JAMES FERNANDO MALTA DA SILVA

**Transporte de água em células de melanoma murino
S91 submetidas a condições anisomóticas**

São Paulo

2007

JAMES FERNANDO MALTA DA SILVA

**Transporte de água em células de melanoma murino
S91 submetidas a condições anisomóticas**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Ciências, na Área de Fisiologia
Geral.

Orientador:
Prof. Dr. José Guilherme Chauí- Berlinck

São Paulo

2007

M 261t

Malta-Silva, James Fernando
Transporte de água em células de melanoma
murino S91 submetidas a condições anisomóticas /
James Fernando Malta da Silva. – São Paulo :
J. F. M. S., 2007.
131 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São
Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de
Fisiologia, 2007.

1. Melanoma murino S91 2. Regulação de
volume 3. Aquaporinas 4. Temperatura
I. Universidade de São Paulo. Instituto
de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

LC: RC 280.M37

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. José Guilherme Chauí-Berlinck
Orientador

*Aos meus pais, Roseli e Walter da Silva,
pelo apoio incondicional.*

*A Amanda por todo amor, carinho e
incentivo.*

*Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Salomão
(in memmorian) pelo incentivo à minha
carreira.*

“A Ciência não pode resolver o mistério definitivo da natureza, porque, em última análise, nós mesmos somos parte do mistério que estamos tentando resolver”.

Max Planck

À meus pais, Walter e Roseli, pela vida, por todo carinho e apoio incondicional e porque nenhuma realização seria possível sem eles.

À Amanda, por todo companheirismo, amor, apoio, incentivo e paciência para me agüentar nos meus momentos de nervosismo.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Luiz Carlos Salomão (*in memmorian*) pela orientação, confiança e amizade durante todos os anos de convívio. Agradeço também ao Prof. Dr. José Guilherme Chauí-Berlinck, pelo apoio e coragem em assumir a orientação final deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Osmorregulação e Transporte em Membranas (Celia, Charrid, Patrícia, Regiane, Valotta e Silvia) pelo bom convívio, pelas grandes discussões filosóficas e pelas colaborações.

À minha família que sempre esteve do meu lado. Ao Eduardo, meu irmão, pelo incentivo, pelos churrascos (em muita boa hora) e pela ajuda na formatação da tese. Aos meus tios, Rosângela e Eduardo e minhas primas, Bruna e Maria Eduarda. Também não poderia me esquecer da minha segunda família: Eduardo, Kátia, Aline, Livia, Ingrid, Gabriel, Mônica, Cristina, Vilma e adjacências das famílias Calfat e Lima.

À todos os integrantes e população flutuante da República Jardim Elétrico, em especial, Leandro, Cristiano, Débora e Luciano, pela boa convivência e amizade.

Aos amigos de café, no depto. de fisiologia: Frazão, Pavão, Eduardo, Pedro, Pedroca, André, Juan, Joacir, Barba, Cláudia, Regiane, Jéssica, Andreas, Daniel, Marcelo, Mário, Paloma, Carol, Mara, Bruno, Marina, Breno, Renata e tantos outros, com quem pude conviver neste departamento.

Aos amigos: Edílson, Márcia, Carolzinha, Duzinho, Samuel, Rogério, Juba, Reinaldo, Barney, Evelim, Isabela, Luana, Andresa, Fábio, Andreza, Karina, Mabi, Marlos, Neide e aos demais que sempre convivem comigo.

À todos os funcionários do depto. de fisiologia, em especial, Marcos, Cecília, Gisele, Roseli, Rose, Zilda, Wagner, Márcio, Mané, Henrique, pela ajuda nos momentos que precisei.

A todos os professores do depto. de fisiologia, em especial, Gilberto (pela ótima coordenação do programa de pós), Sílvia, Bicudo, Freitas, Navas, por todas as discussões importantes.

À todos que de alguma forma me ensinaram e me incentivaram.

À CAPES e ao CNPq (Processo 143007/2006-8) pelo apoio financeiro.

Sumário

Resumo.....	i
Abstract	ii
Capítulo 1. Introdução Geral e Material e Métodos	1
1.1 A água e seu transporte em células e tecidos são essenciais à vida	2
1.2 As Aquaporinas (AQP).....	3
1.3 Regulação do volume celular.....	7
1.4 Regulação do volume em células tumorais	16
1.5 Material e Métodos.....	23
1.6 Referências Bibliográficas.....	28
Capítulo 2. Efeito da Temperatura nas respostas anisomóticas de células de melanoma murino S91	37
Abstract.....	38
Resumo.....	39
2.1 Introdução	40
2.2 Objetivo	41
2.3 Propriedades osmóticas usadas para testar a presença de canais para água	41
2.4 Material e Métodos.....	42
2.5 Resultados	43
2.6 Discussão.....	62
2.7 Referências Bibliográficas.....	67
Capítulo 3. Efeito do HgCl₂ nas respostas anisomóticas de células de melanoma murino S91	70
Abstract.....	71
Resumo.....	72
3.1 Introdução	73
3.2 Objetivo	75
3.3 Material e Métodos.....	75
3.4 Resultados	76
3.5 Discussão.....	102
3.6 Referências Bibliográficas.....	107
Capítulo 4. Discussão Geral	110
4.1 Discussão Geral.....	111
4.2 Referências Bibliográficas	118
Apêndice.....	120

Resumo

Uma das principais necessidades da célula é a regulação do seu ambiente interno. Aparte da considerável importância teórica, o transporte de água é de importância prática numa ampla gama de processos, desde a proteção de células na preservação criogênica até os efeitos de certos hormônios em alguns tecidos. Virtualmente todas as células são submetidas a transições osmóticas durante o seu período de vida, uma vez que tanto o metabolismo intracelular quanto o transporte por membranas produzem flutuações nas concentrações dos solutos osmoticamente ativos. A regulação de volume celular é um fenômeno ubíquo e permite, às células, manter o seu volume normal. Células submetidas a choques anisomóticos agudos sofrem rápidas alterações de volume (dependentes do gradiente osmótico e da permeabilidade da membrana à água e osmólitos) podendo ou não ser seguidas de lentas alterações regulatórias de volume. Assim, o objetivo do presente trabalho visou esclarecer alguns aspectos do transporte de água em células de melanoma murino S91 submetidas a condições anisomóticas. Células de melanoma murino S91, foram mantidas em meio de cultura F12 HAM (290 mOsm.kgH₂O⁻¹). As medidas morfométricas das mudanças relativas de volume foram realizadas usando-se um sistema de aquisição e análise de imagens (Image Pro-Lite, Media Cybernetics). As células foram expostas tanto a choques hiposmóticos agudos (190 mOsm.kgH₂O⁻¹) como a choques hiperosmóticos agudos (350 mOsm.kgH₂O⁻¹) em diferentes temperaturas (de 17 a 37 °C) e em diferentes doses (de 0,001 a 1000 µM) de HgCl₂, um bloqueador de aquaporinas (AQP). Os resultados sugerem que: (i) o tempo de regulação de volume em células de melanoma murino S91 é dependente da temperatura; (ii) o fluxo osmótico de água apresenta valores de Energia de Ativação compatíveis com aqueles propostos para o trânsito de água através de aquaporinas ($E_a < 6 \text{ kcal.mol}^{-1}$); (iii) o HgCl₂ afeta de forma dose dependente as respostas osmóticas em células de melanoma murino S91 e sugerem a presença de mais de um tipo de AQP. Nestas condições as concentrações necessárias para reduzir ao máximo a permeabilidade osmótica à água estão localizadas na faixa de 0,1-1,0 µM HgCl₂.

Abstract

One of the major needs of living cells is the regulation of their internal environment. Apart from being of considerable theoretical importance, the transport of water is of practical importance in a broad range of process, from the protection of cells undergoing cryogenic preservation to the effects of certain hormones in some tissues. Virtually all the cells are submitted the osmotic transitions during their period of life, because both intracellular metabolism and transmembrane transport produce fluctuations in concentrations of osmolytes. The regulation of cellular volume is a phenomenon ubiquitous and allows, to the cells, to keep their normal volume. Cells subjected to acute anisotonic shocks suffer from fast alterations in volume (depending on the osmotic gradient and on the permeability of the membrane to the water and osmotically active substances), and followed or not by a slow volume regulation response. Thus, the present work aims to clarify some aspects of the water transport in murine melanoma S91 cells subjected to anisotonic conditions. S91 murine melanoma cells were grown in F12 HAM medium (290 mOsm.kgH₂O⁻¹). Morphometric measurements of relative changes in cell volume were performed using a video microscopy system and a PC software (Image Pro-Lite, Media Cybernetics). The experimental cells were exposed either to acute hyposmotic shocks (190 mOsm.kgH₂O⁻¹) or to acute hyperosmotic shocks (350 mOsm.kgH₂O⁻¹), in different temperatures (ranging from 17 to 37 °C) and in the presence of HgCl₂ (from 0,001 to 1000 µM), an aquaporin blocker. The results of the present study indicate that: (i) the time of volume regulation in S91 murine melanoma cells is dependent on temperature; (ii) the values of osmotic water flow are compatible with activation energy through aquaporins ($E < 6 \text{ kcal.mol}^{-1}$) and (iii) HgCl₂ treatments affect osmotic behavior of S91 murine melanoma cells in a dose-response manner and also suggest the presence of more than one type of aquaporin. Minimum osmotic water permeabilities were observed in a range of 0.1-1.0 µM HgCl₂ treatments.

Capítulo 1.

INTRODUÇÃO GERAL & MATERIAL E MÉTODOS.

"Se a gente tivesse um jeito confiável de rotular nossos brinquedos de bons e maus, seria mais fácil usar a tecnologia sabiamente. Mas quase nunca a gente consegue enxergar longe o bastante para ver qual estrada leva à danação. Quem acha que tem conhecimento o bastante para vetar uma nova tecnologia ou avançar nela está sempre arriscando vidas humanas".

Freiam Dyson

1.1 A água e seu transporte em células e tecidos são essenciais à vida

A água é a substância mais abundante em células e organismos e é indispensável à vida. O conteúdo de água de um organismo está relacionado com sua idade e atividade metabólica. Em mamíferos, por exemplo, é inicialmente alto no embrião (90-95%), diminuindo progressivamente com o passar dos anos (Benga, 2003). As células ativas contêm 60-95% de água e mesmo células dormentes, como esporos de bactérias e fungos e sementes de plantas, têm um conteúdo de água de 10-20%. Uma ameba ou uma célula de mamífero em cultura tem quase 90% da massa celular composta por água. A água permeia todas as porções de todas as células, sendo o meio em que muitos íons e moléculas estão dissociados e no qual várias estruturas celulares e organelas estão banhadas (Benga, 2003). Todos os aspectos das estruturas celulares e funções são ajustados às únicas propriedades físicas e químicas da água (Prescott, 1988; Lehninger, Nelson *et al.*, 1993). A polaridade e as propriedades de ligações com o hidrogênio fazem dela um potente solvente para muitos compostos iônicos e outras moléculas polares (Alberts, Bray *et al.*, 2002).

Uma vez que a água apresenta um papel essencial para todos os componentes celulares, ela deve ser capaz de fluir não apenas para dentro e fora da célula (Becker, 1986), mas também para dentro e fora de todos os compartimentos subcelulares. Assim, o transporte de água é essencial à vida (Benga, 2003).

Uma das principais necessidades da célula é a regulação do seu ambiente interno (Sha'afi e Gary-Bobo, 1973). Aparte da considerável importância teórica, o transporte de água é de importância prática numa ampla gama de processos, desde a proteção de células na preservação criogênica até os efeitos de certos hormônios em alguns tecidos (Benga, 2003).

1.2 As aquaporinas (AQP)

A membrana plasmática é a principal barreira para o movimento de água entre o meio interno e externo às células. Entretanto, a identificação das vias moleculares pela qual a água é absorvida e liberada das células permanecia não conhecida até um longo tempo após a descoberta da maioria das classes de proteínas transportadoras de membrana (ver APÊNDICE). Isto é surpreendente, pois o fenômeno da permeabilidade da água pela membrana celular havia sido debatido por décadas por fisiologistas e biofísicos. A maioria dos cientistas concordava que a água passava através de membranas biológicas por difusão simples através da bicamada lipídica (Agre e Kozono, 2003).

Baseando-se em observações indiretas, um pequeno grupo de cientistas argüiu que poros seletivos e especializados à água seriam necessários para explicar a alta permeabilidade à água de eritrócitos e túbulos renais (Finkelstein, 1987). Além disso, a permeabilidade à água destes tecidos poderia ser reversivelmente inibida pelos íons mercúrio (Macey e Farmer, 1970), e a energia de ativação era similar para a difusão de água em solução volumosa, $\sim 5 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Em adição, tecidos especializados, tais como ducto coletor de mamífero ou bexiga de anfíbio, eram conhecidos por exibir flutuações no transporte de água reguladas pelo hormônio antidiurético (Agre e Kozono, 2003).

1.2.1 A definição das aquaporinas

A definição de canais para água ou proteínas de canais para água não é simples. Caso se fosse incluir todas as proteínas de membrana que permitem passagem de moléculas de água através de uma via localizada em algum lugar na proteína, poder-se-ia considerar muitas dessas proteínas como sendo canais para água. A maioria dos canais que transportam íons e solutos polares provavelmente também transporta alguma água (Macey e Moura, 1986). Para proteínas que transpassam membranas, tem sido argüido que mudanças no conteúdo de água durante mudanças conformacionais poderiam levar ao

transporte transmembranar de água (Zeuthen e Stein, 1994). Além disso, segundo (Zeuthen, 1995), proteínas cotransportadoras (tais como o cotransporte K^+-Cl^- em eritrócitos e células epiteliais, o cotransporte $Na^+-K^+-2Cl^-$ no túbulo proximal do rim ou os transportadores Na^+-L -alanina e Na^+ -glicose no intestino delgado) terminam por serem, todos, cotransportadores de moléculas de água. As mudanças conformacionais também causam a transferência de um volume de água ligada na proteína (e.g. 500 moléculas de água para o cotransporte K^+-Cl^-). Este cotransporte de água foi pensado por (Zeuthen, 1995) como representando um transporte ativo “secundário” de água em proteínas de membrana, estes cotransportadores sendo “bombas”. Por outro lado, a família de proteínas especificamente designadas para o transporte de água, tais como as proteínas CHIP28 (proteínas integrais de membranas de 28 kDa parecidas com canais – “Channel-like membrane integral protein of 28 kDa”), forneceriam uma via de vazamento ou transporte passivo de água.

Assim, pode-se dizer que um canal para água é alguma proteína que ofereça uma via para moléculas de água trafegarem através de uma membrana biológica. Alguns canais para água têm o transporte de íons ou solutos como suas funções principais, enquanto que o transporte de água é um “efeito secundário”. A contribuição da maioria dos canais iônicos e canais para soluto para a permeabilidade da membrana à água é, provavelmente, irrelevante (Macey e Moura, 1986). Isto foi sugerido porque a permeabilidade à água das bicamadas lipídicas, tanto artificiais quanto naturais, é alta. Assim, a água transportada através de canais para soluto pode ocorrer por fluxos paralelos através da bicamada. Outras proteínas de canais para água têm o transporte de água como sua função principal, isto é, elas são vias específicas para a permeação de água através de membranas biológicas. Estas proteínas foram chamadas de aquaporinas (AQPs) (Benga, 2003).

Embora as AQPs, constitutivamente, residam na membrana plasmática na maioria dos tipos celulares, há relatos recentes da presença dessas em grânulos de zimógeno em células pancreáticas acinares de rato (Cho, Cho *et al.*, 2002), grânulos secretores em células parótidas acinares de rato (Matsuki, Hashimoto *et al.*, 2005), em glândulas de Brunner do duodeno de rato (Parvin, Kurabuchi *et al.*, 2005), vesículas intracelulares em rim de rato (Yasui, Kwon *et al.*, 1999), glândula parótida humana (Smith, Siddiqui *et al.*, 1999), fígado de

rato (Ferri, Mazzone *et al.*, 2003) e vesícula sináptica do cérebro do rato (Jeremic, Cho *et al.*, 2005). Demonstrou-se que a presença de AQPs contribui para a regulação de volume em grânulos secretores e vesículas (Sugiya e Matsuki, 2006).

1.2.2 A família aquaporina dos canais de membrana

A família aquaporina/aquagliceroporina (AQPs) regula o movimento de água e álcoois alifáticos através de membranas celulares. As AQPs são encontradas em todos os reinos e em todas as espécies, enfatizando a natureza essencial de resposta à concentração osmótica, e a necessidade para a condutância de glicerol (Stroud, Miercke *et al.*, 2003).

O papel das AQPs está ligado a ajustes rápidos da quantidade de água e nutrientes específicos. Entretanto, as funções são altamente especializadas, tanto que existem 11 tipos de AQPs humanas identificadas e, pelo menos, parcialmente caracterizadas (Figura 1.1), expressas em tipos específicos de tecidos. Estes tipos de AQPs apresentam, simplificada, duas subdivisões de proteínas – aquelas seletivamente permeadas por água (aquaporinas clássicas: AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 e AQP8) e aquelas permeadas por água mais glicerol (aquagliceroporinas: AQP3, AQP7, AQP9 e AQP10).

