1995). Therefore, to study the behavior of these cells during the isolation, cultivation and modeling of abrupt changes in the physiological parameters of the environment is of particular interest. Cell membranes are completely permeable to water molecules through aquaporins and by simple diffusion, but almost impermeable for charged molecules (Reuss, 2012). Therefore, changing the osmotic pressure gradient across the cell membrane leads to the transport of water molecules and ions according to the gradient.

Water and channel-mediated trans-membrane ions movement is a key process in recovery of volume by swollen cells under hypo-osmotic stress. Despite of spectacular progress in the study of the diversity of the channels, their participation in mesenchymal stem cells homeostasis and volume regulation has not been yet well studied.

In this report, we has been shown that obtained cells at third passage expressed characteristic markers and had typical functional properties of hMSCs, including differentiation capacities (**Supplementary Figure 2 and 3**). Also, we demonstrated that several K^+ channels at the mRNA were present in undifferentiated hWJ-MSC (Figure 1). A maxi-K (potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1), responsible for iberiotoxin-sensitive outward current was highly expressed. The presence of potassium voltage-gated channel subfamily S (Kv9.1) member 1, known like KCNS1, also was confirmed, albeit in lower intensity. The observation that hWJ-MSCs do not express either KCNK5 or KCNA7 channels (**Figure 1**), which are present in MSCs derived from human umbilical vein (Park et al., 2007), opens the possibility that the distinct immunoregulatory properties – which have been

described in MSCs from different sources – rely in fine-tuned rapid processes of K^+ movements across the membranes (Kuras et al., 2012). Therefore, distinct K^+ channels expression could help choosing the more appropriate MSCs in different and specific research and therapeutic strategies (Hoogduijn et al., 2014).

The hWJ-MSCs in suspension (*in vitro*) are spherical and are subject to radial deformations during hypo-osmotic (66% of control) conditions. Firstly the volume of cells is growing due to osmotic transmembrane water fluxes from surrounding extracellular fluid, but then the cells lose water jointly expelling intracellular solutes by presumably volume-sensitive channels and beginning to shrink. This process called regulatory volume decrease (RVD) (Hoffmann et al., 2009). Under the influence of 200 mOsm hypotonic solution, hWJ-MSCs initially showed the mild swelling to V_{max} ($113 \pm 3\%$) and then gradually recovered their pre-swelling volume. The characteristic time to return to the initial condition was 24 ± 3 min (**Figure 2A**). The rate of hWJ-MSC swelling after decreasing the extracellular osmolarity was comparable to other types of cells (Vázquez et al., 2001; da Silva et al., 2010). It was very similar to behavior of Jurkat lymphocytes which undergo RVD in the same condition and responded to a mild (~33%) osmotic shift from 300 to 200 mOsm. The homeostasis change leads to 10-20% for hWJ-MSCs and 20-25% to Jurkat cells swelling. Both cases show that these cells are not behave as nearly perfect osmometers and can not increase the volume as it is occur for red blood cells (George, 1948). This difference depends apparently on the physico-chemical properties of the cells membrane. The maximal swollen volume, V_{max} , is reached by hWJ-MSCs after a few minutes in response to a 33% of osmotic disbalance. After that not burst cells promoted shrinkage in hypo-osmotic conditions within 21-27 minutes and initial volumes are attained but not completely by the end of the measuring period (30 min after the osmotic shift) (**Figure 2A**). So we have demonstrated that hWJ-MSCs are able to undergo RVD.

We have found that 4-AP presumably inhibited cell volume normalization nonspecifically and TEA, classical inhibitors of voltage-gated potassium channels, significantly altered hWJ-MSC response to a hypotonic challenge. Rather than return to the original volume, they on the contrary start to increase the volume of the cell. The peak volume in hypotonic solution (V_{max}) was dependent on the type of inhibitor. In the presence of 4-AP the amplitude of the initial cells quick swelling reached ~ 60% of the control value, but then continue very slowly (~0.1%/min) or considerably (~1%/min) increase in the presence of 4-AP and TEA, respectively.

In the latter case, the cell volume reached ~113% of control levels at 20 min and continued at this level for the entire recording period (**Figure 2C and B**). In the presence of the Glibenclamide (Gb) inhibitor of ATP-dependent K⁺ channels (Kir6.x) in bath solution (**Figure 2D**), the V_{max} was 110 ± 0,8 of its pre-swelling volume, about 3% lower than the control group. In this case (Gb) the V_f (115±1,2; N=67), still elevated. The decrease in RVD by glibenclamide (GB) 100 μM confirmed that inhibition occurs nonspecifically, because GB may block several ion channels, including ATP-sensitive K⁺ channels (Kir6.x) significantly, CFTR channels, Ca²⁺-activated and swelling-activated Cl⁻ channels (Verkman, Galletta, 2009). Already in the case of IBTX added in the bath solution, the cells showed a reduction of percentage of the initial volume (volume after osmotic change), 106±0.9 showing a decrease of ~ 7% compared to control. The V_{max} was 115 ± 0,8, N=37 of its pre-swelling volume (**Figure 2E**). The responses of hWJ-MSCs to a hypo-osmotic challenge in vitro in the presence of IBTX was suppressed and may reveal the presence of large conductance calcium-activated potassium channels Maxi-K⁺ (KCa1.1 or BK_{Ca}). So the inhibition of K⁺ channels abolished regulatory volume decrease (RVD) and demonstrates the importance of hWJ-MSC plasma membrane K⁺ channels in RVD (**Figure 2A-E**). The experiments presented in **Figure 2** point to a possible hierarchy of this ensemble of channels in RVD. The continuous swelling when BK channels were blocked (**Figure 2E**), in contrast with preservation of the increased volume with time when either eag1/erg1 (**Figure 2B**), Kv4.2/Kv4.3 (**Figure 2C**) or Kir6.x (**Figure 2D**), were blocked are suggestive of a distinctive and master role played by BK. It can be proposed that this role is linked to their greater expression (**Figure 1**) and a possible larger ability to extrude K⁺ as a result of an increased open probability due to the rise of intracellular Ca²⁺ that takes place after a hypotonic jump (Sand et al., 2004).

The decrease in maximal amplitude of the initial cell swelling observed in the presence in a bath solution of TEA and 4-AP no moment of beginning of hypo-osmotic stress (compared to controls) may indicate the ability of cation channel blockers to decrease the primary sharp water influx. This suggestion is consistent with the observation that TEA can block not only Kv and Maxi K⁺ channel but the water flux through aquaporin-1 channels directly (Detmers et al., 2006).

Activity of ion channels is one of the key factors that controlled volume regulation. Swelling-activated K⁺ channels, which mediate RVD, are found in most cell types. Our data confirmed that K⁺ play important roles in hWJ-MSCs volume regulating. In all cases of inhibition of potassium channels we have not observed a normalization of cell volume in a hypotonic

environment. The potassium channels blocking do not allow to cells return to their original volume apparently shared by inactivating of ion channels and enabling ions to move along their concentration gradients. For the first time, the capacity of hWJ-MSCs to undergo RVD after hypotonic challenge, albeit not full, has been demonstrated. This method permitted us to show the presence and importance for correction of volume – TEA and 4-AP sensitive K^+ ion channels (both 4-diaminopyridine and TEA effectively blocks I_{KDR}) and IBTX the hWJ-MS cells K^+ exit through ion channels contributes to cell shrinkage and decreases intracellular K^+ concentration, which in turn favour RVD. Ion transport inhibitors altered all phases of regulatory volume decrease (RVD) of hWJ-MS cells, rate of initial cell swelling, $V_{m\acute{a}x}$ and volume recovery. Effects were dependent on type of inhibitor. Participation of aquaporins in RVD was suggested previously (10mM TEA) (Muller et al., 2008).

Whole-cell patch clamp confirmed the presence of K^+ currents in hWJ mesenchymal cells. We were found some functional voltage-gated potassium channels in human Wharton jelly mesenchymal stem cells (hWJ-MSCs). Three components of ionic currents, the same like was shown for mesenchymal cells from umbilical cord veins (Park et al., 2007), were activated by the depolarizing voltage steps in representative hWJ-MSCs under iso-osmotic conditions (**Figure 3A-C**).