Em muitos casos, os sítios de expressão terminam por predizer papéis fisiológicos ou fornecer bases fisiopatológicas. Os sítios de expressão homólogos em mamíferos são expressos em tecidos específicos, mas deve ser notado que as aquaporinas não estão expressas em todos os tipos celulares (Agre e Kozono, 2003). Assim, não têm sido identificadas aquaporinas em neurônios (Agre e Kozono, 2003). Além disso, o desenvolvimento da expressão de aquaporina é geralmente complexo. Por exemplo, AQP1 está expressa em túbulos renais de rato apenas após o nascimento (Smith, Baumgarten *et al.*, 1993). Em contraste, AQP3 e AQP7 estão expressas em células dendríticas imaturas, mas não em células maduras (De Baey e Lanzavecchia, 2000). Em células expressando mais de uma aquaporina, os diferentes homólogos usualmente residem em diferentes membranas. Por exemplo, em glândulas

salivares, AQP3 está presente em membranas basolaterais, através da qual a água é incorporada do interstício, e AQP5 reside em membrana apical, local onde a água é liberada durante a salivação (Nielsen, Smith *et al.*, 1993).

1.2.3 Implicações da presença das aquaporinas

Está altamente claro que as aquaporinas são importantes na defesa contra uma grande diversidade de estresses ambientais. A habilidade para transportar água explica como os rins previnem a morte por desidratação, ao reabsorver 99% da água do filtrado glomerular. A onda de calor que se abateu na Europa em agosto de 2003 resultou nas mortes de dez mil pessoas que sucumbiram de exaustão de calor. Em tal processo, o organismo não consegue manter baixa sua temperatura, devido a uma hidratação imprópria. É seriamente comprometido em sua habilidade para concentrar urina e tem diminuída a capacidade de transpirar – processos fisiológicos nos quais as aquaporinas vêm sendo conhecidas por apresentar um papel essencial. O entendimento e a compreensão da habilidade do cérebro em impedir seu próprio edema, fatal dentro de um crânio rígido, a habilidade para se utilizar gordura estocada para energia, a vulnerabilidade a substâncias hepatotóxicas, são exemplos da importância da informação estrutural e funcional das aquaporinas (Agre e Kozono, 2003).

1.3 Regulação do volume celular

A regulação e/ou a manutenção de volume celular é um processo fisiológico fundamental, considerando as variações dos meios interno ou externo. Em 1733, o Reverendo Stephen Hales observou que a injeção de uma grande quantidade de água no sangue de um animal causava o inchamento dos músculos, fígado, rins e outros órgãos e que esse inchamento podia ser revertido pela injeção de uma solução salina (Mccarty e O'neil, 1992). Apesar disso, foi somente na primeira metade do século XX que estudos iniciais sobre regulação de volume celular foram realizados, verificando as variações do volume de eritrócitos expostos a condições anisomóticas (Macleod e Ponder,

1933; Guest, 1948). Desde então, a regulação de volume celular tem sido objeto de contínuos estudos envolvendo o equilíbrio termodinâmico e o transporte de água e solutos através de membranas celulares. Na atualidade, essas pesquisas têm por objetivo entender de que maneira a célula controla seu próprio volume.

Com poucas exceções (Greger, 1985), as membranas das células animais são altamente permeáveis à água (Colombe e Macey, 1974; Macknight, 1988). Essas membranas não suportam grandes variações de pressão hidrostática, e o movimento de água deve-se, em grande parte, a gradientes de concentração osmótica (CO) (Pasantes-Morales, Lezama *et al.*, 2006). Portanto, qualquer diferença entre as CO intra e extracelular é compensada por um movimento de água através das membranas celulares, o que ocasiona subseqüentes alterações de volume (Pasantes-Morales, Lezama *et al.*, 2006).

Há animais que não controlam ativamente a condição osmótica dos fluidos corpóreos, ou seja, a CO interna é igual à externa (osmoconformadores), e há aqueles que mantêm uma CO interna diferente daquela do meio no qual estão imersos (osmorreguladores) (Saransaari e Oja, 2006). Entretanto, mesmo em CO extracelular constante, a manutenção do volume celular é comprometida por alterações na CO intracelular, pois uma grande variedade de vias metabólicas leva à formação e à degradação de substâncias osmoticamente ativas (osmólitos). Além do mais, o transporte através da membrana modifica a CO celular e, portanto, o volume celular (Pasantes-Morales, Lezama *et al.*, 2006).

Mudanças no volume celular são causadas pelo movimento de água através da membrana celular devido a gradientes de pressão hidrostática (Δp) e osmótica ($\Delta \pi$). Tal movimento depende, em última instância, da condutibilidade hidráulica da membrana celular (L_p). Na região linear da produção de entropia num sistema, o fluxo de água J_v é dado por:

$$J_v = L_p (\Delta p - \Delta \pi)$$

$\Delta \pi$ depende da diferença de concentração efetiva através da membrana

celular (ΔC) e o coeficiente de reflexão (σ) para o soluto i .

$$\Delta\pi = R T \sum(\sigma_i \Delta C_i)$$

Onde R e T são a constante dos gases e a temperatura absoluta, respectivamente. A aplicação dessas equações supõe que o citosol se comporte como uma solução diluída, obedecendo à equação de estado de um gás ideal. Isto não é de todo verdade, como discutido em detalhe por vários autores (Clegg, 1984; Lechene, 1985; Clegg, 1988; Clegg, Jackson *et al.*, 1990; Fushimi e Verkman, 1991).

A constante L_p depende da presença de canais para água (aquaporinas) na membrana celular, uma família de moléculas que estão inseridas na membrana celular e permitem a passagem de água (Strange, 2004).

Quando células são banhadas por soluções isosmóticas, há 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 carregadas eletricamente (ânions orgânicos impermeáveis) no interior da célula, é compensada pela atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Dessa maneira, o volume de uma célula em um determinado momento passa a ser uma função da permeabilidade da membrana plasmática a todos os osmólitos pertinentes e às forças resultantes de entrada e/ou saída desses osmólitos. A permeabilidade da membrana plasmática é alta para a água e relativamente baixa para a maioria dos solutos. Como o movimento de água através das membranas celulares se dá predominantemente através de gradientes osmóticos, qualquer alteração no transporte de osmólitos, que não venha a ser compensada, ocasiona mudanças no volume celular. Na ausência de mecanismos compensatórios, células expostas a condições hiposmóticas incham e podem romper-se, a menos que a diferença de pressão hidrostática resultante estabeleça um fluxo de saída de maneira a igualar o fluxo de entrada ocasionado pela diferença de pressão osmótica. Como as membranas das células animais são frágeis, rompendo-se devido ao aumento de volume sem que haja aumento de pressão hidrostática suficiente para que ocorra o equilíbrio de fluxos descrito acima, não podem suportar um significativo gradiente de CO_2 . Assim, diversos mecanismos de regulação de volume

terminaram por ser desenvolvidos (Strange, 2004).

Nas células animais, são encontrados vários mecanismos envolvidos na regulação do volume celular. Estes mecanismos são altamente conservados e essencialmente semelhantes em células de vários tecidos, assim como de espécies evolutivamente distantes (Gilles, 1988; Chamberlin e Strange, 1989; Lang, Busch e Volkl, 1998). Eles incluem sensores hipotéticos do volume celular, sistemas de sinalização intracelular acoplados a estes sensores e finalmente, transportadores de membranas mediando a liberação ou tomada de compostos osmoticamente ativos para compensar o inchamento ou o murchamento celular (Strange, 2004).

Os mecanismos de regulação de volume celular são mais convincentemente revelados pela exposição de células a mudanças abruptas na CO extracelular (Lang, Lepple-Wienhues *et al.*, 1998). Se células são expostas a um meio hiposmótico, elas, inicialmente, incham quase como osmômetros ideais, mas, então, retornam ao volume celular original, pelo fenômeno descrito como redução regulatória de volume ("regulatory volume decrease - RVD"; ver Figura 1.2A). Mutatis mutandis para as células submetidas a meios hiperosmóticos, com o fenômeno descrito de aumento regulatório de volume ("regulatory volume increase - RVI"; ver Figura 1.2B). Embora nosso conhecimento dos mecanismos da regulação do volume celular não seja completo, vários mecanismos semelhantes foram encontrados entre tecidos diferentes e através dos filos (Chamberlin e Strange, 1989). Os dois processos de regulação de volume para condições anisomóticas, *i.e.*, RVD e RVI, utilizam transportadores específicos para os diferentes osmólitos que não parecem atuar em ambos os processos (McCarty e O'neil, 1992).

Deve-se ter claro que a exposição de células a um meio anisomótico não modifica apenas o volume celular, mas, também, o volume de organelas intracelulares, como as mitocôndrias (Kaasik, Safiulina *et al.*, 2006). Além disso, em paralelo à CO, a força iônica celular é alterada mesmo quando a força iônica extracelular for mantida constante. Por isso, as seqüelas de alterações osmóticas do volume celular não são necessariamente idênticas às conseqüências de alterações isomóticas do volume celular (Lang, Lepple-Wienhues *et al.*, 1998).

Alterações do volume celular podem ser limitadas por pressões do

tecido extracelular (Linshaw, 1980; Linshaw e Grantham, 1980; Pine, Brooks *et al.*, 1981; Trachtman, 1991). Mais importante, entretanto, é a capacidade das células em ajustar sua CO interna pelo movimento de íons inorgânicos (K^+ , Na^+ , Cl^- , HCO_3^-) através de transporte em membranas (Figura 1.3) e pela síntese, degradação e transporte de substâncias orgânicas (Chamberlin e Strange, 1989; Deaton e Pierce, 1994; Hallows e Knauf, 1994; Lang, Busch, Ritter *et al.*, 1998). Esses mecanismos são desencadeados por rápidas alterações no volume celular, não servindo, apenas, para reajustar o volume, mas, também, para alterar uma grande variedade de funções celulares. 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 submembranares (Strange, 2004).

Embora os seres humanos disponham de complexos mecanismos homeostáticos para manutenção de volume e composição do meio interno, desarranjos podem ocorrer. Patologias que causam hipertonicidade incluem diarreias severas, insuficiências renais, *diabetes mellitus* e *insipidus*, desidratação por diurese osmótica, privação de água, erros do metabolismo e alguns tipos de envenenamento. A administração intravenosa de alguns medicamentos ou materiais de contraste também pode causar hipertonicidade aguda. Por outro lado, hipotonicidade plasmática é geralmente associada à hiponatremia decorrente de desnutrição, insuficiência cardíaca, cirrose hepática ou secreção alterada do hormônio antidiurético (Mcmanus e Churchwell, 1994).

Muitas células não são expostas a flutuações da CO extracelular, sendo a CO intracelular comprometida pelo transporte e metabolismo celulares. Por exemplo, a quebra de proteínas em aminoácidos aumenta o conteúdo intracelular de partículas e cria um gradiente favorável ao influxo de água, aumentando, de maneira transitória, o volume celular. Por outro lado, a síntese de proteínas cria um gradiente favorável ao efluxo de água, diminuindo transitoriamente o volume celular (Lang e Waldegger, 1997).

O restabelecimento do volume celular após alterações requer redistribuição dos osmólitos intracelulares, permitindo que a água se movimente a favor de seu gradiente de concentração. Os osmólitos

empregados na regulação do volume incluem combinações de alguns íons inorgânicos (K^+ , Na^+ , Cl^- , HCO_3^-) e uma variedade de moléculas orgânicas (poliálcoois, metilaminas, aminoácidos) (Strange, 2004).

1.3.1 Mecanismos envolvidos na RVD

Essencialmente, todas as células (com exceção de alguns eritrócitos) respondem ao choque hiposmótico, ou seja, ao inchamento celular, com a redução regulatória de volume - RVD (Lang, Busch e Volkl, 1998). O inchamento celular ativa uma resposta de RVD nas quais as vias para os solutos são estimuladas e, juntamente com água, saem da célula, resultando em uma redução no volume celular.

Em diferentes tipos celulares, o inchamento decorrente da exposição a meios hiposmóticos leva ao efluxo de K^+ e outros íons através da ativação de canais iônicos, carregadores e ATPases. Há evidências de que canais aniônicos ativados pelo inchamento celular não são seletivos, permitindo a passagem não somente de Cl^- mas como, também, de HCO_3^- e outros íons, além de osmólitos orgânicos (Lang, Busch e Volkl, 1998). O movimento dos íons através dos canais é dirigido pelos seus respectivos gradientes eletroquímicos. Em muitas células, o gradiente eletroquímico para o K^+ conduz para fora, fazendo com que ocorra o efluxo deste íon quando os canais para K^+ são ativados. A saída do K^+ tende a hiperpolarizar a membrana celular, aumentando a força motriz para a saída de outros ânions. A ativação de canais seletivos a cátions durante a RVD presumivelmente não medeia a saída de íons, mas permite a entrada de Ca^{2+} que, ativando canais para K^+ dependente de Ca^{2+} , contribuem indiretamente para o efluxo de K^+ (Lang, Ritter *et al.*, 1993).

Alguns canais iônicos são ativados pelo estiramento da membrana (“stretch activated channels” – SACs) e acredita-se que isto ocorra durante o inchamento celular. A maioria dos SACs permite o efluxo de cátions e não é seletiva. Exemplos desses canais são encontrados em células de

neuroblastoma (Falke e Misler, 1989) e em células epiteliais humanas (Numata, Shimizu *et al.*, 2006).

Juntamente com os canais iônicos, o sistema de transporte utilizado com mais frequência na RVD é o cotransporte eletroneutro de KCl (Lauf, 1988). Esta participação é constatada em eritrócitos de diversos mamíferos, peixes e aves (Lauf, Bauer *et al.*, 1992), tais como, hemácias caninas (Parker, Colclasure *et al.*, 1991), hemácias de patos (Haas, Schmidt *et al.*, 1982), células tumorais de Ehrlich (Levinson, 1991), células do córtex renal de coelho (Gilles, Duchene *et al.*, 1983), linfócitos (Grinstein, Dupre *et al.*, 1982), células do túbulo proximal de rato (Volkl, Geibel *et al.*, 1986) e espermatozóides de camundongos e humanos (Klein, Cooper *et al.*, 2006).

O efluxo de aminoácidos (Hoffmann e Hendil, 1976; Hoffmann e Lambert, 1983; Leite e Goldstein, 1987; Roy e Sauve, 1987; Garcia-Perez e Burg, 1991; Lambert e Hoffmann, 1993), poliálcoois, como sorbitol e inositol (Bagnasco, Murphy *et al.*, 1988; Nakanishi e Burg, 1989; Garcia-Perez e Burg, 1991) e metilaminas, como betaina e glicerofosforilcolina (Nakanishi e Burg, 1989; Garcia-Perez e Burg, 1991), ocorre em muitos tipos celulares através dos canais ativados pelo estiramento da membrana (“volume sensitive osmolyte-anions channels” – VSOAC).

Além destes, outros mecanismos foram descritos, como a ativação paralela dos permutadores K^+/H^+ e Cl^-/HCO_3^- em eritrócitos de *Amphiuma* (Cala, 1980). A $Na^+-K^+-ATPase$ também é ativada pelo inchamento celular em vários tipos de células, tais como em músculo esquelético (Venosa, 1991), células de glioma C6 (Mongin, Aksentsev *et al.*, 1996), neurônios de rato (Aksentsev, Mongin *et al.*, 1994) e miócitos cardíacos humanos (Whalley, Hool *et al.*, 1993). Em eritrócitos de várias espécies, a RVD é mediada pela Ca^{2+} -ATPase (Lang, Busch e Volkl, 1998).

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, Busch e Volkl, 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 intracelulares; *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 e 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 muitas pesquisas. Em túbulo proximal renal, demonstrou-se que as células podem detectar e responder a mudanças de volume menores que 3% (Lohr e Grantham, 1986). 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 (Hallows e Knauf, 1994). 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, Yiming *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 e Hamet, 2006; Salathe, 2006).

A capacidade de regulação de volume envolve uma grande diversidade de sistemas de transporte iônico na membrana celular (Figura 1.3). Assim, os mecanismos efetores são, basicamente, sistemas dependentes de proteínas transmembrânicas e incluem transporte mediado ativo (ATPases) e transporte mediado 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 (Hoffmann, Lambert *et al.*, 1988; Lambert e Hoffmann, 1993); as quinases e fosfatases (Kaji e Tsukitani, 1991; Force e Bonventre, 1994); AMPc e proteína G (Davis, Hogan *et al.*, 1992; Force e Bonventre, 1994) e o cálcio intracelular (Berridge, Lipp *et al.*, 2000; Souza, Gross *et al.*, 2000; Bai, 2004).

1.3.2 Mecanismos envolvidos na RVI

Ao contrário do que ocorre em células submetidas a choques hiposmóticos, nos quais praticamente todas respondem satisfatoriamente, nem todas as células são capazes de regular o volume quando submetidas a choques hiperosmóticos, *i.e.*, a RVI não tem sido observada em todas as células.

Acredita-se que as etapas iniciais da RVI são caracterizadas pelo influxo de Na^+ e Cl^- e, em alguns casos, de K^+ , através de três mecanismos: ativação paralela dos permutadores Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Cala, 1980); cotransporte $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ (Haas, Schmidt *et al.*, 1982) e cotransporte $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ (Hoffmann, Lambert *et al.*, 1988). A seguir, observa-se o acúmulo de osmólitos orgânicos, aminoácidos, uréia e poliálcoois (Chamberlin e Strange, 1989; Lewis e Donaldson, 1990; Garcia-Perez e Burg, 1991). Há evidências que os aminoácidos podem, também, ter como função a proteção da célula contra mudanças agudas no ambiente osmótico, além da participação do ajuste osmótico (Law, 1991). Determinadas células mostram, durante a RVI, um decréscimo no fluxo passivo de íons, particularmente K^+ e Cl^- (Lewis e Donaldson, 1990).

Algumas células dependem da ativação do transporte acoplado Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ na recuperação de seus volumes, como foi constatado em leucócitos humanos (Grinstein e Foskett, 1990), túbulo proximal do córtex renal de coelhos (Lohr, Sullivan *et al.*, 1989), células da medula renal de camundongos (Hebert, 1986) e células sanguíneas de *Amphiuma* (Cala, 1980). Já em estudos feitos com linfócitos humanos (Grinstein, Clarke *et al.*, 1983), células acinares da glândula lacrimal de ratos (Douglas e Brown, 1996) e fibroblastos NIH que expressam o oncogene *ras* (Lang, Ritter *et al.*, 1992), observou-se que a RVI é resultado tanto da ativação do transporte acoplado Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ como do cotransporte $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$. Finalmente, há células que apresentam o cotransporte $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ como sendo o principal mecanismo responsável pela RVI, como é o caso de células endoteliais da córnea de bois (Hara, Reinach *et al.*, 1999), células endoteliais vasculares humanas (Klein, Perry *et al.*, 1993), enterócitos de aves (Montero e Ilundain, 1989), células tumorais de Ehrlich

(Levinson, 1990) e células de glioma C6 de ratos (Mountian e Van Driessche, 1997).

Um outro transporte de relevância comprovada nos processos de RVI é o originado pela $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Essa ATPase é ativada de modo compensatório como consequência do aumento da permeabilidade ao sódio através dos sistemas de transporte característicos da RVI. Ela atua, portanto, diretamente na manutenção da concentração intracelular de Na^+ e, indiretamente, na manutenção dos gradientes intracelulares de Cl^- e K^+ (O'Neill, 1999). Tal fato foi constatado em vários tipos celulares, como em leucócitos humanos (Grinstein e Foskett, 1990), hepatócitos de ratos (Wehner e Tinel, 1998), células endoteliais da córnea de bois (Hara, Reinach *et al.*, 1999) em células tumorais de Ehrlich de camundongos (Levinson, 1990), células de glioma C6 de ratos e células da medula renal (alça de Henle) de camundongos (Hebert, 1986). Em células renais humanas ocorre um aumento considerável na expressão da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ durante estresses hiperosmóticos (Yordy e Bowen, 1993), enquanto que em miócitos cardíacos de coelhos foi constatada a inibição da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em consequência do murchamento celular (Whalley, Hool *et al.*, 1993).

Sabe-se, ainda, que a abertura de canais para Na^+ constitui um dos caminhos utilizados pelas células para aumentar seu volume (Lang, Lepple-Wienhues *et al.*, 1998). Pesquisas em cultura primária de hepatócitos de ratos revelaram o primeiro sistema que apresentou aumento na condutância ao Na^+ quando tais células foram expostas ao estresse hiperosmótico, juntamente com a ativação do permutador Na^+/H^+ e o cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (Wehner, Sauer *et al.*, 1995; Wehner e Tinel, 1998; Bohmer, Wagner *et al.*, 2000). Em células do ducto coletor de camundongos, a hipertonicidade do meio ativa canais para cátions não seletivos (Volk, Fromter *et al.*, 1995).

Em células renais de cães (Ritter, Steidl *et al.*, 1991) e em hepatócitos (Graf, Haddad *et al.*, 1988) foi demonstrado que o murchamento celular inibe canais para K^+ e Cl^- . Em células do túbulo convoluto proximal de coelhos (Macri, Breton *et al.*, 1997) e enterócitos de aves (Montero e Ilundain, 1989) a condutância a estes íons diminui drasticamente. Deste modo, ocorre a prevenção da perda de eletrólitos através destes canais. Verificaram ainda (Macri, Breton *et al.*, 1997), em células do túbulo convoluto proximal de

coelhos, a participação do cotransporte $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$, mecanismo este anteriormente não descrito nos processos de RVI.

Assim, o influxo de eletrólitos durante a RVI é decorrente, principalmente, da ativação do co-transporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (Hoffmann e Lambert, 1983; Lytle, 1998) e/ou dos permutadores Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Grinstein, Clarke *et al.*, 1983). Entretanto, o acúmulo celular de eletrólitos após o murchamento é limitado devido ao fato de que altas concentrações de íons interferem na estrutura e função de macromoléculas, incluindo as proteínas (Yancey, Clark *et al.*, 1982). Além disso, o transporte de íons através da membrana celular modifica o potencial de membrana e a homeostase de eletrólitos intracelulares (Lang, Lepple-Wienhues *et al.*, 1998).

Através de um mecanismo curioso que afasta os efeitos decorrentes da alteração na composição de íons, as células muitas vezes produzem moléculas que atuam como osmólitos, as quais seriam especificamente designadas para criar um gradiente de CO sem comprometer outras funções celulares (Handler e Kwon, 1993; Kinne, 1993; Garcia-Romeu, Borgese *et al.*, 1996). Tais osmólitos orgânicos são particularmente importantes na regulação de volume na medula renal, onde a CO extracelular pode tornar-se quatro vezes a do plasma em condições isosmóticas (Kwon, 1994).

1.4 Regulação de volume em células tumorais

Alguns estudos têm mostrado a participação dos diferentes mecanismos de regulação de volume nos processos de proliferação celular (Mcmanus e Churchwell, 1994). Há evidência de que estes processos estão relacionados com o aumento do volume (Lang, Lepple-Wienhues *et al.*, 1998). Inchamentos celulares moderados se relacionam com um aumento na taxa de proliferação em células transformadas, ao passo que grandes inchamentos levam à necrose celular (Lang, Ritter *et al.*, 2000; Okada e Maeno, 2001). Assim, soluções hiperosmóticas que causam murchamento celular inibem a proliferação celular (Robbins, Pederson *et al.*, 1970; Yancey e Burg, 1990), enquanto que soluções moderadamente hiposmóticas a aceleram (Anbari e Schultz, 1993).

Antes da mitose, as células passam da fase G_0 para as fases G_1 , S e G_2 , as quais são acompanhadas do aumento do volume celular decorrente do influxo de íons (Lang, Uhlemann *et al.*, 1999). Os mecanismos que levam essas células à perda da capacidade de diferenciação e ao aumento das divisões mitóticas têm sido alvos de inúmeras pesquisas. Assim, parece que alterações de volume relacionadas com a divisão celular dependem de fatores mitogênicos, os quais também modulam as vias condutivas de osmólitos. Neste sentido, sabe-se que uma ampla variedade desses fatores ativa o permutador Na^+/H^+ , enquanto outros estimulam o simporte $Na^+-K^+-2Cl^-$ (Ritter e Wöll, 1996).

O conceito de que pequenas variações no volume de uma célula controlam o crescimento da mesma é fortalecido pela evidência de que tais variações alteram o metabolismo celular. O aumento de volume em hepatócitos (Stoll, Gerok *et al.*, 1992; Rivas, Urcelay *et al.*, 1995) intensifica a síntese e diminui a degradação de proteínas, enquanto a sua redução tem efeito oposto. Efeitos paralelos são vistos na síntese e quebra de glicogênio. Estes processos também representam mecanismos regulatórios de volume, pelo fato de que moléculas osmoticamente ativas são consumidas durante a síntese de proteínas e glicogênio e liberadas durante proteólise e glicogenólise (Haussinger, 1996).

Especulam-se quais seriam as vias sensíveis a volume que desempenhariam um papel primário na proliferação celular (Mcmanus e Churchwell, 1994) e muitos estudos têm examinado os diferentes mecanismos de transporte na proliferação celular. Células que expressam o oncogene *ras* (*ras* positivo), quando expostas a meios extracelulares anisomóticos, demonstram aumento ou redução de volume maior do que células *ras* negativas (que não expressam oncogene *ras*). Contudo, ambas são capazes de regulação do volume (Lang, Ritter *et al.*, 1992). O permutador Na^+/H^+ é importante tanto na regulação do pH intracelular quanto no controle do volume, podendo, também, desempenhar papel na iniciação e manutenção da proliferação celular. Há evidências indicando que a alcalinização intracelular produzida pela estimulação do permutador Na^+/H^+ seja um ativador da maquinaria celular responsável pela proliferação ou que a ativação do

permutador Na^+/H^+ seja parte de uma via de sinalização mitótica (Sapirstein e Benos, 1984).

Investigando o cotransporte $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ em células transfectadas com o oncogene *Ha-ras*, verificou-se que este oncogene aumenta a atividade do cotransporte em, aproximadamente, quatro vezes (Meyer, Maly *et al.*, 1991). Este fato foi associado a um aumento paralelo no volume celular e no aumento na taxa de proliferação celular, mecanismos estes que foram bloqueados por furosemide (um bloqueador do cotransporte $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$). A proliferação celular induzida pelo mitógeno bombesina foi também bloqueada por furosemide. Estes resultados sugerem que a ativação do cotransporte $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ seja um componente importante nas vias de sinalização da mitose.

Tendo em vista que muitos mecanismos de regulação de volume celular estão implicados na proliferação, o estudo destes em células tumorais torna-se relevante. Além disso, tanto em células tumorais quanto em normais, mecanismos comuns aparentemente podem exibir diversidade, tratando-se de um aspecto relevante da fisiologia celular a ser considerado e exaustivamente estudado. Sabe-se que a proliferação descontrolada de um determinado grupo de células pode ser causada pela ativação de oncogenes. De forma geral, oncogenes são genes celulares normais que, sofrendo mutação em determinados *loci*, podem tornar-se hiperativos. Tal acontecimento leva, então, ao estímulo anormal do crescimento celular ou à falta de expressão de algumas vias inibitórias específicas, as quais normalmente regulam a proliferação celular (Liotta, Guirguis *et al.*, 1987).

A regulação de volume em células tumorais tem sido objeto de estudo em nosso laboratório, utilizando células de melanoma murino S91. Estes estudos indicam que tais células apresentam capacidade de regular seu volume quando expostas a choques anisomóticos (Perci-Lima, 2000; Fernandes, 2002; Macfadem, 2002; Pergher, 2004; Perci-Lima, 2005). Estes mesmos trabalhos evidenciaram a existência de RVD (Perci-Lima, 2000; Fernandes, 2002) e de RVI (Macfadem, 2002) nestas células, além de apresentar algumas evidências de participação de mecanismos de transporte de membrana nos processos regulatórios. Assim, há evidências da participação de canais para Cl^- , K^+ e Ca^{2+} durante a RVD nestas células. Mostrou-se que a

regulação de volume não ocorre se tais canais forem bloqueados. Através do uso de colchicina e citocalasina B, foi evidenciada, ainda, a participação do citoesqueleto na RVD (Perci-Lima, 2000), a participação dos permutadores K^+/Cl^- e Cl^-/HCO_3^- (Fernandes, 2002), e do cálcio intracelular (Perci-Lima, 2005). Foram constatadas, também, as participações do cotransporte $Na^+-K^+-2Cl^-$, dos permutadores Na^+/H^+ e Cl^-/HCO_3^- (com ou sem a adição dos respectivos bloqueadores, bumetanida e hexametilamilorida), e da $Na^+-K^+-ATPase$ (ouabaína), em soluções isosmóticas e hiperosmóticas, na regulação de volume destas células (Macfadem, 2002). Outro estudo em nosso laboratório visou correlacionar a CO, volume e proliferação celular (Pergher, 2004). Os resultados sugerem que o ritmo de proliferação celular é influenciado tanto pelo volume quanto pelos principais canais envolvidos no fenômeno da regulação de volume em células de melanoma murino S91.

Contudo, aspectos relevantes do transporte de água em células de melanoma murino S91 submetidas a condições anisomóticas nunca foram alvo de estudos até o momento. Recentemente, estudos em camundongos knock-out para AQP1 (Saadoun, Papadopoulos *et al.*, 2005), observaram a redução do tumor nestes animais. Viram, também, que tumores implantados cresceram menos, indicando que tanto a proliferação quanto a neovascularização são promovidas pela AQP1. Após este trabalho, muitos outros estudos têm sido realizados com o propósito de correlacionar as AQPs e a angiogênese, bem como buscar novas vias terapêuticas para o tratamento do câncer. Assim, em células de melanoma B16, a inibição de AQP reduziu o potencial metastático nestas células (Hu e Verkman, 2006). Resultados similares foram encontrados em células tumorais em pulmão humano revelando a possibilidade de novas terapias para estes tumores (Hoque, Soria *et al.*, 2006). Neste sentido, o presente trabalho visa esclarecer alguns aspectos do transporte de água em células de melanoma murino S91 submetidas a condições anisomóticas.

Figura 1.1. Genes da família das aquaporinas humana e homólogos de *Escherishia coli*. As subsetas correspondem às aquaporinas clássicas e aquagliceroporinas. Na parte mais escura estão representadas as seqüências de cDNA com seus homólogos codificados com demonstrada alta permeabilidade à água (AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 e AqpZ de *E. coli*) e proximamente relacionadas seqüências com outras funções potenciais (AQP0 e AQP6). Estão também representadas (parte clara) as aquagliceroporinas com permeabilidade à água e ao glicerol (AQP3, AQP7, AQP9, AQP10 e GlpF de *E. coli*) De:(Agre e Kozono, 2003).

Figura 1.2. Representação esquemática do volume celular em função do tempo em respostas a choques anisomóticos extracelulares. A: inchamento e redução regulatória de volume (RVD). No tempo 1, as células são expostas a um meio hiposmótico ou a entrada de solutos é estimulada. Em resposta, as células sofrem RVD, através da extrusão de osmólitos e de água, para alcançar um patamar próximo ao volume inicial. Quando, no tempo 2, as células são recolocadas no meio isosmótico, o banho se encontra ligeiramente hiperosmótico em relação ao citoplasma devido a perda de osmólitos intracelulares na RVD, e as células murcham rapidamente abaixo do volume inicial. As células então ganham osmólitos e volume através de um processo chamado aumento regulatório de volume (RVI) post-RVD. B: Murchamento e RVI. No tempo 1, ou as células são expostas a um meio hiperosmótico ou a saída de solutos é estimulada. Em resposta, as células murcham e então sofrem RVI, através da entrada de osmólitos e água, para alcançar um patamar próximo ao volume inicial. Quando, no tempo 2, as células são recolocadas no meio isosmótico, o banho se encontra ligeiramente hiposmótico em relação ao citoplasma devido ao ganho de osmólitos intracelulares na RVI, e as células incham rapidamente acima do volume inicial. As células então perdem osmólitos e volume através de um processo chamado RVD post-RVI (Baseado em: (Mccarty e O'neil, 1992)).

Figura 1.3. Principais mecanismos transportadores transmembranais envolvidos na regulação de volume celular (modificado de (Hallows e Knauf, 1994)).

1.5 Material e Métodos

1.5.1 Cultura de células

As células S91 de melanoma murino de Cloudman, linhagem parcialmente melanótica, foram adquiridas da American Type Culture Collection – ATCC (Rockville, MD). Estas células foram, originalmente, extraídas de tumor surgido espontaneamente em camundongos da linhagem DBA/2J (Figura 1.4), tendo sido estabelecidas em cultura na década de 60 (Yasumura, Tashjian Jr. *et al.*, 1966).

As células S91 de melanoma murino foram cultivadas em meio F-12 de Ham (Cultilab, Campinas, SP), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP) e bicarbonato de sódio 14,3 mM, em frascos plásticos de cultura (Corning, USA) de 75 cm² e, então, acondicionadas em estufa de CO₂ (Revco, USA) a 5% e a 37 °C. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias e as células repicadas quando atingiam a confluência nos frascos, de 6 a 10 X 10⁶ células (Figura 1.5). Para tal procedimento, as células eram removidas com solução de Tyrode/EDTA (NaCl 140 mM, KCl 3 mM, NaHCO₃ 12 mM, NaH₂PO₄ 0,2 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 5 mM; 290 mOsm.kg H₂O⁻¹; pH 7,4; 37 °C) e transferidas para novos frascos de cultura ou para discos plásticos para a realização de experimentos.

Dessas células, alíquotas foram congeladas em meio de cultura suplementadas com 10% de SFB e 10% de di-metil-sulfóxido (DMSO) e mantidas em reservatório de nitrogênio líquido ou acomodadas em freezer à temperatura de – 80 °C.

As células utilizadas nos experimentos apresentavam-se, no máximo, na 5^a passagem.

Figura 1.4. Tumor de aproximadamente 20 dias originado após inoculação de 6×10^6 células S91 em camundongos DBA/2J (Perci-Lima, 2005).

Figura 1.5. Células de melanoma murino S91 em cultura de monocamada, mantidas em meio F-12 de HAM, suplementado com 10% SFB. Imagem adquirida através de um microscópio invertido de contraste de fase (Axiovert 100, Zeiss), ao qual foi acoplada uma câmera de vídeo digital (JVC) e um software de aquisição de imagens (Image Pro-Lite). Aumento de 200X.

1.5.2 Preparação das células

Antes do início dos experimentos, as células eram removidas com solução de Tyrode/EDTA e uma alíquota de 5 μ L era transferida para discos de cultura de 35 mm (Corning, USA). As células eram cobertas com 4 mL de meio de cultura F-12 de Ham e incubadas por 10 min a 37 °C. Após esse período, as células apresentavam-se em formato esférico e parcialmente aderidas.

1.5.3 Sistema de perfusão

O sistema de perfusão foi montado sobre a pátina de um microscópio invertido, constando de uma câmara onde foi possível acoplar o disco de cultura e de uma bomba peristáltica.