Most hWJ-MSCs (more than 50%) showed a rapidly activating current with noisy oscillation at +40 to +60 mV, similar to a Ca^{2+} -activated K^+ current (MaxiK, $I_{KCa1.1}$) reported by Heubach et al., 2004 (**Figure 3A**) – together with its highest mRNA expression among other different K^+ channels (**Figure 1**), points to its possible important role in the functional characteristics of hWJ-MSCs. In other cells that are constantly submitted to sudden changes in osmolality, such as the intestine epithelial cells of some marine fishes (Lionetto et al., 2008), BK channels are specifically activated after a hypotonic jump.

Besides the high-conductance IBTX-sensitive BK-mediated currents (**Figure 4C upper traces**), we demonstrated the existence (**Figure 4D middle and 4E bottom traces**) of both: (i) the transient outward K^+ currents carried by the 4-AP-sensitive voltage-gated Kv4.2 and Kv4.3 proteins (Dixon et al., 1999), and (ii) the delayed rectifiers K^+ currents sensitive to TEA, which could be related to the eag1 and erg1 channel proteins. These channels have been associated with a myriad of physiological processes, including cell proliferation, in a great number of excitable

cells that have a fine tune regulation of their membrane potential and intracellular Ca^{2+} (Ludwig et al., 2000).

In all cells, we detected a rapidly activated transient outward K^+ current (I_{to}) activated by the voltage protocols (**Figure 4D**). Other cells demonstrate a gradual activating current at potentials between +20 and +60 mV, similar to a delayed rectifier K^+ current (KCNS1, I_{KDR}) or a rapidly activated outward current (**Figure 4E**).

I_{KDR} were totally suppressed by tetraethylammonium (10mM TEA), I_{to} current was inhibited by 4-aminopyridine (5mM), and I_{BKCa} was sensitive to a specific blocker - iberiotoxin (0,1mM) and TEA (10mM) (**Figure 4E**). The addition of 10 mM TEA substantially reduced the magnitude of the outward current activated by the depolarizing voltage steps. The effect was rapid and reversible and the current was recovered after drug washout for 5 minutes. Qualitatively similar results were obtained under the influence of another widely used inhibitor for voltage-gated potassium channels, 4-AP (5 mM). **Figure 4D** shows the integral results of the influence of TEA and 4-AP on the current-voltage relationships. The effects of the drugs were pronounced at positive potentials. The inhibited fraction of the membrane current slowly increased with potential in the presence of 4-AP (**Figure 4F**, open square), and strongly, under influence of TEA (**Figure 4F**, open triangle) and IBTX (**Figure 4F**, open circle).

In addition, we found that the K^+ channel blockers TEA, 4-AP, GB and IBTX inhibited hWJ-MSCs cell proliferation. Then the involvement of potassium channels in regulation of cell proliferation in hWJ-MSCs was confirmed by our above experiments. Several studies show that progression through the cell cycle is linked to preservation of the fine tune control of the ion permeability of the plasma membrane and, conversely, that pharmacological blockage of ion channels may lead to inhibition of cell proliferation and growing (Spitzner et al., 2008). Our data suggest that the effect may be caused by disruption of cell volume control.

Our results confirm the presence of some types of K^+ channels in hWJ-MSCs and suggest that these functionally expressed potassium channels play important role in volume regulation of hWJ-MSCs.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES and CNPq. We thank the team from the Obstetric Department of Hospital de Ávila (Recife) for providing human umbilical cord samples and Centro de

Pesquisas Aggeu Magalhães (Fiocruz, Recife) for the technical support during characterization of hWJ-MSCs.

Reference list

1. Anzalone R, Lo Iacono M, Loria T, Di Stefano A, Giannuzzi P, Farina F et al., 2011. Wharton's jelly mesenchymal stem cells as candidates for beta cells regeneration: extending the differentiative and immunomodulatory benefits of adult mesenchymal stem cells for the treatment of type 1 diabetes. *Stem Cell Rev.*(2):342-63.
2. Augello A, Kurth TB, De Bari C. 2010. Mesenchymal Stem Cells: A Perspective from in Vitro Cultures to in Vivo Migration and Niches. *European Cells & Materials* 20:121-133
3. Batsali AK, Kastrinaki MC, Papadaki HA, Pontikoglou C. 2013. Mesenchymal Stem Cells derived from Wharton's Jelly of the Umbilical Cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther* 8:144-155.
4. Can A, Karahuseyinoglu S. 2007. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*. 25:2886-2895
5. Chen FH, Tuan RS. 2008. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther* 10(5) 223.
6. Da Silva MB, Costa VM, Pereira VR, de Albertim GJB, de Melo EB, Bezerra DP et al. 2010. Ion Channels in volume regulation of clonal kidney cells. *Cell Proliferation*. 43(6), 529-41.
7. Detmers FJ, de Groot BL, Muller EM, Hinton A, Konings IBM, Sze M et al. 2006. Quaternary Ammonium Compounds as Water Channel Blockers. *The J Biol Chem*. 281 (20): 14207–14214.
8. Ding YC, Bushell A, Wood KJ. 2010. Mesenchymal Stem-Cell Immunosuppressive Capabilities: Therapeutic Implications in Islet Transplantation. *Transplantation* 89:270-273.
9. Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, et al. 1999. Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 79:659-668.
10. Guest GM. 1948. Osmometric behavior of normal and abnormal human erythrocytes. *Blood*, 3 (5) 541-555;

11. Gauthaman K, Fong CY, Suganya CA, Subramanian A, Biswas A, Choolani M et al. 2011. Extra-embryonic human Wharton's jelly stem cells do not induce tumorigenesis, unlike human embryonic stem cells. *Reprod Biomed* 24:235-246.
12. Heubach JF, Graf EM, Leutheuser J, Bock M, Balana B, Zahanich I et al. 2004. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J Physiol* 554:659-672.
13. Hoffman EK, Lambert IH, Pedersen SF. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiology Reviews*. 89(1): 193-277
14. Hoogduijn MJ, Betjes MG, Baan CC. 2014. Mesenchymal stromal cells for organ transplantation: different sources and unique characteristics? *Curr Opin Organ Transplant* 19:41-46.
15. Hou LL, Cao H, Wang DM, Wei GR, Bai C. X, Zhang Y et al. 2003. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *International Journal of Hematology* 78:256-261.
16. Huang P, Lin LM, Wu XY, Tang Q L, Feng XY, Lin GY, et al. 2010. Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Into Germ-Like Cells In Vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* 109:747-754.
17. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO et al., 2007. Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells*. 25(2):319–33.
18. Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, Mehandjiev T, Dimitrov A, Nikolov A, et al. 2008. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biology International* 32:724-732
19. Kuras Z, Yun YH, Chimote AA, Neumeier L, Conforti L. 2012. KCa3.1 and TRPM7 channels at the uropod regulate migration of activated human T cells. *PLoS One* 7:e43859
20. Lang F, Lepple-Wienhues A, Paulmichl M, Szabó I, Siemen D, Gulbins E.1998. Ion channels, cell volume, and apoptotic cell death. *Cell PhysiolBiochem*. 8(6): 285-292.
21. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103:1669-1675.
22. Li G R, Deng XL. Functional ion channels in stem cells. 2011. *World Journal of Stem*