A concentração osmótica tanto do meio de cultura como da solução isosmótica (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM, glicose 5 mM, HEPES 5 mM) foi de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹; pH 7,4 a 37 °C. As concentrações das soluções hiposmótica e hiperosmótica foram, respectivamente, de 190 mOsm.kgH₂O⁻¹ e 350 mOsm.kgH₂O⁻¹; pH 7,4 a 37 °C. Todas as concentrações foram determinadas com o auxílio de um osmômetro de pressão de vapor (Wescor, Inc. Logan, UTAH). As soluções hiposmóticas e hiperosmóticas foram preparadas a partir do protocolo da solução isosmótica, com adição de diferentes quantidades de água (determinadas experimentalmente às concentrações osmóticas finais). Assim, as proporções relativas dos solutos foram alteradas de maneira proporcional às mudanças nas concentrações osmóticas. A temperatura da sala onde foram realizados os experimentos também foi controlada, conforme a necessidade de cada experimento, e os horários dos experimentos sempre foram os mesmos. Além disso, em cada condição experimental, as células foram da mesma população, ou seja, da mesma passagem.

Para o estudo da regulação de volume frente a choques anisosmóticos agudos, inicialmente o meio de cultura foi retirado do disco com o auxílio de uma pipeta Pasteur e a cultura, então, perfundida com a solução isosmótica

para obtenção da imagem controle (tempo 0 min). A seguir, procedeu-se a perfusão com as soluções experimentais, com imagens obtidas em intervalos de um minuto até o quinto minuto; de cinco minutos do quinto ao décimo minuto e de dez minutos em dez minutos até o final do experimento, totalizando 60 minutos (12 imagens no total).

1.5.4 Aquisição e análise das imagens

As imagens das células na câmara de superfusão foram monitoradas através de um microscópio invertido de contraste de fase (Axiovert 100, Zeiss), ao qual foi acoplada uma câmera de vídeo digital (JVC). As imagens observadas foram gravadas em um microcomputador, conforme protocolo pré-determinado acima (item 1.5.3).

Para a aquisição e análise das imagens gravadas, mostrando as variações da secção transversal (S , em μm^2) das células, utilizou-se o software Image Pro-Lite (Media Cybernetics®). Em cada grupo experimental, foram analisadas as células que apresentavam as imagens mais adequadas à determinação da área celular. A cada experimento, foram analisadas 40 células.

Os valores de área ao longo do tempo foram convertidos em volumes absolutos (μm^3): $V_a(t) = S(t)^{3/2}$. A automatização da computação foi feita através de uma planilha do programa Microsoft Excel. A média aritmética dos volumes celulares obtidos ao longo do tempo foi dividida pelo volume médio inicial, normalizando-se esses valores. Assim, o volume inicial passa a valer “1”, e os demais, assinalados como $V(t)$, são expressos como frações: $V(t) = V_a(t)/V_0$. A rapidez com que as células aumentavam ou diminuam de volume, frente aos choques anisomóticos agudos, eram obtidas por regressão linear por mínimos quadrados, e comparadas entre si através de teste-F (Prisma, GraphPad Inc.).

O extremo de volume (V_{xtr}) foi considerado como o extremo de média da fase de inchamento ou murchamento inicial. O valor ΔV_{xtr} é dado por:

- i) Choques hiperosmóticos: $\Delta V_{\text{xtr}} = 1 - V_{\text{xtr}}$;
- ii) Choques hiposmóticos: $\Delta V_{\text{xtr}} = V_{\text{xtr}} - 1$.

Note assim, que ΔV_{xtr} torna-se, sempre, um número positivo. A fase de retorno ao volume inicial das células é caracterizada por uma dinâmica de primeira ordem. Assim, a rapidez com que as células regulam o volume é dada pela constante de decaimento (k), a partir da equação:

$$v(t) = \Delta V_{\text{xtr}} e^{kt}$$

Para obtenção da constante de decaimento nos experimentos envolvendo choques anisomóticos agudos, os dados sofreram, portanto, as seguintes transformações:

- i) Choques hiperosmóticos: $v(t) = 1 - V(t)$;
- ii) Choques hiposmóticos: $v(t) = V(t) - 1$;
- iii) Linearização: $\ln(v(t)) = \ln(\Delta V_{\text{xtr}} e^{kt}) \Leftrightarrow y(t) = a + kt$,

Sendo $a = \ln(\Delta V_{\text{xtr}})$

A partir dos dados transformados e linearizados, as constantes de decaimento eram obtidas por regressão linear por mínimos quadrados, e comparadas entre si (ver Capítulos 2 e 3) através de teste-F (Prisma, GraphPad Inc.)

Ao final de cada experimento, foram adicionadas algumas gotas de “Trypan blue” para verificar a viabilidade das células, sendo tal viabilidade estimada pela não coloração azul do citoplasma e tinha por objetivo comprovar que as células estavam vivas até o fim de cada experimento, sendo que, quando tal condição não era satisfeita, o experimento era descartado.

1.5.5 Análise Estatística

Os dados dos grupos experimentais foram submetidos aos testes estáticos ANOVA seguido de Tukey, tendo-se considerado as diferenças significativas quando $p < 0,05$. Para as análises entre os grupos experimentais e o grupo controle, os dados estatísticos foram submetidos ao Teste t de Student, considerando as diferenças significativas quando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada através do software Prisma, GraphPad Inc. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) de n células em três experimentos.

1.6 Referências Bibliográficas

- Agre, P. e D. Kozono. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. FEBS Lett, v.555, n.1, Nov 27, p.72-8. 2003.
- Aksentsev, S. L., A. A. Mongin, *et al.* Osmotic regulation of sodium pump in rat brain synaptosomes: the role of cytoplasmic sodium. Brain Res, v.644, n.1, Apr 25, p.1-6. 1994.
- Al-Habori, M. Macromolecular crowding and its role as intracellular signalling of cell volume regulation. Int J Biochem Cell Biol, v.33, n.9, Sep, p.844-64. 2001.
- Alberts, B., D. Bray, *et al.* Molecular biology of the cell. New York: Garland Publishing. 2002
- Anbari, K. e R. M. Schultz. Effect of sodium and betaine in culture media on development and relative rates of protein synthesis in preimplantation mouse embryos in vitro. Mol Reprod Dev, v.35, n.1, May, p.24-8. 1993.
- Bagnasco, S. M., H. R. Murphy, *et al.* Osmoregulation by slow changes in aldose reductase and rapid changes in sorbitol flux. Am J Physiol, v.254, n.6 Pt 1, Jun, p.C788-92. 1988.
- Bai, M. Structure-function relationship of the extracellular calcium-sensing receptor. Cell Calcium, v.35, n.3, Mar, p.197-207. 2004.
- Becker, T. The world of the cell. Benjamin/Cummings: Menlo Park. 1986
- Benga, G. Birth of water channel proteins-the aquaporins. Cell Biol Int, v.27, n.9, p.701-9. 2003.
- Berridge, M. J., P. Lipp, *et al.* Signal transduction. The calcium entry pas de deux. Science, v.287, n.5458, Mar 3, p.1604-5. 2000.
- Bohmer, C., C. A. Wagner, *et al.* The shrinkage-activated Na(+) conductance of rat hepatocytes and its possible correlation to rENaC. Cell Physiol Biochem, v.10, n.4, p.187-94. 2000.
- Cala, P. M. Volume regulation by Amphiuma red blood cells. The membrane potential and its implications regarding the nature of the ion-flux pathways. J Gen Physiol, v.76, n.6, Dec, p.683-708. 1980.
- Chamberlin, M. E. e K. Strange. Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view. Am J Physiol, v.257, n.2 Pt 1, Aug, p.C159-73. 1989.
- Cho, S. J., J. Cho, *et al.* The number of secretory vesicles remains unchanged following exocytosis. Cell Biol Int, v.26, n.1, p.29-33. 2002.
- Clegg, J. S. Properties and metabolism of the aqueous cytoplasm and its boundaries. Am J Physiol, v.246, n.2 Pt 2, Feb, p.R133-51. 1984.
- _____. L-929 cells under hyperosmotic conditions. Water, Na⁺, and K⁺. Cell Biophys, v.13, n.2, Oct, p.119-32. 1988.

- Clegg, J. S., S. A. Jackson, *et al.* Effects of reduced cell volume and water content on glycolysis in L-929 cells. J Cell Physiol, v.142, n.2, Feb, p.386-91. 1990.
- Colombe, B. W. e R. I. Macey. Effects of calcium on potassium and water transport in human erythrocyte ghosts. Biochim Biophys Acta, v.363, n.2, Sep 6, p.226-39. 1974.
- Davis, B. A., E. M. Hogan, *et al.* Role of G proteins in stimulation of Na-H exchange by cell shrinkage. Am J Physiol, v.262, n.2 Pt 1, Feb, p.C533-6. 1992.
- De Baey, A. e A. Lanzavecchia. The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis. J Exp Med, v.191, n.4, Feb 21, p.743-8. 2000.
- Deaton, L. E. e S. K. Pierce. Introduction: cellular volume regulation--mechanisms and control. J Exp Zool, v.268, n.2, Feb 1, p.77-9. 1994.
- Douglas, I. J. e P. D. Brown. Regulatory volume increase in rat lacrimal gland acinar cells. J Membr Biol, v.150, n.2, Mar, p.209-17. 1996.
- Falke, L. C. e S. Misler. Activity of ion channels during volume regulation by clonal N1E115 neuroblastoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.86, n.10, May, p.3919-23. 1989.
- Fernandes, C. I. Redução regulatória de volume (RVD) em células de melanoma murino - linhagem S-91: participação do contranporte KCl, do trocador Cl⁻/HCO₃⁻ e Na⁺- K⁺- ATPase. Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia para obtenção do título de mestre, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002. 55 p.: il p.
- Ferri, D., A. Mazzone, *et al.* Ontogeny, distribution, and possible functional implications of an unusual aquaporin, AQP8, in mouse liver. Hepatology, v.38, n.4, Oct, p.947-57. 2003.
- Finkelstein, A. Water movements through lipid bilayers, pores and plasma membranes: theory and reality. New York: Wiley. 1987
- Force, T. e J. V. Bonventre. Cellular signal transduction mechanisms. In: K. Strange (Ed.). Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. Florida: Boca Raton, 1994. Cellular signal transduction mechanisms, p.259
- Fushimi, K. e A. S. Verkman. Low viscosity in the aqueous domain of cell cytoplasm measured by picosecond polarization microfluorimetry. J Cell Biol, v.112, n.4, Feb, p.719-25. 1991.
- Garcia-Perez, A. e M. B. Burg. Role of organic osmolytes in adaptation of renal cells to high osmolality. J Membr Biol, v.119, n.1, Jan, p.1-13. 1991.
- Garcia-Romeu, F., F. Borgese, *et al.* A role for the anion exchanger AE1 (band 3 protein) in cell volume regulation. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), v.42, n.7, Nov, p.985-94. 1996.
- Gilles, R. Comparative aspects of cell osmoregulation and volume control. Ren Physiol Biochem, v.11, n.3-5, May-Oct, p.277-88. 1988.
- Gilles, R., C. Duchene, *et al.* Effect of osmotic shocks on rabbit kidney cortex slices. Am J Physiol, v.244, n.6, Jun, p.F696-705. 1983.

- Graf, J., P. Haddad, *et al.* Cell volume regulation in liver. Ren Physiol Biochem, v.11, n.3-5, May-Oct, p.202-20. 1988.
- Greger, R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. Physiol Rev, v.65, n.3, Jul, p.760-97. 1985.
- Grinstein, S., C. A. Clarke, *et al.* Activation of Na⁺/H⁺ exchange in lymphocytes by osmotically induced volume changes and by cytoplasmic acidification. J Gen Physiol, v.82, n.5, Nov, p.619-38. 1983.
- Grinstein, S., A. Dupre, *et al.* Volume regulation by human lymphocytes. Role of calcium. J Gen Physiol, v.79, n.5, May, p.849-68. 1982.
- Grinstein, S. e J. K. Foskett. Ionic mechanisms of cell volume regulation in leukocytes. Annu Rev Physiol, v.52, p.399-414. 1990.
- Guest, G. M. Osmometric behavior of normal and abnormal human erythrocytes. Blood, v.3, p.541. 1948.
- Haas, M., W. F. Schmidt, 3rd, *et al.* Catecholamine-stimulated ion transport in duck red cells. Gradient effects in electrically neutral [Na⁺ + K⁺ + 2Cl⁻] Co-transport. J Gen Physiol, v.80, n.1, Jul, p.125-47. 1982.
- Hallows, K. R. e P. A. Knauf. Principles of cell volume regulation. In: K. Strange (Ed.). Cellular and Molecular Physiology of the Cell Volume Regulation. Florida: Boca Raton, 1994. Principles of cell volume regulation, p.3-28
- Handler, J. S. e H. M. Kwon. Regulation of renal cell organic osmolyte transport by tonicity. Am J Physiol, v.265, n.6 Pt 1, Dec, p.C1449-55. 1993.
- Hara, E., P. S. Reinach, *et al.* Fluoxetine inhibits K⁽⁺⁾ transport pathways (K⁽⁺⁾ efflux, Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-2Cl⁽⁻⁾ cotransport, and Na⁽⁺⁾ pump) underlying volume regulation in corneal endothelial cells. J Membr Biol, v.171, n.1, Sep 1, p.75-85. 1999.
- Haussinger, D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. Biochem J, v.313 (Pt 3), Feb 1, p.697-710. 1996.
- Hebert, S. C. Hypertonic cell volume regulation in mouse thick limbs. II. Na⁺-H⁺ and Cl⁽⁻⁾-HCO₃⁽⁻⁾ exchange in basolateral membranes. Am J Physiol, v.250, n.6 Pt 1, Jun, p.C920-31. 1986.
- Hoffmann, E. K. e K. B. Hendil. The role of amino acids and taurine in isosmotic intracellular regulation in Erlich ascites tumor cells. J Comp Physiol, v.108, p.279-286. 1976.
- Hoffmann, E. K. e I. H. Lambert. Amino acid transport and cell volume regulation in Ehrlich ascites tumour cells. J Physiol, v.338, May, p.613-25. 1983.
- Hoffmann, E. K., I. H. Lambert, *et al.* Mechanisms in volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells. Ren Physiol Biochem, v.11, n.3-5, May-Oct, p.221-47. 1988.
- Hoque, M. O., J. C. Soria, *et al.* Aquaporin 1 is overexpressed in lung cancer and stimulates NIH-3T3 cell proliferation and anchorage-independent growth. Am J Pathol, v.168, n.4, Apr, p.1345-53. 2006.

- Hu, J. e A. S. Verkman. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. Faseb J, v.20, n.11, Sep, p.1892-4. 2006.
- Jeremic, A., W. J. Cho, *et al*. Involvement of water channels in synaptic vesicle swelling. Exp Biol Med (Maywood), v.230, n.9, Oct, p.674-80. 2005.
- Kaasik, A., D. Safiulina, *et al*. Regulation of Mitochondrial Matrix Volume. Am J Physiol Cell Physiol, Jul 26. 2006.
- Kaji, D. M. e Y. Tsukitani. Role of protein phosphatase in activation of KCl cotransport in human erythrocytes. Am J Physiol, v.260, n.1 Pt 1, Jan, p.C176-80. 1991.
- Kinne, R. K. The role of organic osmolytes in osmoregulation: from bacteria to mammals. J Exp Zool, v.265, n.4, Mar 15, p.346-55. 1993.
- Klein, J. D., P. B. Perry, *et al*. Regulation by cell volume of Na(+)-K(+)-2Cl- cotransport in vascular endothelial cells: role of protein phosphorylation. J Membr Biol, v.132, n.3, Mar, p.243-52. 1993.
- Klein, T., T. G. Cooper, *et al*. The Role of Potassium Chloride Cotransporters in Murine and Human Sperm Volume Regulation. Biol Reprod, Aug 30. 2006.
- Kuang, K., M. Yiming, *et al*. Lack of threshold for anisotonic cell volume regulation. J Membr Biol, v.211, n.1, May, p.27-33. 2006.
- Kwon, H. C. Molecular regulation of mammalian osmolyte transporters. In: K. Strange (Ed.). Cellular e Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. Florida: Boca Raton, 1994. Molecular regulation of mammalian osmolyte transporters., p.383-396
- Lambert, I. H. e E. K. Hoffmann. Regulation of taurine transport in Ehrlich ascites tumor cells. J Membr Biol, v.131, n.1, Jan, p.67-79. 1993.
- Lang, F., G. L. Busch, *et al*. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. Physiol Rev, v.78, n.1, Jan, p.247-306. 1998.
- _____. The diversity of volume regulatory mechanisms. Cell Physiol Biochem, v.8, n.1-2, p.1-45. 1998.
- Lang, F., A. Lepple-Wienhues, *et al*. Ion channels, cell volume, and apoptotic cell death. Cell Physiol Biochem, v.8, n.6, p.285-92. 1998.
- Lang, F., M. Ritter, *et al*. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. Cell Physiol Biochem, v.10, n.5-6, p.417-28. 2000.
- _____. The biological significance of cell volume. Ren Physiol Biochem, v.16, n.1-2, Jan-Apr, p.48-65. 1993.
- _____. Altered cell volume regulation in ras oncogene expressing NIH fibroblasts. Pflugers Arch, v.420, n.5-6, Apr, p.424-7. 1992.
- Lang, F., A. C. Uhlemann, *et al*. Cell volume regulatory mechanisms in apoptotic cell death. Herz, v.24, n.3, May, p.232-5. 1999.