Cells, 3(3) :19-24

23. Li GR, Sun H, Deng X, Lau CP. 2005. Characterization of ionic currents in human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells* 23:371-382
24. Lionetto MG, Rizzello A, Giordano ME, Maffia M, De Nuccio F, Nicolardi G, et al. 2008. Molecular and functional expression of high conductance Ca^{2+} activated K^+ channels in the eel intestinal epithelium. *Cell Physiol Biochem* 21:373-384.
25. Ludwig J, Weseloh R, Karschin C, Liu Q, Netzer R, Engeland B, et al. 2000. Cloning and functional expression of rat eag2, a new member of the ether-à-go-go family of potassium channels and comparison of its distribution with that of eag1. *Mol Cell Neurosci* 16:59-70.
26. McManus ML, Churchwell KB, Strange K, 1995. Regulation of cell volume in health and disease. *New Engl. J. Med.* 9(333), 1260–6.
27. Müller EM, Hub JS, Grubmüller H, de Groot BL. 2008. Is TEA an inhibitor for human Aquaporin-1? *Pflugers Archiv* .456(4):663-669.
28. Okada Y, Shimizu T, Maeno E, Tanabe S, Wang X, Takahashi N. 2006. Volume-sensitive Chloride Channels Involved in Apoptotic Volume Decrease and Cell Death. *J Membr Biol* 209:21-29.
29. Paldino E, Cenciarelli C, Giampaolo A, Milazzo L, Pescatori M, Hassan HJ, et al. 2014. Induction of dopaminergic neurons from human Wharton's jelly mesenchymal stem cell by forskolin. *J Cell Physiol* 229:232-244
30. Park KS, Jung KH, Kim SH, Kim KS, Choi MR, Kim Y, et al. 2007. Functional expression of ion channels in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord vein. *Stem Cells* 25:2044-2052.
31. Park KS, Lee YS, Kang KS. 2006. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Journal of Veterinary Science* 7:343-348.
32. Reuss, L, 2012. Water transport across cell membranes. *eLS*.
33. Sand P, Anger A, Rydqvist B. 2004. Hypotonic stress activates an intermediate conductance K^+ channel in human colonic crypt cells. *Acta Physiol Scand* 182:361-368

34. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. 2008. Mesenchymal stem cells from umbilical cord: do not discard the cord. *Neuromuscul Disord* 18:17-18
35. Spitzner M, Martins JR, Soria RB, Ousingsawat J, Scheidt K, Schreiber R, et al. 2008. Eag1 and Bestrophin 1 are up-regulated in fast-growing colonic cancer cells. *J Biol Chem* 283:7421-7428.
36. Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. 2011. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta* 4:S311-315.
37. Tyndall A, Gratwohl A. 2009. Adult stem cell transplantation in autoimmune disease. *Curr Opin Hematol.* 16(4): 285–91.
38. Vázquez E, Nobles M, Valverde MA. 2001. “Defective Regulatory Volume Decrease in Human Cystic Fibrosis Tracheal Cells because of Altered Regulation of Intermediate Conductance Ca^{2+} -Dependent Potassium Channels: *Proc Natl Acad Sci USA*. Apr 24; 98(9): 5329–5334.
39. Verkman AS, Galiotta LJ. 2009. Chloride channels as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 8(2): 153–171.
40. Wang SP, Wang JA, Luo RH, Cui WY, Wang H. 2008. Potassium channel currents in rat mesenchymal stem cells and their possible roles in cell proliferation. *Pharmacol Physiol* 35:1077-1084.
41. Wang, HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ et al. 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22:1330-1337.
42. Wehner, F. 2006. Cell volume-regulated cation channels. *Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation* 152:25-53.
43. Wu LF, Wang NN, Liu YS, Wei X. 2009. Differentiation of Wharton's Jelly Primitive Stromal Cells into Insulin-Producing Cells in Comparison with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A* 15:2865-2873.
44. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang J I, Mizuno H et al. 2002. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279–4295.
45. Yingjun G, Xun Q. 2013. Acid-sensing ion channels under hypoxia. *Channels (Austin)* 7:231-237.

Supplementary Material

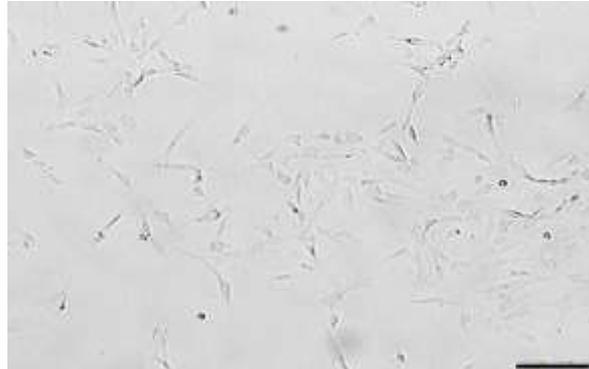


Figure S1. Image showing morphology of adherent hWJ-MSCs on third passage. Scale bar: 100µm.

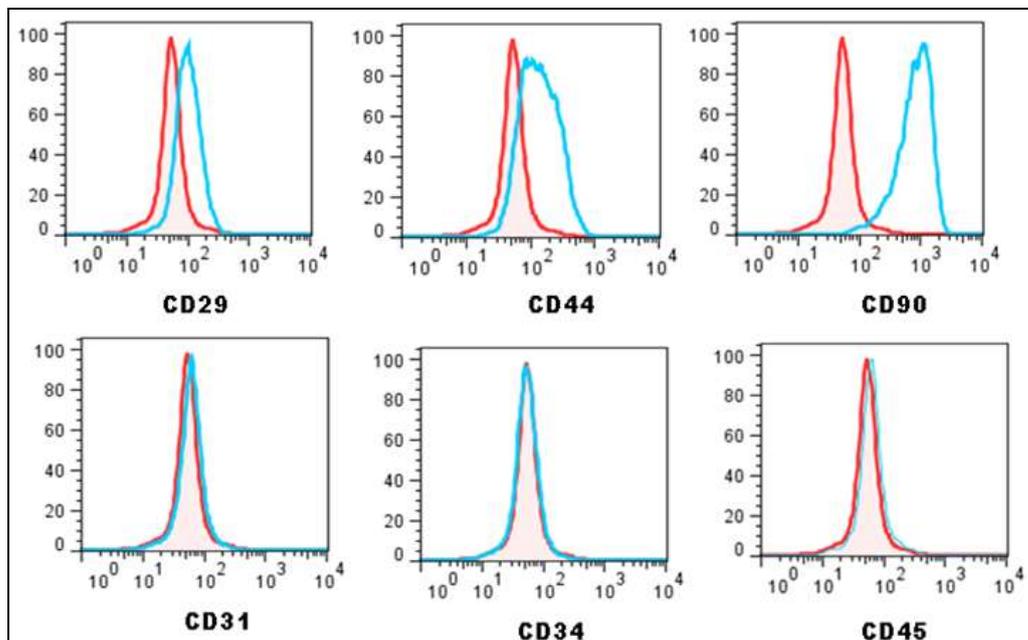


Figure S2. Characterization of hWJ-MSCs. Flow cytometry analysis showing the immunophenotype hWJ-MSCs that were obtained from the homogeneous confluent monolayer at the end of the third passage. Abbreviations: hWJ-MSCs, Wharton Jelly from umbilical cord, FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin.

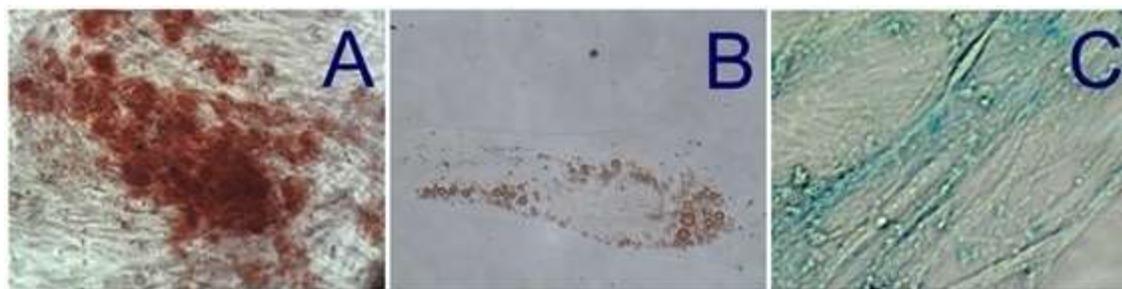


Figure S3. Three-lineage differentiation of hWJ-MSCs. A: hWJ-MSCs at passage third were cultured 3 weeks in medium for osteogenic differentiation (bone) evaluated with Von Kossa staining. B: Cells were cultured for 14 days in medium specifically designed for adipogenic differentiation (fat) and revealed with Oil red O staining. C: Chondrogenic differentiation (cartilage) was performed culturing hWJ-MSCs more than 3 weeks in specific culture conditions and revealed with Alcian blue.

Table S1. Primers used at RT-PCR.

Gene	Channel	Accession N ^o	Amplicon size (bp)
Slo1	MaxiK/BKca or KCa1.1	NM 001014797.2	112
KCNS1	Kv9.1	NM 002251.3	87
KCNH1	Kv10.1 (eag)	NM 002238.3	73
KCNH2	Kv11.1	NM000238.3	64
KCND2	Kv4.2	NM 012281.2	60
KCND3	Kv4.3	NM 004980.4	74
KCNA7	Kv1.7	NM 031886.2	170
KCNK5	K2P5.1	NM 003740.3	88
GAPDH	-----	NM 002046.4	122

Slo1, human large-conductance potassium channel; KCND, KCND3, KCNH2, KCNH1, KCNA7, KCNK5, voltage-gated potassium channel; KCNS1, voltage-gated potassium channel delayer-rectifier and GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

6. CONCLUSÕES

- ✓ As células obtidas da géleia de wharton do cordão umbilical humano apresentam fenótipo característico de células-tronco mesenquimais (hWJ-MSCs);
- ✓ As hWJ-MSCs apresentam mecanismo de regulação de volume;
- ✓ A RVD presente nas hWJ-MSCs foi suprimida na presença de inibidores de canais de cloreto e de canais de potássio,
- ✓ Os inibidores de canais de cloreto e de canais de potássio influenciaram diferencialmente, o volume máximo alcançado ($Vol_{máx}$), sugestivo de alteração no funcionamento das aquaporinas;
- ✓ Os inibidores de canais de cloreto interferem na progressão do ciclo celular mantendo as células na fase G0/G1;
- ✓ A proliferação das hWJ-MSCs depende da ativação dos canais de potássio e dos canais de cloreto participantes na RVD, portanto, inibidores destes canais, podem interromper o ciclo de divisão dessas células;
- ✓ As hWJ-MSCs expressaram os canais potássio (MaxiK, KCND2, KCND3, KCNS1, KCNH2 e KCNH1) e de canais de cloreto (p1-VDAC e CLCN3).
- ✓ As hWJ-MSCs apresentaram três perfis de correntes iônicas compatíveis com: Maxi K (BK ou Kca); corrente transiente rápida de saída do potássio (I_{to}) e uma corrente de retificação tardia (K_{DR}).
- ✓ Os canais de potássio dependentes de voltagem (K_v), canais de potássio dependentes de ATP, ativados por cálcio de alta condutância (BKa) e canais de cloreto participam no mecanismo da RVD e proliferação das hWJ-MSCs.

REFERÊNCIAS

1. ABASCAL F, ZARDOYA R. LRRC8 proteins share a common ancestor with pannexins, and may form hexameric channels involved in cell-cell communication. *Bioessays*. 34(7): 551-60. 2012.
2. AGRE P, KOZONO D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett*; 555(1): 72–8. 2003.
3. AGUILELLA V.M et al. Insights on the permeability of wide protein channels: measurement and interpretation of ion selectivity. *Integr. Biol*, 3(3): 159-72. 2011.
4. AL-HABORI, M. Macromolecular crowding and its role as intracellular signalling of cell volume regulation. *Int J Biochem Cell Biol*, 33 (9): 844-64. 2001.
5. ALEXANDER R.T, GRINSTEIN S. Activation of kinases upon volume changes: Role in Cellular homeostasis. *Contrib Nephrol*, 152: 105-24. 2006
6. ANTONINUS A.A et al. Wharton Jelly-derived Mesenchymal Stem cells: Isolation and Characterization. *Tinjauan pustaka*, 39(8). 2012
7. ADRAGNA N.C, DI FULVIO M, LAUF PK. et al. Regulation of K-Cl cotransport: from function to genes. *J Membr Biol* 201(3):109-37. 2004.
8. ALPER S.L. Molecular physiology of SLC4 anion exchangers. *ExpPhysiology*. 91(1):153-161. 2006.
9. AL-AWQATI Q, OLIVER J.A. Stem cells in the kidney. *Kidney Int*. 61(2):387-395.2002.
10. ASHCROFT F.M. Ion channels and disease channelopathies. *Academic Press*. 97-135. 2000.
11. BEHL C, ZIEGLER C. Cell Aging: Molecular Mechanisms and implications for disease. *Springer Briefs in Molecular Medicine*. 2014
12. BLACKISTON D.J, McLAUGHLIN K.A, LEVIN M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell cycle* 8(21), 3527-36. 2009.
13. BENZANILLA F, ARMSTRONG C.M. Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J. Gen Physiol.*; 60(5): 588-608. 1972.
14. BERG J, YANG H, JAN L.Y et al. Ca²⁺-activated Cl⁻ channels at a glance. *Cell Sci*. 125: 1367-1371. 2012.

15. BERRIDGE M.J, LIPP P, BOOTMAN M.D. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Reviews Mol Cell Biol.* 1(1): 11-21. 2000.
16. BUDIRAHARDJA Y, GONCZY P. Coupling the cell cycle development. *Development*, 136 (17): 2861-2872. 2009.
17. BYDLOWSKI S.P et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev.Bras.Hematol.Hemoter, São Paulo* , v. 31, supl. 1. 2009.
18. CALPLAN A.I. Why are MSCs therapeutic? New insight. *J Pathol*, 217(2), 318-324. 2009.
19. CAN A, KARAHUSEYINOGLU S. Concise review: Human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* 25(11): 2886-2895. 2007.
20. CAO F.J, FENG S.Q. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury. *Chinese Medical Journal*, 122 (2): 225-231. 2009.
21. CHEN T.Y, HWANG T.C. CLC-0 and CFTR: Chloride channels evolved from transporters. *Physiological Reviews* 88(2), 351-387. 2008.
22. CHEN L.X et al. Roles of volume activated Cl⁻ currents and regulatory volume decrease in the cell cycle and proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Prolif.* 40, 253–267. 2007.
23. CHEN S.L et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 94(1): 92–5. 2004.
24. CHEN J.C.J, GOLDHAMER D.J. Skeletal muscle stem cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:101. 2003.
25. CHOE S. Potassium Channel Structure. *Nat Rev Neurosci* 3 (7), 115–121. 2002.
26. CHOUMERIANOU D.M. et al. Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Eng Part B Rev.* 14:53-60. 2008.
27. CLAPHAM, D. E. et al. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacol Rev.* 57(4), 427-50. 2005.
28. COLTER D.C et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow *Proc Natl Acad Sci.* USA 97:3213. 2000.

29. CONCONI M.T et al. Phenotype and differentiation potential of stromal populations obtained from various zones of umbilical cord: an overview. *Open tissue Eng Regen Med J*; 4: 6-20. 2011.
30. COOPER G.M. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; **The Eukaryotic Cell Cycle**. 2000.
31. CORRY B. Understanding ion channel selectivity and gating and their role in cellular signalling. *Mol. BioSyst.*, 2, 527-535. 2006.
32. COVAS D.T, et al. Células-tronco mesenquimais. In ZAGO MA: COVAS DT. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo; **Atheneu**; p35-48. 2006.
33. DA SILVA, M. B. et al. Ion Channels In Volume Regulation And Cell Cycle Progression Of Clonal Kidney Cells. *Cell Prolif* 43(6):529-41. 2010.
34. DANZIGER J, ZEIDEL M.L. Osmotic homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 10(5): 852–862. 2014.
35. DEANS R.J, MOSELEY A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses, *Exp Hematol*; 28:(8)875-84. 2000.
36. DE BARI C et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 44 (8):1928-42. 2001.
37. DE COPPI P et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*; 25(1):100-6. 2007
38. DEL CARLO R.J. et al. Avanços nos estudos de células-tronco no Brasil e suas implicações. *Ceres* 56 (4), 446-50. 2009.
39. DING D.C et al. Human Cord Mesenchymal Stem cells: A New Era for Stem Cell Terphy. *Cell transplant*, 24(3) 339-47. 2015.
40. DING F et al. Involvement of cationic channels in proliferation and migration of human mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* , 44 (6):358-64. 2012.
41. DOMINICI M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-7. 2006.
42. DOROSHENKO P, SABANOV V, DOROSHENKO N. Cell cycle-related changes in regulatory volume decrease and volume-sensitive chloride conductance in mouse fibroblasts. *J Cell Physiol*. 187: 65-72. 2001. 2001