- Lang, F. e S. Waldegger. Regulating cell volume. American Scientist, v.85, p.456-463. 1997.
- Lauf, P. K. K:Cl cotransport: emerging molecular aspects of a ouabain-resistant, volume-responsive transport system in red blood cells. Ren Physiol Biochem, v.11, n.3-5, May-Oct, p.248-59. 1988.
- Lauf, P. K., J. Bauer, *et al.* Erythrocyte K-Cl cotransport: properties and regulation. Am J Physiol, v.263, n.5 Pt 1, Nov, p.C917-32. 1992.
- Law, R. O. Amino acids as volume-regulatory osmolytes in mammalian cells. Comp Biochem Physiol A, v.99, n.3, p.263-77. 1991.
- Lechene, C. Cellular volume and cytoplasmic gel. Biol Cell, v.55, n.3, p.177-80. 1985.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, *et al.* Principles of Biochemistry. New York: Worth Publishers. 1993
- Leite, M. V. e L. Goldstein. Ca^{2+} -ionophore and phorbol ester stimulate taurine efflux from skate erythrocytes. J Exp Zool, v.242, p.95-97. 1987.
- Levinson, C. Regulatory volume increase in Ehrlich ascites tumor cells. Biochim Biophys Acta, v.1021, n.1, Jan 15, p.1-8. 1990.
- _____. Inability of Ehrlich ascites tumor cells to volume regulate following a hyperosmotic challenge. J Membr Biol, v.121, n.3, May, p.279-88. 1991.
- Lewis, S. A. e P. Donaldson. Ion channels and cell volume regulation: chaos in an organized system. News Physiol Sci, v.5, p.112-119. 1990.
- Linshaw, M. A. Effect of metabolic inhibitors on renal tubule cell volume. Am J Physiol, v.239, n.6, Dec, p.F571-7. 1980.
- Linshaw, M. A. e J. J. Grantham. Effect of collagenase and ouabain on renal cell volume in hypotonic media. Am J Physiol, v.238, n.6, Jun, p.F491-8. 1980.
- Liotta, L. A., R. Guirguis, *et al.* Biology of melanoma invasion and metastasis. Pigment Cell Res, v.1, n.1, p.5-15. 1987.
- Lohr, J. W. e J. J. Grantham. Isovolumetric regulation of isolated S2 proximal tubules in anisotonic media. J Clin Invest, v.78, n.5, Nov, p.1165-72. 1986.
- Lohr, J. W., L. P. Sullivan, *et al.* Volume regulation determinants in isolated proximal tubules in hypertonic medium. Am J Physiol, v.256, n.4 Pt 2, Apr, p.F622-31. 1989.
- Lytle, C. A volume-sensitive protein kinase regulates the Na-K-2Cl cotransporter in duck red blood cells. Am J Physiol, v.274, n.4 Pt 1, Apr, p.C1002-10. 1998.
- Macey, R. I. e R. E. Farmer. Inhibition of water and solute permeability in human red cells. Biochim Biophys Acta, v.211, n.1, Jul 7, p.104-6. 1970.
- Macey, R. I. e T. Moura. Water channels. Methods in enzymology. 1986. 598-609 p.
- Macfadem, S. R. M. Regulação de volume em células de melanoma murino, linhagem S-91: aumento regulatório de volume (RVI). Dissertação apresentada ao

Departamento de Fisiologia para obtenção do título de mestre, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002. 81 p: il p.

Macknight, A. D. Principles of cell volume regulation. Ren Physiol Biochem, v.11, n.3-5, May-Oct, p.114-41. 1988.

Macleod, J. e E. Ponder. The measurement of red cell volume: IV. Alterations in cell volume in hypotonic plasma. J Physiol, v.77, n.2, Jan 16, p.181-188. 1933.

Macri, P., S. Breton, *et al.* Hypertonicity decreases basolateral K⁺ and Cl⁻ conductances in rabbit proximal convoluted tubule. J Membr Biol, v.155, n.3, Feb 1, p.229-37. 1997.

Matsuki, M., S. Hashimoto, *et al.* Involvement of aquaporin-5 water channel in osmoregulation in parotid secretory granules. J Membr Biol, v.203, n.3, Feb, p.119-26. 2005.

Mccarty, N. A. e R. G. O'neil. Calcium signaling in cell volume regulation. Physiol Rev, v.72, n.4, Oct, p.1037-61. 1992.

Mcmanus, L. M. e K. B. Churchwell. Clinical significance of cellular osmoregulation. In: Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation, edited by K. Strange. Florida: Boca Raton. 1994. 63-77 p.

Meyer, M., K. Maly, *et al.* Stimulation of K⁺ transport systems by Ha-ras. J Biol Chem, v.266, n.13, May 5, p.8230-5. 1991.

Mongin, A. A., S. L. Aksentsev, *et al.* Swelling-induced activation of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransport in C6 glioma cells: kinetic properties and intracellular signalling mechanisms. Biochim Biophys Acta, v.1285, n.2, Dec 4, p.229-36. 1996.

Montero, M. C. e A. Ilundain. Effects of anisosmotic buffers on K⁺ transport in isolated chicken enterocytes. Biochim Biophys Acta, v.979, n.2, Feb 27, p.269-71. 1989.

Mountian, I. e W. Van Driessche. Isovolumetric regulation of C6 rat glioma cells in hyperosmotic media. Am J Physiol, v.272, n.1 Pt 1, Jan, p.C318-23. 1997.

Nakanishi, T. e M. B. Burg. Osmoregulatory fluxes of myo-inositol and betaine in renal cells. Am J Physiol, v.257, n.5 Pt 1, Nov, p.C964-70. 1989.

Nielsen, S., B. L. Smith, *et al.* CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. J Cell Biol, v.120, n.2, Jan, p.371-83. 1993.

Numata, T., T. Shimizu, *et al.* TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells. Am J Physiol Cell Physiol, Aug 30. 2006.

O'Neill, W. C. Physiological significance of volume-regulatory transporters. Am J Physiol, v.276, n.5 Pt 1, May, p.C995-C1011. 1999.

Okada, Y. e E. Maeno. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.130, n.3, Oct, p.377-83. 2001.

- Orlov, S. N. e P. Hamet. Intracellular monovalent ions as second messengers. J Membr Biol, v.210, n.3, Apr, p.161-72. 2006.
- Parker, J. C., G. C. Colclasure, *et al.* Coordinated regulation of shrinkage-induced Na/H exchange and swelling-induced [K-Cl] cotransport in dog red cells. Further evidence from activation kinetics and phosphatase inhibition. J Gen Physiol, v.98, n.5, Nov, p.869-80. 1991.
- Parvin, M. N., S. Kurabuchi, *et al.* Subcellular redistribution of AQP5 by vasoactive intestinal polypeptide in the Brunner's gland of the rat duodenum. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.288, n.6, Jun, p.G1283-91. 2005.
- Pasantes-Morales, H., R. A. Lezama, *et al.* Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. Am J Med, v.119, n.7 Suppl 1, Jul, p.S4-11. 2006.
- Perci-Lima, R. D. Regulação de volume em células de melanoma murino, linhagem S-91: participação de canais iônicos e do citoesqueleto. Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia para obtenção do título de mestre, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. 69 p p.
- _____. Participação do cálcio na regulação de volume em células de melanoma murino, linhagem S-91. Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia para obtenção do título de doutor, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. iii, 104 p: il p.
- Pergher, P. S. Regulação de volume em células de melanoma murino: correlação entre concentração osmótica, volume e proliferação celular. Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia para obtenção do título de mestre, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. 73 p: il p.
- Pine, M. B., W. W. Brooks, *et al.* Hydrostatic forces limit swelling of rat ventricular myocardium. Am J Physiol, v.241, n.5, Nov, p.H740-7. 1981.
- Prescott, D. M. Cells. Principles of molecular structure and function. Boston: Jones and Bartlett. 1988
- Ritter, M., M. Steidl, *et al.* Inhibition of ion conductances by osmotic shrinkage of Madin-Darby canine kidney cells. Am J Physiol, v.261, n.4 Pt 1, Oct, p.C602-7. 1991.
- Ritter, M. e E. Wöll. Modification of Cellular Ion Transport by the Há-ras Oncogene: Steps Towards Malignant Transformation. Cell Physiol Biochem, v.6, p.245-270. 1996.
- Rivas, T., E. Urcelay, *et al.* Role of amino acid-induced changes in ion fluxes in the regulation of hepatic protein synthesis. J Cell Physiol, v.163, n.2, May, p.277-84. 1995.
- Robbins, E., T. Pederson, *et al.* Comparison of mitotic phenomena and effects induced by hypertonic solutions in HeLa cells. J Cell Biol, v.44, n.2, Feb, p.400-16. 1970.
- Roy, G. e R. Sauve. Effect of anisotonic media on volume, ion and amino-acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. J Membr Biol, v.100, n.1, p.83-96. 1987.
- Saadoun, S., M. C. Papadopoulos, *et al.* Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. Nature, v.434, n.7034, Apr 7, p.786-92. 2005.

- Salathe, M. Regulation of Mammalian Ciliary Beating. Annu Rev Physiol, Aug 31. 2006.
- Sapirstein, V. S. e D. J. Benos. Activation of amiloride-sensitive sodium transport in C6 glioma cells. J Neurochem, v.43, n.4, Oct, p.1098-105. 1984.
- Saransaari, P. e S. S. Oja. Taurine release in mouse brain stem slices under cell-damaging conditions. Amino Acids, Sep 27. 2006.
- Sha'afi, R. I. e C. M. Gary-Bobo. Water and nonelectrolytes permeability in mammalian red cell membranes. Prog Biophys Mol Biol, v.26, p.103-46. 1973.
- Smith, B. L., R. Baumgarten, *et al.* Concurrent expression of erythroid and renal aquaporin CHIP and appearance of water channel activity in perinatal rats. J Clin Invest, v.92, n.4, Oct, p.2035-41. 1993.
- Smith, J. K., A. A. Siddiqui, *et al.* Interferon-alpha upregulates gene expression of aquaporin-5 in human parotid glands. J Interferon Cytokine Res, v.19, n.8, Aug, p.929-35. 1999.
- Souza, M. M., S. Gross, *et al.* Na⁺/K⁺-ATPase inhibition during cardiac myocyte swelling: involvement of intracellular pH and Ca²⁺. Mol Cell Biochem, v.210, n.1-2, Jul, p.173-83. 2000.
- Stoll, B., W. Gerok, *et al.* Liver cell volume and protein synthesis. Biochem J, v.287 (Pt 1), Oct 1, p.217-22. 1992.
- Strange, K. Cellular volume homeostasis. Adv Physiol Educ, v.28, n.1-4, Dec, p.155-9. 2004.
- Stroud, R. M., L. J. Miercke, *et al.* Glycerol facilitator GlpF and the associated aquaporin family of channels. Curr Opin Struct Biol, v.13, n.4, Aug, p.424-31. 2003.
- Sugiya, H. e M. Matsuki. AQPs and control of vesicle volume in secretory cells. J Membr Biol, v.210, n.2, Mar, p.155-9. 2006.
- Trachtman, H. Cell volume regulation: a review of cerebral adaptive mechanisms and implications for clinical treatment of osmolal disturbances. I. Pediatr Nephrol, v.5, n.6, Nov, p.743-50. 1991.
- Venosa, R. A. Hypo-osmotic stimulation of active Na⁺ transport in frog muscle: apparent upregulation of Na⁺ pumps. J Membr Biol, v.120, n.2, Mar, p.97-104. 1991.
- Volk, T., E. Fromter, *et al.* Hypertonicity activates nonselective cation channels in mouse cortical collecting duct cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.18, Aug 29, p.8478-82. 1995.
- Volkl, H., J. Geibel, *et al.* Effects of ouabain and temperature on cell membrane potentials in isolated perfused straight proximal tubules of the mouse kidney. Pflügers Arch, v.407, n.3, Sep, p.252-7. 1986.
- Wang, G. X., C. McCrudden, *et al.* Hypotonic activation of volume-sensitive outwardly rectifying chloride channels in cultured PSMCs is modulated by SGK. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.287, n.2, Aug, p.H533-44. 2004.

Wehner, F., H. Sauer, *et al.* Hypertonic stress increases the Na⁺ conductance of rat hepatocytes in primary culture. J Gen Physiol, v.105, n.4, Apr, p.507-35. 1995.

Wehner, F. e H. Tinel. Role of Na⁺ conductance, Na(+)-H⁺ exchange, and Na(+)-K(+)-2Cl⁻ symport in the regulatory volume increase of rat hepatocytes. J Physiol, v.506 (Pt 1), Jan 1, p.127-42. 1998.

Whalley, D. W., L. C. Hool, *et al.* Effect of osmotic swelling and shrinkage on Na(+)-K⁺ pump activity in mammalian cardiac myocytes. Am J Physiol, v.265, n.5 Pt 1, Nov, p.C1201-10. 1993.

Yancey, P. H. e M. B. Burg. Counteracting effects of urea and betaine in mammalian cells in culture. Am J Physiol, v.258, n.1 Pt 2, Jan, p.R198-204. 1990.

Yancey, P. H., M. E. Clark, *et al.* Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science, v.217, n.4566, Sep 24, p.1214-22. 1982.

Yasui, M., T. H. Kwon, *et al.* Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.10, May 11, p.5808-13. 1999.

Yasumura, Y., A. Tashjian Jr., *et al.* Establishment of four functional clonal strains of animal cells in culture. Science, v.154, p.1186-1189. 1966.

Yordy, M. R. e J. W. Bowen. Na,K-ATPase expression and cell volume during hypertonic stress in human renal cells. Kidney Int, v.43, n.4, Apr, p.940-8. 1993.

Zeuthen, T. Molecular mechanisms for passive and active transport of water. Int Rev Cytol, v.160, p.99-161. 1995.

Zeuthen, T. e W. D. Stein. Cotransport of salt and water in membrane proteins: membrane proteins as osmotic engines. J Membr Biol, v.137, n.3, Feb, p.179-95. 1994.

Capítulo 2.

EFEITO DA TEMPERATURA NAS RESPOSTAS ANISOSMÓTICAS DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO S91.

"O maior conforto humano é a luz do Sol, mas a maior alegria da mente é a compreensão matemática".

Leonardo da Vinci

Abstract

When cells are acutely exposed to anisosmotic media, they initially behave as osmometers, undergoing volume changes dictated by electrochemical gradient and membrane's permeability to water and osmolytes. In anisosmotic environments, many types of cells, after initial volume changes, may or may not undergo a slower volume-regulatory response. In this study, we describe the effects of temperature on the volume behavior of S91 murine melanoma cells under anisosmotic conditions. Morphometric measurements of changes in cell volume were performed using a video microscopy system and a PC software (Image Pro-Lite, Media Cybernetics). Acute anisosmotic shocks (either 190 mOsm.kgH₂O⁻¹ or 350 mOsm.kgH₂O⁻¹) at different temperatures (between 37 and 17 °C) resulted in maximum variations of volume of approximately 27%, followed by a regulatory response, returning cellular volume to baseline values, except at 17 °C. The returning time was temperature dependent in both hyperosmotic and hyposmotic shocks, increasing with the fall in temperature from, approximately, 20 min (37 and 32 °C) to 40-60 min (22 °C). By measuring the area-specific rate of water transfer through cellular membrane at different temperatures after acute anisosmotics shocks (approximately 0.149 $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ in hyposmotic conditions and 0.168 $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ in hyperosmotic conditions) an estimate of the activation energy could be obtained using Arrhenius' equations: (i) 3.42 kcal.mol⁻¹ in hyposmotic conditions, and (ii) 4.65 kcal.mol⁻¹ in hyperosmotic conditions. The results of the present study indicate that: (i) the time of volume regulation in S91 murine melanoma cells is dependent on temperature; and (ii) the osmotic water flow values are compatible with activation energy through aquaporins ($E < 6 \text{ kcal.mol}^{-1}$).

Resumo

Células submetidas a choques anisomóticos agudos sofrem rápidas alterações de volume (dependentes do gradiente osmótico e da permeabilidade da membrana à água e osmólitos) podendo ou não ser seguidas de lentas alterações regulatórias de volume. Neste estudo, descrevemos o efeito da temperatura nas respostas anisomóticas de células de melanoma murino S91. As medidas morfométricas das mudanças de volume foram realizadas usando um sistema de aquisição e análise de imagens (Image Pro-Lite, Media Cybernetics). As células foram expostas tanto a choques hiposmóticos agudos ($190 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$) como a choques hiperosmóticos agudos ($350 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$) em diferentes temperaturas (entre 37 e 17°C): resultando em variações máximas de volume de aproximadamente 27%, seguidas ou não (17°C) de uma regulação do volume à linha de base: em até 20 min (37 e 32°C); em até 40 min (27°C); em até 40 ou em até 60 min (22°C , choque hiperosmótico ou hiposmótico). A condutividade hidráulica da membrana nos primeiros minutos que se seguem aos choques anisomóticos agudos foi calculada para cada uma das temperaturas (aproximadamente $0,149 \mu\text{m}^3.\mu\text{m}^{-2}.\text{min}^{-1}.\text{atm}^{-1}$ em condições hiposmóticas e $0,168 \mu\text{m}^3.\mu\text{m}^{-2}.\text{min}^{-1}.\text{atm}^{-1}$ em condições hiperosmóticas) e seus valores utilizados no cálculo da Energia de Ativação (E_a) do transporte osmótico de água: (i) $3,42 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em condições hiposmóticas, e (ii) $4,65 \text{ kcal.mol}^{-1}$ em condições hiperosmóticas. Estes resultados sugerem que: (i) o tempo de regulação de volume em células de melanoma murino S91 é dependente da temperatura; e (ii) o fluxo osmótico de água apresenta valores de E_a compatíveis com aqueles propostos para o trânsito de água através de aquaporinas ($E_a < 6 \text{ kcal.mol}^{-1}$).

2.1 Introdução

Virtualmente todas as células são submetidas a transições osmóticas durante o seu período de vida, uma vez que tanto o metabolismo intracelular e transporte de membranas produzem flutuações nas concentrações dos solutos osmoticamente ativos (Strange, 2004). A regulação de volume celular é um fenômeno ubíquo e permite, às células, manter o seu volume normal.

A manutenção de volume requer que, em condições normais, influxo e efluxo de água sejam equivalentes, ou seja, fluxo resultante zero (Macknight, 1988). Se a Concentração Osmótica (CO) extracelular for abruptamente diminuída, as células incharão devido ao influxo de água através da membrana. Esse inchamento celular é revertido com a extrusão de íons e água levando à redução regulatória de volume (“regulatory volume decrease” - RVD). Por outro lado, caso a CO extracelular seja abruptamente aumentada, as células murcharão devido ao efluxo de água. Este murchamento celular, então, poderá ser revertido através do ganho de íons e água levando ao aumento regulatório de volume (“regulatory volume increase” - RVI) (Lang, Friedrich *et al.*, 1990). As variações de volume em células submetidas a choques anisomóticos são bastante rápidas, da ordem de segundos (Deaton e Pierce, 1994). Estudos recentes demonstram que a maquinaria envolvida na RVD em geral e os canais para íons em particular estão envolvidos não somente na regulação de volume, mas também na proliferação celular (Voets, Szucs *et al.*, 1995; Voets, Wei *et al.*, 1997; Rouzaire-Dubois e Dubois, 1998; Wondergem, Gong *et al.*, 2001) e apoptose (Maeno, Ishizaki *et al.*, 2000; Okada e Maeno, 2001; Okada, Maeno *et al.*, 2001). Durante o inchamento e o murchamento celular, pode-se antecipar um transporte massivo de água através da membrana plasmática. Estudos recentes demonstram que a permeabilidade basal para a água da matriz lipídica não é suficiente para regulações efetivas de volume, e a expressão de canais especializados para a água é requerida para uma efetiva regulação de volume em células epiteliais (Morishima, Kida *et al.*, 2001).

2.2 Objetivo

O objetivo, no presente capítulo, foi estudar o efeito da temperatura na regulação de volume e na condutividade hidráulica da membrana durante a fase de inchamento e murchamento inicial que se segue à exposição a choques anisomóticos agudos em células de melanoma murino S91.

2.3 Propriedades osmóticas usadas para testar a presença de canais para água

Há várias propriedades osmóticas que caracterizam o movimento de água através de membranas celulares e que podem ser utilizadas como ferramentas para testar a presença de canais para água (Elmoazzen, Elliott *et al.*, 2002). A primeira propriedade é a permeabilidade osmótica da água, P_f ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). P_f se relaciona com o fluxo volumétrico resultante através da membrana em resposta a uma força motriz hidrostática ou osmótica. P_f pode ser obtida a partir de um gradiente osmótico no qual a mudança de volume em relação ao tempo é dada da seguinte forma:

$$\Delta V_w / \Delta t = P_f \cdot A \cdot v_w \Delta C, \quad (1)$$

Sendo ΔV_w a variação no volume de água no compartimento (m^3), Δt o intervalo de tempo (s), v_w é o volume molar parcial da água ($\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$), A é a superfície aparente da célula (m^2), e ΔC é o gradiente de concentração ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$) entre os meios interno e externo.

A permeabilidade osmótica da água pode ser diretamente relacionada com a condutividade hidráulica da membrana, L_p ($\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{t}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$), da seguinte maneira (Price e Thompson, 1969):

$$P_f = RT L_p / v_w, \quad (2)$$

na qual R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta. Pela combinação das equações (1) e (2), a razão da mudança de volume celular em

função do tempo pode ser escrita de acordo com o modelo de transporte de massa (Jacobs e Stewart, 1932):

$$\Delta V_w / \Delta t = L_p \cdot A \cdot R \cdot T \Delta C \quad (3)$$

A permeabilidade osmótica da água (ou a condutividade hidráulica diretamente relacionada) tem sido calculada para um grande número de membranas celulares de diferentes composições. $P_f > 0,01 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ para uma membrana simples tem sido considerada como sugestiva da presença de canais para água (Verkman, Van Hoek *et al.*, 1996).

Um outro parâmetro que tem sido usado para indicar a presença ou ausência de canais para água é a energia de ativação de Arrhenius para o transporte de água (Verkman, Van Hoek *et al.*, 1996). A equação de Arrhenius para a condutividade hidráulica da membrana, L_p é dada pela seguinte equação:

$$L_p = C \exp (- E_a / RT) \quad (4)$$

na qual C é uma constante e E_a é a energia de ativação.

2.4 Material e Métodos

Os protocolos para a cultura e preparação das células, sistema de perfusão, aquisição e análise das imagens e a análise estatística foram descritas, em detalhes, previamente no capítulo 1 (ver item 1.5).

Todas as soluções (isosmóticas, hiposmóticas e hiperosmóticas) tiveram seu pH ajustado para 7,4 nas diferentes temperaturas experimentais.

2.4 Resultados

2.4.1 Efeito da temperatura em células S91 submetidas a condições isosmóticas

Mesmo em meios isosmóticos, as células estão sujeitas a alterações no volume pelo influxo de água. Isto decorre do efeito Donnan causado pela presença de moléculas não permeáveis pela membrana carregadas negativamente dentro das células, tais como as proteínas e ácidos nucleicos. Neste trabalho, perfundimos o banho das células S91 com soluções isosmóticas em diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37 °C) e não verificamos alterações significativas no volume celular ao longo de todo experimento (Figuras 2.1 a 2.10).

2.4.2 Efeito da temperatura em células S91 submetidas a choques hiposmóticos agudos

As alterações morfométricas de células de melanoma murino S91 plaqueadas em solução isosmótica em resposta ao choque hiposmótico agudo, expressas em termos de volume celular, estão resumidas na Tabela 2.1.

As células, quando expostas a choque hiposmótico agudo a 37 °C, apresentaram, como esperado, um aumento no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $0,0843 \pm 0,0158 \text{ \%} \cdot \text{min}^{-1}$ (Tabela 2.3). Tal aumento teve um máximo, em média, de $26,6 \pm 2,9\%$ no terceiro minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a esse aumento de volume, seguiu-se a redução regulatória de volume (RVD), com retorno à linha de base em até 20 min (Figura 2.1 e Tabela 2.1) e uma constante de decaimento de $-0,0683 \pm 0,0052 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 2.4). Diferenças significativas foram verificadas entre o grupo experimental e o grupo controle (Figura 2.1 e Tabela 2.1).

As células, quando expostas a um choque hiposmótico agudo a 32 °C apresentaram, como esperado, um aumento no volume celular, com uma taxa

de variação linear de volume de $0,0928 \pm 0,0089 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 2.3). Tal aumento teve um máximo, em média, de $21,9 \pm 2,3\%$ no terceiro minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a esse aumento de volume, seguiu-se a RVD, com retorno à linha de base em até 20 min (Figura 2.2 e Tabela 2.1) e uma constante de decaimento de $-0,0449 \pm 0,0023 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 2.4). Diferenças significativas foram verificadas entre o grupo experimental e o grupo controle (Figura 2.2 e Tabela 2.1).

A exposição das células a um choque hiposmótico agudo a 27°C apresentou, como esperado, um aumento no volume celular com uma taxa de variação linear de volume de $0,0737 \pm 0,0062 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 2.3). Tal aumento teve um máximo, em média, de $31,1 \pm 2,7\%$ no quarto minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a esse aumento de volume, seguiu-se a RVD, com retorno à linha de base em até 40 min (Figura 2.3 e Tabela 2.1) e uma constante de decaimento de $-0,0273 \pm 0,0024 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 2.4). Diferenças significativas foram verificadas entre o grupo experimental e o grupo controle (Figura 2.3 e Tabela 2.1).

A exposição das células a um choque hiposmótico agudo a 22°C apresentou, como esperado, um aumento no volume celular com uma taxa de variação linear de volume de $0,0670 \pm 0,0078 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 2.3). Tal aumento teve um máximo, em média, de $25 \pm 1,9\%$ no quarto minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a esse aumento de volume, seguiu-se a RVD, com retorno à linha de base em até 60 min (Figura 2.4 e Tabela 2.1) e uma constante de decaimento de $-0,0097 \pm 0,0013 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 2.4). Diferenças significativas foram verificadas entre o grupo experimental e o grupo controle (Figura 2.4 e Tabela 2.1).

As células, quando expostas a um choque hiposmótico agudo a 17°C apresentaram, como esperado, um aumento no volume celular com uma taxa de variação linear de volume de $0,0621 \pm 0,0043 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 2.3). Tal aumento teve um máximo, em média, de $17,2 \pm 2,2\%$ no quarto minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial e até o término do experimento não houve RVD (Figura 2.5 e Tabela 2.1) com uma constante de decaimento de $-0,0036 \pm 0,0016 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 2.4). Diferenças significativas

foram verificadas entre o grupo experimental e o grupo controle (Figura 2.5 e Tabela 2.1).

As comparações entre as taxa de variação linear de volume e das variações máximas de volume não foram significativas (Tabela 2.3). As constantes de decaimento foram comparadas de forma decrescente, ou seja, 37 e 32 °C; 32 e 27 °C; 27 e 22 °C; 22 e 17 °C, sendo todas diferentes significativamente (Tabela 2.4).

2.4.3 Efeito da temperatura em células S91 submetidas a choques hiperosmóticos agudos

As alterações morfométricas de células de melanoma murino S91 plaqueadas em solução isosmótica em resposta ao choque hiperosmótico agudo, expressas em termos de volume celular, estão resumidas na Tabela 2.2.

As células expostas a choque hiperosmótico agudo a 37 °C apresentaram, como esperado, uma redução no volume celular com uma taxa de variação linear de volume de $-0,0971 \pm 0,0194 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 2.5). Tal redução teve uma máxima, em média, de $27,3 \pm 1,3\%$ no terceiro minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a essa redução de volume, seguiu-se o aumento regulatório de volume (RVI), com retorno à linha de base em até 20 min (Figura 2.6 e Tabela 2.2) e uma constante de decaimento de $-0,0745 \pm 0,0086 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 2.6). Diferenças significativas foram verificadas entre o grupo experimental e o grupo controle (Figura 2.6 e Tabela 2.2).

As células, quando expostas a um choque hiperosmótico agudo a 32 °C apresentaram, como esperado, uma redução no volume celular com uma taxa de variação linear de volume de $-0,0870 \pm 0,0203 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 2.5). Tal redução teve uma máxima, em média, de $24,3 \pm 1,6\%$ no terceiro minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a essa redução de volume, seguiu-se o RVI, com retorno à linha de base em até 20 min (Figura 2.7 e Tabela 2.2) e uma constante de decaimento de $-0,0623 \pm$

0,0031 min⁻¹ (Tabela 2.6). Diferenças significativas foram verificadas entre o grupo experimental e o grupo controle (Figura 2.7 e Tabela 2.2).

A exposição das células a um choque hiperosmótico agudo a 27 °C apresentou, como esperado, uma redução no volume celular com uma taxa de variação linear de volume de $-0,0608 \pm 0,0139 \text{ \%.min}^{-1}$ (Tabela 2.5). Tal redução teve uma máxima, em média, de $24,1 \pm 1,3\%$ no quarto minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a essa redução de volume, seguiu-se o RVI, com retorno à linha de base em até 40 min (Figura 2.8 e Tabela 2.2) e uma constante de decaimento de $-0,0587 \pm 0,0061 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 2.6). Diferenças significativas foram verificadas entre o grupo experimental e o grupo controle (Figura 2.8 e Tabela 2.2).

As células, quando expostas a um choque hiperosmótico agudo a 22 °C apresentaram, como esperado, uma redução no volume celular com uma taxa de variação linear de volume de $-0,0505 \pm 0,0111 \text{ \%.min}^{-1}$ (Tabela 2.5). Tal redução teve uma máxima, em média, de $20,9 \pm 1,4\%$ no quarto minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a essa redução de volume, seguiu-se o RVI, com retorno à linha de base em até 40 min (Figura 2.9 e Tabela 2.2) e uma constante de decaimento de $-0,0406 \pm 0,0062 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 2.6). Diferenças significativas foram verificadas entre o grupo experimental e o grupo controle (Figura 2.9 e Tabela 2.2).

As células expostas a um choque hiperosmótico agudo a 17 °C apresentaram, como esperado, uma redução no volume celular com uma taxa de variação linear de volume de $-0,0620 \pm 0,0165 \text{ \%.min}^{-1}$ (Tabela 2.5). Tal redução teve uma máxima, em média, de $21,7 \pm 1,4\%$ no quarto minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial e até o término do experimento não houve RVI (Figura 2.10 e Tabela 2.2) com uma constante de decaimento de $-0,0037 \pm 0,0008 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 2.6). Diferenças significativas foram verificadas entre o grupo experimental e o grupo controle (Figura 2.10 e Tabela 2.2).

As comparações entre as taxa de variação linear de volume e das variações máximas de volume não foram significativas (Tabela 2.5). As constantes de decaimento foram comparadas de forma decrescente, ou seja, 37 e 32 °C; 32 e 27 °C; 27 e 22 °C; 22 e 17 °C, sendo diferentes

significativamente, com exceção de entre 32 e 27 °C (Tabela 2.6). Além disso, foram comparadas as constantes de decaimento, para a mesma temperatura, entre os choques hiposmóticos e hiperosmóticos, sendo as diferenças significativas nas temperaturas de 32, 27 e 22 °C e não significativas nas temperaturas de 37 e 17 °C (Tabelas 2.4 e 2.6).

2.4.4 Condutividade hidráulica da membrana em células de melanoma murino S91 submetidas a condições anisomóticas

As condutividades hidráulicas da membrana foram calculadas para cada temperatura nas condições de choques anisomóticos, como podemos observar nas Tabelas 2.7 e 2.8.

Os cálculos das condutividades hidráulicas em diferentes temperaturas possibilitaram os cálculos das Energias de Ativação (E_a), através da Relação de Arrhenius do transporte osmótico de água na fase de inchamento e murchamento iniciais que foram, respectivamente 3,42 kcal.mol⁻¹ (Tabela 2.7) e 4,65 kcal.mol⁻¹ (Tabela 2.8).

37°C

Figura 2.1. Alterações de volume em células de melanoma murino S91 plaqueados em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹, pH 7,4 a 37 °C após perfusão com soluções: i) 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ (círculos abertos) 37 °C e ii) 190 mOsm.kgH₂O⁻¹ a 37 °C (triângulos cheios). Alterações expressas em valores relativos de volume (média ± e.p.m., n=120).

32°C

Figura 2.2. Alterações de volume em células de melanoma murino S91 plaqueados em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹, pH 7,4 a 37 °C após perfusão com soluções: i) 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ (círculos abertos) 32 °C e ii) 190 mOsm.kgH₂O⁻¹ a 32 °C (triângulos cheios). Alterações expressas em valores relativos de volume (média ± e.p.m., n=120).

27°C

Figura 2.3. Alterações de volume em células de melanoma murino S91 plaqueados em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹, pH 7,4 a 37 °C após perfusão com soluções: i) 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ (círculos abertos) 27 °C e ii) 190 mOsm.kgH₂O⁻¹ a 27 °C (triângulos cheios). Alterações expressas em valores relativos de volume (média ± e.p.m., n=120).

Figura 2.4. Alterações de volume em células de melanoma murino S91 plaqueados em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹, pH 7,4 a 37 °C após perfusão com soluções: i) 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ (círculos abertos) 22 °C e ii) 190 mOsm.kgH₂O⁻¹ a 22 °C (triângulos cheios). Alterações expressas em valores relativos de volume (média ± e.p.m., n=120).

Figura 2.5. Alterações de volume em células de melanoma murino S91 plaqueados em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹, pH 7,4 a 37 °C após perfusão com soluções: i) 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ (círculos abertos) 17 °C e ii) 190 mOsm.kgH₂O⁻¹ a 17 °C (triângulos cheios). Alterações expressas em valores relativos de volume (média ± e.p.m., n=120).

Figura 2.6. Alterações de volume em células de melanoma murino S91 plaqueados em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹, pH 7,4 a 37 °C após perfusão com soluções: i) 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ (círculos abertos) 37 °C e ii) 350 mOsm.kgH₂O⁻¹ a 37 °C (triângulos cheios). Alterações expressas em valores relativos de volume (média ± e.p.m., n=120).

Figura 2.7. Alterações de volume em células de melanoma murino S91 plaqueados em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹, pH 7,4 a 37 °C após perfusão com soluções: i) 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ (círculos abertos) 32 °C e ii) 350 mOsm.kgH₂O⁻¹ a 32 °C (triângulos cheios). Alterações expressas em valores relativos de volume (média ± e.p.m., n=120).

Figura 2.8. Alterações de volume em células de melanoma murino S91 plaqueados em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹, pH 7,4 a 37 °C após perfusão com soluções: i) 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ (círculos abertos) 27 °C e ii) 350 mOsm.kgH₂O⁻¹ a 27 °C (triângulos cheios). Alterações expressas em valores relativos de volume (média ± e.p.m., n=120).