43. DOYLE D.A et al., The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280(5360) :69-77. 1998.
44. DURAN C. et al. Chloride Channels: Often Enigmatic, Rarely Predictable. *Annu Rev Physiol*, 72: 95-121. 2010
45. EGGERMONT J. et al. Cellular function and control of volume-regulated anion channels. *Cell Biochem Biophys*. 35(3): 263-274. 2001
46. ESTÉVEZ R, JENTSCH T.J. CLC chloride channels: correlating structure with function. *Current opinion in structural biology*. 12: 531-539. 2002.
47. FANAROW G.C., Heart failure: recent advances in prevention and treatment. *Rev Cardiovasc Med*, 1(1):25-33,54. 2000
48. FARRINGTON-ROCK C. et al. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 110, 2226-2232. 2004
49. FERNANDEZ- FERNANDEZ. J.M. et al. Maxi K⁺ Channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*. 283(6) C1705-1714. 2002
50. FODOR W.L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol*. RB&E 1:102. 2003.
51. FOSTER I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14(2) 144-149. 2008.
52. FRAGA A.M. et al. Establishment of a Brazilian Line of Human Embryonic Stem Cells in Defined Medium: Implications for Cell Therapy in an Ethnically Diverse Population. *Cell Transplantation*, 20(3): 431-440. 2011.
53. FRIEDRICH B, MATSKEVICH I, LANG F. Cell volume regulatory mechanisms. *Contrib Nephrol*. 152: 1-8. 2006.
54. FUCHS E, SEGRE J.A. Stem cells: a new lease on life. *Cell*. 100 (1):143-155. 2000.
55. FÜRST J. et al. Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells. *Pflugers Arch*. 444(1) 1-25. 2002.
56. GADSBY D.C, Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(5): 344-52. 2009.
57. GAMBA G. Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters. *Physiol Rev*. 85(2): 423-93. 2005.

58. GATTA S. et al. Large Conductance, calcium-activated potassium channels: Structural and functional implications. *Pharmacol Ther.* 110(1):103-16. 2006.
59. GÓNCCI M. et al. Hypotonic stress influence the membrane potential and alter the proliferation of Keratinocytes in vitro. *Exp Dermatol*, 16(4): 302-10. 2007.
60. GUAN K. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 440: 1199-1203. 2006.
61. GUTMAN G.A. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57(4): 473-508. 2005.
62. HABELA C.W, SONTHEIMER H. Cytoplasmic Volume Condensation is an Integral Part of Mitosis. *Cell Cycle.* 6(13): 1613–20. 2007.
63. HAFTING T, SAND O. Purinergic activation of BK channels in clonal kidney cells (Vero cells). *Acta Physiol Scand* 170(2):99-109. 2000.
64. HASS R et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 9:12. 2011.
65. HERBERTS C.A, KWA M.S, HERMSEN H;P. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med*, 9:29. 2011
66. HIBINO H et al. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol Rev* 90(1): 291–366. 2010.
67. HILLE B. Ion Channels of Excitable Membranes, **Sinauer Third Edition**, Sunderland, MA. 2001.
68. HIRAO A, ARAI F, SUDA T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle* 3(12):1481-3. 2004.
69. HOFFMAN E.K, LAMBERT IH, PEDERSEN SF. et al. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev.* 89: 193-277. 2009.
70. HOFFMAN E.K, PENDERSON S.F. Cell volume homeostatic: mechanisms: effectors and signalling pathways. *Acta Physiol* 202(3):465-85. 2011.
71. HOLLWECK T, HAGL C, EISSNER G. Mesenchymal stem cells from umbilical cord tissue as potential therapeutics for cardiomyodegenerative diseases - a review. *Int J Mol Cell Med.*;1(3):119-32. 2012.

72. HONORÉ E. The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci*; 8:251-61. 2007.
73. HORWITZ E.M, et al., Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5. 2005.
74. HUANG P. et al. Differentiation of human umbilical cord Wharton Jelly –derived Mesenchymal stem cells into germ-like cells in vitro. *J Cell Biochem*, 109(4):747-54. 2010.
75. HUANG X.I, JAN L.Y.. Targeting potassium channels in câncer. *J Cell Biol*. 206(2): 151. 2014
76. HUBNER C.A, JENTSCH T.J. Ion channel diseases. *Human Mol Genet* 11(20): 2435–45. 2002.
77. HOU S.W, HEINEMANN SH, HOSHI T. et al. Modulation of BKCa Channel Gating by endogenous signaling molecules. *Physiology (Bethesda)*; 24(1): 26-35. 2009
78. HUSARU L et al. Potential analytical applications of gated artificial ion channel. *Anal Bioanal Chem*. 382(8): 1882-8.2005.
79. JAENISCH R, YOUNG R. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and nuclear Reprogramming. *Cell*, 132(4) 567–82.2008
80. JAHODA C.A et al., 2003. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp. Dermatol*. 12(6), 849–859.
81. JANÁČEK K., SIGLER K. Osmosis: Membranes Impermeable and Permeable for Solutes, Mechanism of Osmosis across Porous Membranes. *Physiology Research*. 49(2): 191-5. 2000.
82. JENKINSON D.H. Potassium channels – multiplicity and challenges. *Br J Pharmacol*; 147 (Suppl 1): S63-71. 2006.
83. JENTSCH T. J. et al. Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. *Physiol Rev*. 82(2):503-68. 2002.
84. JIANG Y., et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41–49. 2002.
85. JOHNSTON, N. Skin stem cells. *Drug Discov. Today* 9 (23):994. 2004.
86. JONES E.A., et al. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum*. 50(3) : 817-27. 2004.

87. JORGENSEN PL, PEDERSEN PA. Structure-function relationships of Na⁺, K⁺, ATP, or Mg²⁺ binding and energy transduction in Na, K-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1505: 57–74. 2001.
88. KAHLE K.T et al. WNK protein kinases modulate cellular Cl⁻ flux by altering the phosphorylation state of the Na-K-Cl and K-Cl cotransporters. *Physiology (Bethesda)* 21, 326-35. 2006.
89. KANG X.Q. et al. Differentiating characterization of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int* 30(7):569-575. 2006.
90. KACZMAREK L.K. Non-conducting functions of voltage-gated ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 761–771. 2006.
91. KALRA K, TOMAR P.C et al., Stem cells: Basics, Classification and Applications. *American Journal of Phytomedicina and Clinical Therapeutics.* 2(7):2321-2748. 2014.
92. KAPLAN J.H. Biochemistry of Na, K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 71: 511–35. 2002.
93. KARAHUSEYINOGLU S et al. Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells* 25(2):319–31. 2007.
94. KASS R.S. The channelopathies: novel insight into molecular and genetic mechanisms of human disease. *J. Clin. Invest.* 115 (8); 1986-9. 2005.
95. KESTENDJIEVA S., et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biology International.* 32, 724-732. 2008.
96. KIM J.M et al. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. *Brain Res;* 1183:43-50. 2007.
97. KIM C.F.B et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell.* 121 (6):823-35. 2005.
98. KOLF C.M., CHO E, TUAN RS. et al. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cels: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Th,* 9(1): 204. 2007.
99. KUANG K. et al. Lack of threshold for anisotonic cell volume regulation. *J. Memb Biol.* 211 (1): 27-33. 2006.

100. KRUSE C. et al. Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratomas-like structures. *Ann Anat.*188:503-517. 2006.
101. LAMBERT I.H, HOFFMAN E.K, PENDERSON S.F. Cell volume regulation: physiology and pathophysiology. *Acta Physiol* 194(4), 255-282. 2008.
102. LAMBERT I.H. Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. *Neurochem research* 29(1), 27-63. 2004.
103. LANG F., HOFFMANN E.K. Role of ion transport in control of apoptotic cell death. *Compr Physiol*, 2(3), 2037-61. 2012
104. LANG F., 2007. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr* 26(5):613S-623S.
105. LANG F. et al. Ion channels, cell volume and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem.* 8:285-292. 1998.
106. LAUF P.K, ADRAGNA N.C. K-Cl co-transport: properties and molecular mechanism. *Cell Physiol Biochem*; 10(5-6):341-54. 2000.
107. LEDOUX J. et al. Calcium-activated potassium channel and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)*, 21: 69-78. 2006.
108. L'HOSTE S. et al. 2007. Extracellular pH alkalization by Cl⁻/HCO³⁻ exchanger is crucial for TASK2 activation by hypotonic shock in proximal cell lines from mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292(2): F628 –F638.
109. LE BLANC K. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 371 (9624): 1579-86. 2008.
110. LEE P.H et al. Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy. *Clin. Pharmacol Ther* 83(5):723–30. 2008.
111. LEE K.D. et al. In Vitro Hepatic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Hepatology* 40(6): 1275–1284. 2004.
112. LEE O.K., et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103(5):1669-75. 2004
113. LEE S.W et al. Hepatocyte transplantation: state of the art and strategies for overcoming existing hurdles. *Ann Hepatol*; 3(2):48-53. 2004

114. LEMISKA I.R. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann N Y Acad Sci*: 1044:132-8. 2005.
115. LI G.R, DENG XL. Functional ion channels in stem cells. *World J Stem Cells* 3(3):19-24. 2011.
116. LI M., WANG B, LIN W et al. Cl⁻ channel blockers inhibit cell proliferation and arrest the cell cycle of human ovarian cancer cells. *Eur J Gynaecol Oncol*, 29(3):267-271. 2008.
117. LI X, WEINMAN S.A. Chloride channels and hepatocellular function: prospects for molecular identification. *Ann Rev Physiol*, 64: 609-33. 2002.
118. LOCK, H, VALVERDE M.A. Contribution of the Isk (MinK) potassium channel subunit to regulatory volume decrease in murine tracheal epithelia cells. *J Biol Chem*. 275(45), 34849–52. 2000.
119. MADUKE M, MILLER C, MINDEL J.A A decade of CLC chloride channels: structure, mechanism and many unsettled questions, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29 411-38. 2000.
120. MATTHEWS V.B, YEOH G.C. Liver stem cells. *IUBMB. Life* 57(8):549-53. 2005.
121. MCTAGGART J.S, CLARK R.H, ASHCROFT F.M.. The role of the KATP channel in glucose homeostasis in health and disease: more than meets the islet. *J Physiol* 588(17): 3201–9. 2010.
122. da SILVA MEIRELLES L, CHAGASTELLES PC, NARDI NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues *J Cell Sci*, 119(11): 2204-13. 2006.
123. MENG X. et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med*. 5:57. 2007
124. MESSINA E. et al. Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells from Human and Murine Heart. *Circ Res* 95(9):911-21.2004
125. MIKHAILOV M.V et al.. 3-D Structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2–SUR1. *EMBO Journal*. 24(23):4166-75. 2005.
126. MIMEAULT M, HAUKE R, BATRA S.K. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther* 82(3):252-64. 2007.

127. MINDEL J, MADUKE M. ClC Chloride channels: protein Family **review**. *Genome Biol*, 2(2) 3003.1- 3003.6. 200
128. MINGUEL J.J, CONGET P, ERICES A et al. Biological clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*, 33(8):881-88. 2000.
129. MINGUEL J.J, ERICES A, CONGET P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med(Maywood)*; 226(6):507-20. 2001.
130. MINTON A.P. Macromolecular crowding. *Curr Biol* 16(8): R-269-R271. 2006.
131. MILAC A. et al. Structural models of TREK channels and their gating mechanism. *Channels (Austin)* 5(1):23-33. 2011.
132. MINKE B, PARNAS M. Insights on TRP channels from in vivo studies in Drosophila, *Annu Rev Physiol* 68: 649-84. 2006.
133. MITCHELL K.E et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem cells*, 21(1): 50-60. 2003.
134. MIURA M et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 100:5807-5812. 2003.
135. MONGIN A.A, ORLOV S. Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the volume sensor. *Pathophysiology* 8(2):77-88. 2001.
136. MONTELL C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE*, 272:re3. 2005.
137. MORISHIMA S et al. Volume expansion sensitivity of swelling-activated Cl⁻ channel in human epithelial cells. *Jpn Journal of Physiology*. 50:277-280. 2000.
138. MOTAIS R. et al. Association of the Band 3 protein with a volume activated, anion and amino acid channel: A molecular approach. *J Exp Biol* 200(2): 361-7. 1997.
139. NADEEM A, HUSSAIN M.M. Ion Channels and Channelopathies. *Pak J Physiol* 6 (1):54-7. 2010.
140. NARDI B.N, da SILVA MEIRELLES L Mesenchymal stem cells isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*, 174:249-82. 2006.
141. NIEMEYER M.I. et al. Modulation of two- pore domain K⁺ channels acid-sensitive K⁺ channels TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume. *J Biol Chem*, 276(46): 43166- 74. 2001

142. NILIUS B, DROOGMANS G. Amazing chloride channel: an overview. *Acta Physiol Scand.*, 177 (2): 119-47. 2003.
143. ODORICO J.S., KAUFMAN DS, THOMSON JA. et al. Multilineage differentiation from human embryonic stem cells lines. *Stem cells*, Basel, 19(3): 193-204. 2001.
144. OKADA Y. Cell volume-sensitive chloride channels: phenotypic properties and molecular identity. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *Contrib. Nephrol.* 152, 9–24. 2006.
145. OKADA Y. Ion channels and transporters involved in cell volume regulation and sensor mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 41(2):233-58. 2004.
146. OKADA Y, MAENO E. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130(3):377-83. 2001.
147. ORLOV S.N, HAMET P. Intracellular monovalent ions as second messengers. *J. Membr Biol*, 210(3): 161-72. 2006.
148. OUADID-AHIDOUCHE H, AHIDOUCHE A. K⁺ channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis. *J Membr Biol* 221(1):1-6. 2008.
149. OVERINGTON JP, AL-LAZIKANI B, HOPKINS AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov.* 5(12):993-6. 2006.
150. PALERMO A.T. et al. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol*; 279(2):336—44. 2005.
151. PASANTES-MORALES H. Amino Acids and Brain Volume Regulation: Contribution and Mechanisms. In: OJA, S. S. et al. **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Third Edition. Heidelberg Berlin: Springer-Verlag.** 10: 225-248. 2007.
152. PASANTES – MORALES, H, TUZ K. Volume changes in neurons: hyperexcitability and neuronal death. *Contrib Nephrol* 152: 221-240. 2006.
153. PASANTES-MORALES, H et al. Mechanisms counteracting swelling in brain cells during hyponatremia. *Arch Med Res* 33(3), 237-244. 2002.
154. PASANTES-MORALES, H. et al. Signaling events during swelling and regulatory volume decrease. *Neurochem Res*, 25: 1301-14. 2000.