Figura 2.9. Alterações de volume em células de melanoma murino S91 plaqueados em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹, pH 7,4 a 37 °C após perfusão com soluções: i) 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ (círculos abertos) 22 °C e ii) 350 mOsm.kgH₂O⁻¹ a 22 °C (triângulos cheios). Alterações expressas em valores relativos de volume (média ± e.p.m., n=120).

Figura 2.10. Alterações de volume em células de melanoma murino S91 plaqueados em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹, pH 7,4 a 37 °C após perfusão com soluções: i) 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ (círculos abertos) 17 °C e ii) 350 mOsm.kgH₂O⁻¹ a 17 °C (triângulos cheios). Alterações expressas em valores relativos de volume (média $\pm$ e.p.m., n=120).

Tabela 2.1. Principais respostas osmóticas em células de melanoma murino S-91 incubadas em solução de 290 mOsm.kg H₂O⁻¹ após perfusão com solução de 190 mOsm.kg H₂O⁻¹ em diferentes temperaturas. As variações de volume estão expressas como média $\pm$ erro padrão da média de três grupos experimentais com um n de 120 células. V_0 corresponde ao volume inicial; V_{xtr} é o volume máximo; V_f é o volume final; $t_{V_{xtr}}$ é o tempo em que as células alcançaram o extremo de volume; t_{RVD} é o tempo de RVD; V_x X V_0 corresponde ao intervalo de tempo quando $p < 0,05$ em relação ao volume celular no tempo 0 min; V_x X Iso corresponde ao intervalo de tempo quando $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (isosmótico).

Temperatura (°C)	V_0 (μm^3)	V_{xtr} (μm^3)	V_f (μm^3)	$t_{V_{xtr}}$ (min)	t_{RVD} (min)	V_x X V_0 (min)	V_x X Iso (min)
37	18313 $\pm$ 378	23192 $\pm$ 624	18314 $\pm$ 378	3	20	2-10	1-10
32	18313 $\pm$ 473	23267 $\pm$ 721	18393 $\pm$ 452	3	20	2-10	1-30
27	18313 $\pm$ 318	24006 $\pm$ 581	18539 $\pm$ 383	4	40	2-30	1-50
22	18313 $\pm$ 452	22898 $\pm$ 407	20120 $\pm$ 391	4	60	3-50	2-60
17	18313 $\pm$ 317	22771 $\pm$ 412	21128 $\pm$ 389	4	-	2-60	1-60

Tabela 2.2. Principais respostas osmóticas em células de melanoma murino S-91 incubadas em solução de 290 mOsm.kg H₂O⁻¹ após perfusão com solução de 350 mOsm.kg H₂O⁻¹ em diferentes temperaturas. As variações de volume estão expressas como média ± erro padrão da média de três grupos experimentais com um *n* de 120 células. *V*₀ corresponde ao volume inicial; *V*_{xtr} é o volume mínimo; *V*_f é o volume final; *t*_{xtr} é o tempo em que as células alcançaram o extremo de volume; *t*_{RVI} é o tempo de RVI; *V*_x X *V*₀ corresponde ao intervalo de tempo quando *p* < 0,05 em relação ao volume celular no tempo 0 min; *V*_x X Iso corresponde ao intervalo de tempo quando *p* < 0,05 em relação ao grupo controle (isosmótico).

Temperatura (°C)	<i>V</i> ₀ (μm ³)	<i>V</i> _{xtr} (μm ³)	<i>V</i> _f (μm ³)	<i>t</i> _{xtr} (min)	<i>t</i> _{RVI} (min)	<i>V</i> _x X <i>V</i> ₀ (min)	<i>V</i> _x X Iso (min)
37	18313 ± 331	13312 ± 198	18229 ± 307	3	20	2-10	2-10
32	18313 ± 360	13870 ± 183	18238 ± 350	3	20	2-10	2-20
27	18313 ± 341	13896 ± 204	18174 ± 334	4	40	3-30	3-30
22	18313 ± 394	14487 ± 221	18229 ± 392	4	40	3-30	3-40
17	18313 ± 332	14343 ± 211	15677 ± 204	4	-	2-50	4-60

Tabela 2.3. Taxa de variação linear de volume para células de melanoma murino S91 submetidas às condições hiposmóticas agudas em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Taxa de variação linear de volume $\pm$ desvio padrão (%.min ⁻¹)
37	0,0843 $\pm$ 0,0158
32	0,0928 $\pm$ 0,0089
27	0,0737 $\pm$ 0,0062
22	0,0670 $\pm$ 0,0078
17	0,0621 $\pm$ 0,0043

Tabela 2.4. Constante de decaimento (k) para células de melanoma murino S91 submetidas às condições hiposmóticas agudas em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Constante de decaimento (k) $\pm$ desvio padrão (min ⁻¹)
37	-0,0683 $\pm$ 0,0052
32	-0,0449 $\pm$ 0,0023
27	-0,0273 $\pm$ 0,0024
22	-0,0097 $\pm$ 0,0013
17	-0,0036 $\pm$ 0,0016

Tabela 2.5. Taxa de variação linear de volume para células de melanoma murino S91 submetidas às condições hiperosmóticas agudas em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Taxa de variação linear de volume $\pm$ desvio padrão (%.min ⁻¹)
37	-0,0971 $\pm$ 0,0194
32	-0,0870 $\pm$ 0,0203
27	-0,0608 $\pm$ 0,0139
22	-0,0505 $\pm$ 0,0111
17	-0,0620 $\pm$ 0,0165

Tabela 2.6. Constante de decaimento (k) para células de melanoma murino S91 submetidas às condições hiperosmóticas agudas em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Constante de decaimento (k) $\pm$ desvio padrão (min ⁻¹)
37	-0,0745 $\pm$ 0,0086
32	-0,0623 $\pm$ 0,0031
27	-0,0587 $\pm$ 0,0061
22	-0,0406 $\pm$ 0,0062
17	-0,0037 $\pm$ 0,0008

Tabela 2.7. Condutividade hidráulica e a Energia de Ativação para células de melanoma murino linhagem S-91 submetidas às condições hiposmóticas agudas.

Temperatura (°C)	Condutividade hidráulica da membrana, L_p ($\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$)
17	0,1393
22	0,1409
27	0,1720
32	0,1963
37	0,1902
Energia de Ativação, $E_a = 3,42 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	

Tabela 2.8. Condutividade hidráulica e a Energia de Ativação para células de melanoma murino linhagem S-91 submetidas às condições hiperosmóticas agudas.

Temperatura (°C)	Condutividade hidráulica da membrana, L_p ($\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$)
17	0,1241
22	0,1176
27	0,1335
32	0,1761
37	0,1950
Energia de Ativação, $E_a = 4,65 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	

2.5 Discussão

Neste capítulo, observamos o efeito da temperatura na regulação de volume e na condutividade hidráulica da membrana durante a fase de inchamento e murchamento inicial que se segue à exposição a choques anisomóticos agudos em células de melanoma murino S91.

Desde os anos 1930, uma grande quantidade de artigos foi publicada sobre os mecanismos do transporte de água através de membranas celulares e a influência da temperatura no transporte de água através de membranas celulares e tecidos (Jacobs e Stewart, 1932; Lucké e Mccutcheon, 1932; Nevis, 1958; Hempling, 1961; Hays, 1962; Farmer e Macey, 1970; Vieira, Sha'afi *et al.*, 1970; Sha'afi, 1977). Apesar disso, há poucos trabalhos (Kanli e Norderhus, 1998; Neufeld e Leader, 1998; Souza e Boyle, 2001) onde se observa alguma influência da temperatura na regulação de volume.

Quando células são banhadas por um meio isosmótico, elas mantêm certo volume pelo balanço nas razões de entrada e saída de solutos (Leaf, 1959; Tosteson e Hoffman, 1960). A pressão osmótica intracelular gerada pela presença de macromoléculas carregadas eletricamente (ânions orgânicos impermeáveis) no interior da célula é compensada pelo efluxo de osmólitos (pequenas moléculas osmoticamente ativas, predominantemente Na^+ e Cl^-). Isto leva à manutenção do volume celular de acordo com o assim chamado equilíbrio de Donnan (Macknight e Leaf, 1977; Lang, Busch *et al.*, 1998), mantendo o volume celular sem requerer a presença de um significativo gradiente de pressão hidrostática. Um papel central neste processo tem sido atribuído a Na^+/K^+ -ATPase (Leaf, 1959; Macknight e Leaf, 1977). Por outro lado, a membrana da célula é altamente permeável ao K^+ . A saída de K^+ cria um potencial de membrana positivo na face externa da membrana, o qual movimenta o Cl^- para fora da célula. A baixa concentração intracelular de Cl^- compensa a concentração excessiva de substâncias orgânicas. Células de melanoma murino S91 quando submetidas a meios isosmóticos acrescidos de 1 mM de ouabaína, um bloqueador da Na^+/K^+ -ATPase, sofreram um significativo aumento do volume celular; porém, não ocorria este aumento em doses menores, sugerindo que o bloqueio desta via esteja relacionado com a

dose (Fernandes, 2002). Ao submetermos as células de melanoma murino S91 a soluções isosmóticas em diferentes temperaturas (de 37 a 17 °C) não houve diferenças significativas de volume (Figuras 2.1 a 2.10). Assim, parece-nos razoável sugerir que este mecanismo, i.e., $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, evita uma mudança significativa de volume quando estas células estão em meio isosmótico em diferentes temperaturas. Estudos em cardiomiócitos do embrião de pintinho (Knerr e Lieberman, 1993) sob condições isosmóticas em baixas temperaturas (10 °C) revelaram uma dissipação do gradiente de Na^+ em um baixo nível de atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, com o funcionamento mínimo do permutador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Nestas condições as células murcharam, como uma consequência da inibição direta do cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$. Outros autores (Souza e Boyle, 2001) estudando estas mesmas células, a 26 e 37 °C, em condições isosmóticas, não observaram mudanças significativas de volume. O volume celular de túbulos proximais renal de truta (*Salmo trutta*) submetidos a diferentes temperaturas (10, 15 e 25 °C) em soluções isosmóticas permaneceu relativamente constante. Segundo os autores, esta falta de mudanças é devido a ausência de uma diferença entre a concentração osmótica intra e extracelular (Kanli e Norderhus, 1998). Em células de ducto colector cortical de ratos, o fluído secretório ocorre na ausência de qualquer gradiente químico ou osmótico e mesmo contra uma diferença de pressão hidrostática. Porém, o fluído secretório foi fortemente dependente da temperatura, quando estas células foram banhadas com solução isosmótica a 27 °C, inibindo a permeabilidade da membrana à íons (K^+ e Cl^-) e à água (Capurro, Rivarola *et al.*, 2001).

Como a grande maioria das células submetidas a choques hiposmóticos agudos, células de melanoma murino S91 sofrem um rápido inchamento (máximo entre 3 e 4 min) seguido de uma fase de redução regulatória de volume: 20 min a 37 e 32 °C (Figuras 2.1 e 2.2, respectivamente); 40 min a 27 °C (Figura 2.3); 60 min a 22 °C (Figuras 2.4); e ausência de regulação a 17 °C (Figura 2.5) como resultado do efluxo de solutos intracelulares e do efluxo acoplado de água. Por outro lado, estas células submetidas a choques hiperosmóticos agudos, sofrem uma rápida redução de volume (máximo entre 3 e 4 min) seguido de uma fase de aumento regulatório de volume: 20 min a 37 e 32 °C (Figuras 2.6 e 2.7, respectivamente); 40 min a 27 e 22 °C (Figuras 2.8

e 2.9, respectivamente); e ausência de regulação a 17 °C (Figura 2.10) como resultado do influxo de solutos intracelulares e do influxo acoplado de água.

Para a análise dos dados, dividimos a curva cinética em duas fases. A primeira compreende desde o tempo inicial (0 min) até o volume extremo; a segunda, do volume extremo até o final do experimento.

Assim, na primeira fase da curva cinética, os volumes extremos (Tabelas 2.1 e 2.2) e a taxa de variação linear de volume em células S91 (Tabelas 2.3 e 2.5), apesar de apresentarem mudanças, estas não foram significativas quando submetidas aos choques anisomóticos em diferentes temperaturas, apesar de haver uma diferença nos tempos para que as células atingissem os volumes extremos (3 min para 37 e 32 °C e 4 min para 27, 22 e 17 °C). Resultados semelhantes foram observados submetendo células de melanoma murino S91 a choques anisomóticos na presença de bloqueadores para canais iônicos e/ou transportadores (Perci-Lima, 2000; Fernandes, 2002; Macfadem, 2002). Entretanto, em túbulos proximais renais de truta (Kanli e Norderhus, 1998), houve um retardo para atingir o volume extremo, mas com taxa semelhante, quando estes tecidos foram expostos a choques hiposmóticos a 10 °C. Como consequência, este aumento de volume foi maior quando comparado ao mesmo choque a 15 e 25 °C. Resultado semelhante foi observado em cardiomiócitos de embrião de pintinho (Souza e Boyle, 2001) submetidos a choques hiposmóticos a 26 e 37 °C.

Na segunda fase, uma diminuição da temperatura resultou num retardo para que as células retornem aos valores próximos aos iniciais (Tabelas 2.1 e 2.2), fato este evidenciado por diferentes constantes de decaimento (Tabelas 2.4 e 2.6), as quais também diminuíram progressivamente. Nossos resultados mostram que a 17 °C as células S91 expostas tanto a choques hiposmóticos (Figura 2.5) quanto aos choques hiperosmóticos (Figura 2.10) não foram capazes de regulação de volume, apresentando uma constante de decaimento muito abaixo em relação aos outros choques osmóticos. Em cardiomiócitos de embrião de pintinho (Souza e Boyle, 2001), em túbulos proximais de truta (Kanli e Norderhus, 1998) e em túbulos de Malphigi de insetos montanhosos da Nova Zelândia (Neufeld e Leader, 1998) também não houve regulação de volume quando expostas às baixas temperaturas. Tecidos de mamíferos expostos a baixas temperaturas mostram alterações em seu conteúdo

intracelular (Sudo e Morel, 1984; Knerr e Lieberman, 1993) e na fluidez da membrana plasmática (Charnock, Doty *et al.*, 1971; Esmann e Skou, 1988). Para homeotermos, a hipotermia pode atenuar reações enzimáticas levando ao impareamento da integridade celular. Considerando as diferenças na dependência da temperatura para os componentes do transporte passivo e ativo do sistema de bomba-vazamento das células, que mantém uma concentração iônica intracelular estável, uma mudança na temperatura representa uma mudança significativa na função celular (Souza e Boyle, 2001). A partir do momento em que as células estão próximas à sua temperatura ótima, ou seja, 37 °C para as células S91, as respostas são mais rápidas pelo fato das células estarem com sua estrutura e função inalteradas.

Diferentes propriedades osmóticas, como a L_p e a E_a , caracterizam o movimento de água através de membranas celulares e podem ser utilizadas como ferramenta para testar a presença de canais para água (Elmoazzen, Elliott *et al.*, 2002). A L_p foi calculada para células de melanoma murino S91 na fase de inchamento inicial em resposta ao choque hiposmótico agudo, com valores entre 0,1902 e 0,1324 $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$, para uma variação de temperatura entre 37 e 17 °C, e uma E_a de 3,42 $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Tabela 2.7). Da mesma forma, a L_p foi calculada para células de melanoma murino S-91 na fase de murchamento inicial em resposta ao choque hiperosmótico agudo, com valores entre 0,1950 e 0,1241 $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$, para uma variação de temperatura entre 37 e 17 °C, e uma E_a de 4,65 $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Tabela 2.8).

A P_f (ou L_p diretamente relacionada) tem sido calculada para um grande número de membranas celulares com diferentes composições, sendo que uma $P_f > 0,01 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ (uma $L_p > 4,46 \text{ m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ a 22 °C) para uma membrana simples tem sido considerada como sugestiva da presença de canais para água (Verkman, Van Hoek *et al.*, 1996). Apesar disso, experimentos com células da medula óssea humana, sugerem que esse valor de corte de P_f pode não ser um indicador preciso da presença de canais para água (Elmoazzen, Elliott *et al.*, 2002).

Baseado em limitados dados empíricos, foi observado que o transporte de água por solubilidade-difusão em uma bicamada lipídica é caracterizado por

uma elevada energia de ativação ($E_a > 10 \text{ kcal.mol}^{-1}$) (Fettiplace e Haydon, 1980; Finkelstein, 1980) enquanto o transporte mediado de água parece ser caracterizado por uma baixa energia de ativação ($E_a < 6 \text{ kcal. mol}^{-1}$) (Verkman, Van Hoek *et al.*, 1996), apesar de não haver razões *a priori* para a E_a ser baixa para o movimento de água através de poros aquosos (Verkman, Van Hoek *et al.*, 1996).

Os resultados apresentados neste trabalho indicam uma clara dependência do tempo de RVD e de RVI em relação à temperatura em células de melanoma murino S-91. Além disso, tanto a E_a como o critério de se utilizar uma $P_f > 0,01 \text{ cm.s}^{-1}$ para indicar a presença de canais para água indicam que as células de melanoma murino S91 apresentam tais proteínas transportadoras de água (aquaporinas).

2.6 Referências Bibliográficas

Capurro, C., V. Rivarola, *et al.* Vasopressin regulates water flow in a rat cortical collecting duct cell line not containing known aquaporins. J Membr Biol, v.179, n.1, Jan 1, p.63-70. 2001.

Charnock, J. S., D. M. Doty, *et al.* The effect of temperature on the activity of (Naplus plus K plus)-ATPase. Arch Biochem Biophys, v.142, n.2, Feb, p.633-7. 1971.