155. PAYUSHINA O.V, DOMARATSKAYA E.I, STAROSTIN V.I. Mesenchymal Stem Cells: Sources, Phenotype and Differentiation Potential. *Cell Biology*. 33(1), 2-18. 2006
156. PEREIRA L.V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Ciência & Saúde Coletiva*, 13(1): 7-14. 2008.
157. PENDERSEN S.F, KAPUS A, HOFFMAN E.K. Osmosensory Mechanisms in Cellular and Systemic Volume Regulation. *J Am Soc Nephrol* 22(9): 1587-97. 2011
158. PENDERSEN S.F, HOFFMAN E.K, MILLS J.W. The cytoskeleton and cell volume regulation. *Comp Biochem Physiol A Mol integr Physiol* 130(3):385-99. 2001.
159. PLANELLS-CASES R, JENTSCH T.J. Chloride channelopathies. *Biochim Biophys Acta* 1792:172-189. 2009.
160. POUNTOS I, GIANNOUDIS P.V. Biology of mesenchymal stem cells. *International journal of the care of the injured*, 36(3) 8-12. 2005.
161. PULJAK L, KILIC G. Emerging roles of chloride channels in human diseases *Biochim Biophys Acta* 1762(4):404-413. 2006.
162. RANSOM C.B, O'NEAL J.T, SONTHEIMER H. Volume-activated chloride currents contribute to the resting conductance and invasive migration of human glioma cells. *J Neurosci*, 21(19):7674-83. 2001.
163. RAMSEY I.S, DELLING M, CLAPHAM D.E. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*. 68:619-47. 2006.
164. REIS V.C. et al. Cell cycle. DNA replication, repair and recombination in the dimorphic human pathogenic fungus. *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet. Mol. Res.*, 4(2): 232-250. 2005
165. RESTREPO-ANGULO I, DE VIZCAYA-RUIZ A, CAMACHO J. Ion channels in toxicology. *J App. Toxicol*, 30(6): 497-512. 2010
166. RINGDEN O. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81(10):1390-7. 2006.
167. RINGE J. et al., Porcine Mesenchymal Stem Cells: induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell tissue Res*. 307(3):321-7. 2002.
168. RITTER M. et al. Cell swelling stimulates cytosol to membrane transposition of ICln. *J Biol Chem* 278(50): 50163-74. 2003

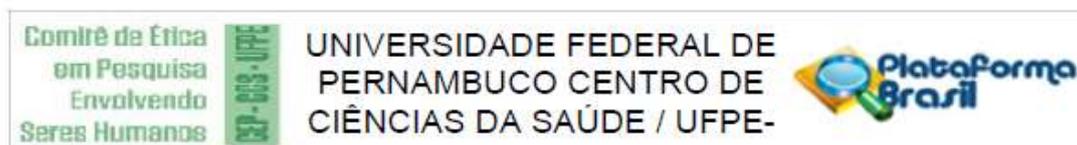
169. SABIROV R.Z, DUTTA A.K, OKADA Y. Volume-dependent ATP-conductive Large-Conductance Anion Channel as a Pathway for Swelling-induced ATP Release. *J Gen. Physiol.* 118(3): 251–66. 2001.
170. SAFIULINA D. et al. Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: physiological role in neurones. *J Cell Physiol.* 206 (2): 347–353. 2006
171. SALEM H.K, THIEMERMANN C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 28(3):585-96. 2010.
172. SANDHIYA S., DKHAR S.A. Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *Indian J Med Res:* 129(3), 223-32. 2009
173. SARDINI A et al. Cell Volume regulation and swelling activated chloride channels. *Biochim Biophys Acta* 1618(2): 153-162. 2003.
174. SEO B.M, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 364 (9429): 149-55. 2004.
175. SETHE S, SCUTT A, STOLZING A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev;* 5(1):91–116. 2006.
176. SHEN M.R et al. Anion exchanger isoform 2 operates in parallel with Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 during regulatory volume decrease of human cervical cancer cells. *FEBS Letters.* 512(1-3): 52-58. 2002.
177. SHEN M.R. et al. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *J Physiol.* 529 (2), 385-394. 2000.
178. SHIEH, C et al. Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities. *Pharmacol Reviews.* 52 :557-593. 2000.
179. SHIMIZU, T. et al. Inhibition of Hypertonicity-Induced Cation Channels Sensitizes HeLa Cells to Shrinkage-Induced Apoptosis. *Cell Physiology and Biochemistry.* 18:295-302. . 2006
180. SINGER N.G, CAPLAN A.L. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev-Pathol,* 6:457-78. 2011.
181. STEIN WD. Cell volume homeostasis: ionic and nonionic mechanisms. The sodium pump in the emergence of animal cells. *Int Ver Cytol* 215:231-258. 2002.
182. STRANGE. K. Cellular volume homeostasis. *Advances of Physiological Education,* 28: 155-19. 2004

183. STRBAK V. Cell volume and peptide hormone secretion. **Contrib Nephrol** 152: 210-220. 2006.
184. SUZUKI M., MORITA T., IWAMOTO T. Diversity of Cl⁻ channels. **Cell Mol Life Sci**; 63(1): 12-24. 2006.
185. SZABO I, ZORATTI M, GULBINS E. Contribution of voltage-gated potassium channels to the regulation of apoptosis. **FEBS Letters**. 584 (10):2049-56. 2010.
186. TABASSUM N, FERROZ A. Ion channels and their modulation. **Journal of applied Pharmaceutical Science**. 01(01): 20-25. 2011
187. TAKAHASHI K., et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, 131:861–872. 2007.
188. TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, 126(4):663-676. 2006
189. TERAMOTO N. Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. **J Physiol**, 572(3): 617–624. 2006.
190. THOMSON J.A. et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human **Blastocysts Science** 282, 1145-1147. 1998.
191. TOMA J.G. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nat Cell Biol**. 3(9):778-84. 2001.
192. TOMINAGA M.T. et al. Volume-sensitive chloride channel activity does not depend on endogenous P-glycoprotein. **J Biol Chem** 270: 27887–27893. 1995.
193. TROUSON A et al. Clinical Trials for stem cell therapies. **BMC Medicine**, 9 (52):1741-7015. 2011.
194. TROYER D.L., WEISS M.L. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. **Stem Cells** 26(3):591-9. 2008.
195. UCHIDA N. et al. Direct isolation of human central nervous stem cells. **Biological Sciences-Neurobiology**.97(26):14720–14725.2000.
196. URREGO D. et al. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 369(1638): 2014.
197. VALVERDE M.A. et al. Impaired cell volume regulation in intestinal crypt epithelia of cystic fibrosis mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 92(20): 9038-9041. 1995.

198. VOSS F.K et al. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. **Science** 344(6184):634-8. 2014.
199. WANG S, QU X, ZHAO R.C. Clinical applications of mesenchymal stem cells. **J Hematol Oncol** 5:19. 2012
200. WANG S.P et al. Potassium channel currents in rat mesenchymal stem cells and their possible roles in cell proliferation. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 35(9), 1077-84. 2008.
201. WANG H. S et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells** 22:1330-1337. 2004
202. WANG, G.X., MCCRUDDEN C. et al. Hypotonic activation of volume-sensitive outwardly rectifying chloride channels in culture PASMCs is modulated by SGK. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 287, n.2: 533-44. 2004.
203. WANG, J., et al, IK channels are involved in the regulatory volume decrease in human epithelial cells. **Am J Physiol**. 284, C77–C84. 2002.
204. WANG, L., et al. Regulatory Volume Decrease is actively modulated during the cell cycle. **Journal of Cellular Physiology** 193: 110-119. 2002.
205. WATSON N, et al. Discarded Wharton Jelly of the human umbilical cord: a viable source for mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**; 17:18-24. 2015
206. WEHNER, F.. Cell volume-regulated cation channels. **Contrib. Nephrol.**152:25-53. 2006
207. WEHNER, F. et al., Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport and signal transduction. **Rev Physiol Biochem Pharmacol** 148:1-80. 2003.
208. WEISS M. L., TROYER D. L. Stem cells in the umbilical cord. **Stem Cell Reviews** 2:155-162. 2006.
209. WEYLANDT K. et al.. Human ClC-3 Is Not the Swelling-activated Chloride Channel Involved in Cell Volume Regulation. **Journal of biological chemistry**. 276(20): 17461-17467. 2001.
210. WICKENDEN A.D.. K⁺ channels as therapeutic drug targets. **Neuropharmacology** 43(7): 1055–1060. 2002
211. WILLUMSEN N.J, et al.,. Ion channels in physiology, pathophysiology, and future drug Discovery: **Biotech International**, p. 18-22. 2003

212. WU K.H et al. Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Transplantation*; 91(12):1412-6. 2011
213. WU L.F et al. 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(10): 2865–73.2009.
214. YANCEY P.H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology* 208: 2819-2830. 2005.
215. YANG L.M. et al.. Characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells following tissue mass culture. *Cellular & Molecular Biology*; 60 (1): 12-18. 2014.
216. ZHANG Z et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 27 (2):112-120. 2012
217. ZHANPING W. et al. Voltage-gated K⁺ channels are associated with proliferation and cell cycle of ovarian cancer cell. *Gynecol Oncol* 104(2):455-60. 2006
218. ZHAO Y, GLESNE D, HUBERMAN E, et al. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(5):2426–2431. 2003
219. ZHIVOTOVSKY B, ORRENIUS S. Cell Cycle and cell death in disease: past, presente and future. *J Intern Med*. 268(5):395 – 409. 2010
220. ZUK P.A et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13(12):4279-95. 2002.
221. ZVAIFLER N.J. et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2(6):477–88. 2000.

ANEXO A: Parecer do comitê de ética em pesquisa da UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DOS CANAIS IÔNICOS NO PROCESSO DE PROLIFERAÇÃO E REGULAÇÃO DO VOLUME EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS

Pesquisador: GISELY JULIANE BARBOSA DE ALBERTIM

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49503715.0.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.309.879

Apresentação do Projeto:

O projeto faz parte de uma linha de pesquisa já bem estabelecida, com um histórico que remonta às origens da área de Biofísica em nossa instituição. Agora, acrescida de novas abordagens metodológicas.

Objetivo da Pesquisa:

Células tronco mesenquimais, oriundas de cordão umbilical, são o foco do estudo, em relação aos canais iônicos e ao processo de proliferação celular e regulação do volume.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são pequenos, considerando que o cordão umbilical coletado seria sumariamente descartado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tem é relevante e original.

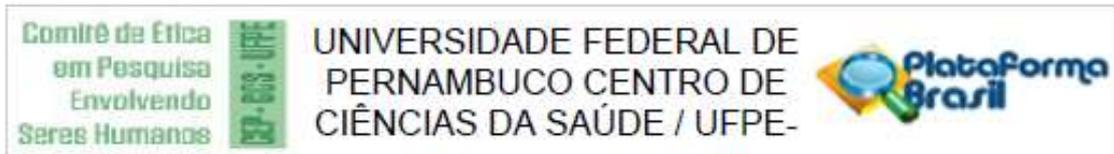
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos em ordem.

Recomendações:

Aprovação

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B: Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos a Senhora para participar como voluntária, da pesquisa *“Estudo dos canais iônicos no processo de proliferação e regulação do volume em células-tronco mesenquimais humanas”* que está sob a responsabilidade da Pesquisadora: Gisely Juliane Barbosa de Albertim. Telefone para contato: (81) 997476537), e-mail: giselybiom@hotmail.com, endereço: Rua 24 Número 16, Maranguape 1, CEP: 53444-310, Paulista – PE, e está sob a orientação do Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues, Telefone: (81) 999282624, e-mail: cgrufpe@gmail.com.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe seja compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e somente ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com a pesquisadora responsável.

Caso não concorde em assinar este documento, não haverá problema nenhum. Caso assine este documento agora e desista depois, também não haverá penalidade alguma. Se você por acaso desistir será necessário apenas fazer uma comunicação verbal ou escrita ao responsável pela pesquisa.

As informações obtidas através desta pesquisa, bem como sua identidade permanecerão sob rigoroso sigilo. Os resultados obtidos serão registrados em um computador e ficarão armazenados por cinco (05) anos no Laboratório de Biofísica das Membranas e células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE. Os resultados poderão ser utilizados somente para fins de pesquisa, no entanto, sua identidade como doadora do cordão umbilical será totalmente preservada.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Nome da pesquisa: *“Estudo dos canais iônicos no processo de proliferação e regulação do volume em células-tronco mesenquimais humanas”*

Local do estudo: Laboratório de Biofísica das Membranas e células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov do Departamento de Biofísica e Radiobiologia, localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Avenidas das Engenharias, S/N, 1º andar do Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, Recife, PE. 50670-901. Fone: (81) 2126 8535.

Pesquisador responsável: Gisely Juliane Barbosa de Albertim, estudante do Curso de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da UFPE.

Professor orientador: Cláudio Gabriel Rodrigues, Doutor do Departamento de Biofísica e Radiobiologia.

O que será feito na pesquisa:

- 1- Somente após seu consentimento de doadora pegaremos o cordão umbilical do seu recém-nascido para usá-lo neste estudo;
- 2- Colocaremos o cordão umbilical em um recipiente com líquido conservante e o levaremos em caixa de transporte de órgão até o Laboratório de Biofísica das Membranas e células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov;
- 3- No Laboratório vamos retirar as células-tronco do cordão umbilical e as deixaremos em garrafas especiais por no máximo 45 dias. O restante do cordão umbilical será queimado em um equipamento chamado incinerador;
- 4- Durante 45 dias as células-tronco serão observadas com microscópio para estudarmos às mudanças de tamanho e formato quando elas forem banhadas por soluções contendo substâncias que atuam em algumas partes da célula.
- 5- Depois dos 45 dias as células-tronco serão também queimadas no incinerador.

Riscos e benefícios: Essa pesquisa limita-se ao estudo das alterações que podem ocorrer apenas nas células-tronco do cordão umbilical humano. Os riscos serão aqueles relativos aos procedimentos médicos normais durante uma cirurgia de parto cesáreo. Em nenhum momento será realizado quaisquer tipos de

procedimentos diretos ou indiretos no seu corpo, além daqueles que normalmente ocorrem no parto cesáreo. Deste modo você não estará alterando os riscos inerentes da sua cirurgia, caso aceite participar voluntariamente da pesquisa. Mesmo assim para diminuir ainda mais os riscos, a cirurgia cesariana será realizada por profissionais altamente qualificados, e em ambiente hospitalar com todos os equipamentos necessários para atendê-la caso ocorra algum imprevisto. Antes do parto, de forma muito confortável, amigável e respeitosa, a pesquisadora conversará com você, para tranquilizá-la com respeito à cirurgia de uma forma geral. No entanto, eventualmente poderá ocorrer algum constrangimento psicológico causado pela presença da pesquisadora na sala de cirurgia durante o parto. Visando diminuir este eventual constrangimento, fique ciente que a pesquisadora agirá com tranquilidade e de maneira adequada, pois, ela é mãe e também já passou por parto cesáreo. Você será beneficiada com esclarecimentos e orientações por parte da pesquisadora que além de já ter passado por parto cesáreo, também já presenciaram muitos partos cesáreos e poderão, portanto, aconselhá-la adequadamente. Os resultados da pesquisa poderão ajudar futuramente a compreender melhor as aplicações terapêuticas das células-tronco em humanos. Você não receberá nenhuma ajuda financeira por sua participação nesta pesquisa.

Quem pode doar o cordão umbilical: Gestantes maiores de 18 anos e que não tenham sido diagnosticadas com doenças infecto-contagiosas durante a gravidez. Não participarão da pesquisa as gestantes menores de 18 anos.

Você receberá uma cópia deste documento e poderá solicitar mais informações a qualquer momento, contatando a pesquisadora responsável pelo projeto: Gisely Juliane Barbosa de Albertim, telefones (81) 997476537, pelo endereço eletrônico (email): giselybiom@hotmail.com, ou no Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco (Avenida das Engenharias, S/N, 1º andar do Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, telefone (81) 21268535. Você poderá ainda entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, situado na Avenida das Engenharias, S/N, 1º andar do Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126 8588, email: cepccs@ufpe.br.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIA

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com a pesquisadora responsável, concordo em participar do Estudo dos canais iônicos no processo de proliferação e regulação do volume em células-tronco mesenquimais humanas, como voluntária. Fui devidamente informada e esclarecida pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.

Nome do participante LETRA DE FORMA	Assinatura do Paciente	Local, Data
Nome da Testemunha LETRA DE FORMA	Assinatura da Testemunha	Local, Data
Nome da Testemunha LETRA DE FORMA	Assinatura da Testemunha	Local, Data
Nome do Pesquisador LETRA DE FORMA	Assinatura do Pesquisador	Local, Data