Deaton, L. E. e S. K. Pierce. Introduction: cellular volume regulation--mechanisms and control. J Exp Zool, v.268, n.2, Feb 1, p.77-9. 1994.

Elmoazzen, H. Y., J. A. Elliott, *et al.* The effect of temperature on membrane hydraulic conductivity. Cryobiology, v.45, n.1, Aug, p.68-79. 2002.

Esmann, M. e J. C. Skou. Temperature-dependencies of various catalytic activities of membrane-bound Na⁺/K⁺-ATPase from ox brain, ox kidney and shark rectal gland and of C12E8-solubilized shark Na⁺/K⁺-ATPase. Biochim Biophys Acta, v.944, n.3, Oct 20, p.344-50. 1988.

Farmer, R. E. L. e R. I. Macey. Perturbation of red blood cell volume: rectification of osmotic flow. Biochim Biophys Acta, v.196, p.53-65. 1970.

Fernandes, C. I. Redução regulatória de volume (RVD) em células de melanoma murino - linhagem S-91: participação do contrtransporte KCl, do trocador Cl⁻/HCO₃⁻ e Na⁺- K⁺- ATPase. Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia para obtenção do título de mestre, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002. 55 p.: il p.

Fettiplace, R. e D. A. Haydon. Water permeability of lipid membranes. Physiol Rev, v.60, n.2, Apr, p.510-50. 1980.

Finkelstein, A. Water movement through lipid bilayers, pores and plasma membranes: theory and reality. New York: Wiley. 1980

Hays, R. M. A. L., A. The state of water in the isolated toad bladder and its modification by vasopressin. J. Gen. Physiol, v.45, p.933-948. 1962.

Hempling, H. G. Permeability of the Erlich ascistes tumor of cell to water. J Gen Physiol, v.44, p.365-379. 1961.

Jacobs, M. H. e D. R. Stewart. A simple method for the quantitative measurement of cell permeability. J Cell Comp Physiol, v.1, p. 71-82. 1932.

Kanli, H. e E. Norderhus. Cell volume regulation in proximal renal tubules from trout (*Salmo trutta*). J Exp Biol, v.201, n.Pt 9, May, p.1405-19. 1998.

Knerr, S. M. e M. Lieberman. Ion transport during hypothermia in cultured heart cells: implications for protection of the immature myocardium. J Mol Cell Cardiol, v.25, n.3, Mar, p.277-88. 1993.

Lang, F., G. L. Busch, *et al.* Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. Physiol Rev, v.78, n.1, Jan, p.247-306. 1998.

Lang, F., F. Friedrich, *et al.* Ion channels in Madin-Darby canine kidney cells. Ren Physiol Biochem, v.13, n.1-2, Jan-Apr, p.82-93. 1990.

Leaf, A. Maintenance of concentration gradients and regulation of cell volume. Ann N Y Acad Sci, v.72, n.12, Feb 6, p.396-404. 1959.

Lucké, B. e M. Mccutcheon. The living cell as an osmotic system and its permeability to water. Physiol Rev, v.12, p.68-138. 1932.

Macfadem, S. R. M. Regulação de volume em células de melanoma murino, linhagem S-91: aumento regulatório de volume (RVI). Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia para obtenção do título de mestre, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002. 81 p: il p.

Macknight, A. D. Principles of cell volume regulation. Ren Physiol Biochem, v.11, n.3-5, May-Oct, p.114-41. 1988.

Macknight, A. D. e A. Leaf. Regulation of cellular volume. Physiol Rev, v.57, n.3, Jul, p.510-73. 1977.

Maeno, E., Y. Ishizaki, *et al.* Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.17, Aug 15, p.9487-92. 2000.

Morishima, S., H. Kida, *et al.* Water channel as a requisite to cell volume regulation in a human epithelial cell line. In: XXXIV International Congress of Physiological Science. Christchurch, New Zealand, 2001. 827 p.

Neufeld, D. S. e J. P. Leader. Cold inhibition of cell volume regulation during the freezing of insect malpighian tubules. J Exp Biol, v.201, n.Pt 14, Jul, p.2195-204. 1998.

Nevis, A. H. Water transport in invertebrate peripheral nerve. J Gen Physiol, v.41, p.927-958. 1958.

Okada, Y. e E. Maeno. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.130, n.3, Oct, p.377-83. 2001.

Okada, Y., E. Maeno, *et al.* Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). J Physiol, v.532, n.Pt 1, Apr 1, p.3-16. 2001.

Perci-Lima, R. D. Regulação de volume em células de melanoma murino, linhagem S-91: participação de canais iônicos e do citoesqueleto. Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia para obtenção do título de mestre, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. 69 p p.

Price, H. D. e T. E. Thompson. Properties of liquid bilayer membranes separating two aqueous phases: temperature dependence of water permeability. J Mol Biol, v.41, n.3, May 14, p.443-57. 1969.

Rouzaire-Dubois, B. e J. M. Dubois. K⁺ channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. J Physiol, v.510 (Pt 1), Jul 1, p.93-102. 1998.

- Sha'afi, R. I. Water and small nonelectrolytic permeation in red cells. In: ELLEROY, J. C. and LEW, V. L. Membranes transport in red cells. London: Academic Press. 1977. 221-256 p.
- Souza, M. M. e R. T. Boyle. A moderate decrease in temperature inhibits the calcium signaling mechanism(s) of the regulatory volume decrease in chick embryo cardiomyocytes. Braz J Med Biol Res, v.34, n.1, Jan, p.137-41. 2001.
- Strange, K. Cellular volume homeostasis. Adv Physiol Educ, v.28, n.1-4, Dec, p.155-9. 2004.
- Sudo, J. e F. Morel. Na⁺ and K⁺ cell concentrations in collagenase-treated rat kidney tubules incubated at various temperatures. Am J Physiol, v.246, n.5 Pt 1, May, p.C407-14. 1984.
- Tosteson, D. C. e J. F. Hoffman. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. J Gen Physiol, v.44, Sep, p.169-94. 1960.
- Verkman, A. S., A. N. Van Hoek, *et al.* Water transport across mammalian cell membranes. Am J Physiol, v.270, n.1 Pt 1, Jan, p.C12-30. 1996.
- Vieiera, F. L., R. I. Sha'afi, *et al.* The stage of water in human and dog red cell membrane. J Gen Physiol, v.55, p.451-466. 1970.
- Voets, T., G. Szucs, *et al.* Blockers of volume-activated Cl⁻ currents inhibit endothelial cell proliferation. Pflugers Arch, v.431, n.1, Nov, p.132-4. 1995.
- Voets, T., L. Wei, *et al.* Downregulation of volume-activated Cl⁻ currents during muscle differentiation. Am J Physiol, v.272, n.2 Pt 1, Feb, p.C667-74. 1997.
- Wondergem, R., W. Gong, *et al.* Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation. J Physiol, v.532, n.Pt 3, May 1, p.661-72. 2001.

Capítulo 3.

EFEITO DO HgCl_2 NAS RESPOSTAS ANISOSMÓTICAS DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO S91.

"Precisamos tomar cuidado para não fazer do intelecto o nosso deus. Ele tem músculos poderosos, é verdade, mas não tem nenhuma personalidade".

Albert Einstein

Abstract

When cells are acutely exposed to anisosmotic media, they initially behave as osmometers, undergoing volume changes dictated by a passive flow across the cell membrane. In anisosmotic environment, many types of cells, after initial volume changes, undergo a slower volume-regulatory response. In this study we describe the effects of HgCl_2 (an aquaporin blocker) on anisosmotic behavior of S91 murine melanoma cells. The S91 murine melanoma cells were grown in F12 HAM medium ($290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$). Morphometric measurements of relative changes in cell volume were performed using a video microscopy system and a PC software (Image Pro-Lite, Media Cybernetics). Acute anisosmotic shocks (either $190 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ or $350 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$) resulted in immediate volume changes of cells (27%) followed by a regulatory volume response to baseline by, at most, 20 min. Exposure of cells to acute anisosmotic shocks in the presence of HgCl_2 (from 0.001 to $1000 \mu\text{M}$) promoted: i) no big differences between treatments (0.001 and $0.01 \mu\text{M}$) and controls; ii) no significative alterations of volume during the experiment (0.1 and $1 \mu\text{M}$); and iii) a progressive time delay for maximum volume alterations and volume-regulatory responses between treatments (5 , 10 , 100 and $1000 \mu\text{M}$) and controls. HgCl_2 treatments affect osmotic behavior of S91 murine melanoma cells in a dose-response manner and also suggest the presence of more than a type of aquaporin. Minimum osmotic water permeabilities were observed in a range of 0.1 - $1.0 \mu\text{M}$ HgCl_2 treatments.

Resumo

Células submetidas a choques anisomóticos agudos sofrem rápidas alterações de volume (dependentes do gradiente osmótico e da permeabilidade da membrana à água e osmólitos) podendo ou não ser seguidas de lentas alterações regulatórias de volume. Neste estudo, descrevemos o efeito de diferentes concentrações de HgCl_2 , um bloqueador de aquaporinas (AQP), nas respostas anisomóticas de células de melanoma murino S91. Células de melanoma murino S91, foram mantidas em meio de cultura F12 HAM (290 $\text{mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$). As medidas morfométricas das mudanças relativas de volume foram realizadas usando um sistema de aquisição e análise de imagens (Image Pro-Lite, Media Cybernetics). As células foram expostas tanto a choques hiposmóticos agudos (190 $\text{mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$) como a choques hiperosmóticos agudos (350 $\text{mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$) resultando em variações máximas de volume de aproximadamente 27%, seguidas de uma regulação do volume celular à linha de base em até 20 min. Quando tratadas com HgCl_2 (de 0,001 a 1000 μM), seja em condições hiposmóticas ou hiperosmóticas, observou-se que: i) não houve grandes diferenças em relação aos controles (0,001 e 0,01 μM); ii) não houve alterações significativas de volume no tempo do experimento (0,1 e 1 μM); e iii) houve progressivo retardo no tempo necessário para a ocorrência das alterações máximas de volume e de regulação do mesmo em relação aos controles (5, 10, 100 e 1000 μM). Esses resultados mostram que o HgCl_2 afeta de forma dose dependente as respostas osmóticas em células de melanoma murino S91 e sugerem a presença de mais de um tipo de AQP. Nestas condições as concentrações necessárias para reduzir ao máximo a permeabilidade osmótica à água estão localizadas na faixa de 0,1-1,0 μM HgCl_2 .

3.1 Introdução

A habilidade de regulação de volume celular face a desafios osmóticos é um dos mecanismos homeostáticos fundamentais. É, provavelmente, um dos mais antigos e surgiu precocemente durante a evolução. Acredita-se que no momento em que moléculas auto-replicas foram envolvidas por membranas fosfolípídicas, e começaram a produzir moléculas não difusíveis, geraram um gradiente eletroquímico favorável ao influxo de água com riscos à ruptura destas estruturas. Para garantir o volume destas protocélulas, pode-se supor que paralelamente à evolução de moléculas auto-replicas, sistemas de transporte de solutos evoluíram visando a preservação da concentração osmótica (CO) interna igual a do meio e, portanto, garantindo fluxos resultantes de água nulos (Schultz, 1989).

Os primeiros estudos sobre regulação de volume celular foram realizados na primeira metade do século XX (Guest, 1948). Porém, pouco é conhecido sobre os mecanismos sensórios que respondem ao aumento de volume e ativam sistemas de transporte reguladores de volume celular (Ballatori e Boyer, 1996). Aumentos na hidratação celular podem reduzir a carga iônica de íons intracelulares ou diluir moléculas intracelulares que devem ser reguladores destes canais de membrana plasmática (Ballatori e Boyer, 1996). Tem sido postulado que mudanças na hidratação celular podem alterar a atividade de proteínas quinases ou fosfatases e que a fosforilação ou desfosforilação de proteínas pode iniciar estas respostas reguladoras de volume (Tilly, Van Den Berghe *et al.*, 1993; Maeda, Wurgler-Murphy *et al.*, 1994; Noe, Schliess *et al.*, 1996).

Os mecanismos de regulação de volume celular são mais convincentemente revelados pela exposição de células a mudanças abruptas na CO extracelular (Lang, Busch *et al.*, 1998). Se células são expostas a um meio hiposmótico, elas inicialmente incham quase como osmômetros ideais, mas então retornam ao volume celular original, pelo fenômeno descrito como redução regulatória de volume ("regulatory volume decrease - RVD"). Se células são expostas a um meio hiperosmótico, elas inicialmente murcham quase como osmômetros ideais, mas então retornam ao volume celular original

pelo fenômeno descrito de aumento regulatório de volume ("regulatory volume increase - RVI") (Lang, Friedrich *et al.*, 1990).

Com poucas exceções (Greger, 1985), as membranas celulares de mamíferos são altamente permeáveis à água e muito frágeis a gradientes de pressão hidrostática. Essa permeabilidade da membrana à água é dada primordialmente pela presença de canais para água presentes na membrana, denominados de aquaporinas (Sabolíc e Brown, 1995; Verkman, Van Hoek *et al.*, 1996).

Aquaporinas (AQPs) são uma família de proteínas de canais para água relacionadas a principal proteína intrínseca (MIP ou AQP0) (Mobasheri, Trujillo *et al.*, 2004). As proteínas de AQP de mamíferos formam canais permeáveis à água que supre a membrana plasmática de células vermelhas, túbulos colectores e proximal do rim e outros tecidos com alta permeabilidade à água, assim permitindo a água se mover na direção de um gradiente osmótico (Mobasheri, Trujillo *et al.*, 2004). As AQPs são expressas em diversos tecidos (Borgnia, Nielsen *et al.*, 1999; Marples, 2001). Alguns membros do gene da família de AQP são permeáveis, não apenas à água, mas também, a pequenos solutos tais como glicerol e uréia (Mobasheri, Trujillo *et al.*, 2004). A família de aquaporina mamífera consiste de dez membros que estão dentro de duas categorias: as aquaporinas tradicionais são canais para água e incluem AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 e AQP8; as não ortodoxas, multifuncionais aquagliceroporinas podem transportar água em adição a pequenos solutos. Esta última categoria inclui AQP3, AQP7 e AQP9 (Borgnia, Nielsen *et al.*, 1999).

O mercúrio inorgânico é conhecido como um potente inibidor de canais para água (Preston, Carroll *et al.*, 1992) devido à presença de um resíduo altamente conservado de cisteína (Cys) na via de permeação da água (Kozono, Yasui *et al.*, 2002). Estes canais facilitam o inchamento ou murchamento celular em resposta a mudanças na CO extracelular, e estão presentes em um número de tecidos, incluindo eritrócitos, colangiócitos, células do túbulo renal e outras células epiteliais; entretanto, eles não estão presentes em hepatócitos (Preston, Carroll *et al.*, 1992; Yano, Marinelli *et al.*, 1996).

Mercúrios são conhecidos por reagir com sulfidrilas livres e por inibir a permeabilidade osmótica à água de aquaporinas (Macey, 1984). O resíduo Cys-189 foi identificado como o sítio de inibição ao mercúrio de AQP1 (Preston, Jung *et al.*, 1993). Estruturas atômicas de AQP1 têm revelado que Cys-189 está localizado próximo a constrição do poro do canal, que leva a conclusão de que a ligação de Hg^{2+} a Cys-189 pode ocluir o poro, assim inibindo a condutância à água (Murata, Mitsuoka *et al.*, 2000; De Groot e Grubmuller, 2001; Sui, Han *et al.*, 2001). Um fato interessante é que AQP6 tem um resíduo de cisteína (Cys-190) a qual corresponde a posição para Cys-189 em AQP1. Contudo, Hg^{2+} não inibe AQP6 como inicialmente reportado (Ma, Yang *et al.*, 1996), mas ao invés disso, ativa (Yasui, Kwon *et al.*, 1999). Isto aumenta a possibilidade de que efeitos mecânicos de Hg^{2+} sobre aquaporinas sejam mais complexos do que se pensava (Hazama, Kozono *et al.*, 2002).

3.2 Objetivo

O objetivo, no presente capítulo, foi estudar o efeito de HgCl_2 , um bloqueador de aquaporinas (AQP), nas respostas anisomóticas de células de melanoma murino S91.

3.3 Material e Métodos

Os protocolos para a cultura e preparação das células, sistema de perfusão, aquisição e análise das imagens e a análise estatística foram descritas, em detalhes, previamente no capítulo 1 (ver item 1.5).

Para se verificar o efeito de HgCl_2 , um bloqueador de aquaporinas, diferentes doses (0,001 μM ; 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 100 μM e 1000 μM) foram adicionadas às soluções hiposmóticas e hiperosmóticas no momento da perfusão, conforme protocolo citado no item 1.5.3.

3.4. Resultados

3.4.1 Efeito de diferentes doses de HgCl_2 em células S91 submetidas a choques hiposmóticos agudos

As principais respostas osmóticas em células de melanoma murino S-91 incubadas em solução isosmótica após perfusão com solução hiposmótica na ausência ou presença de HgCl_2 estão sumarizadas na Tabela 3.1.

As células, quando expostas a choque hiposmótico agudo a 37 °C, apresentaram, como esperado, um aumento no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $0,0843 \pm 0,0158 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 3.2). Tal aumento teve um máximo, em média, de $26,6 \pm 2,9\%$ no terceiro minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a esse aumento de volume, seguiu-se a redução regulatória de volume (RVD), com retorno à linha de base em até 20 min (Figura 3.1 e Tabela 3.1) e uma constante de decaimento de $-0,0683 \pm 0,0052 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.3).

A exposição das células a um choque hiposmótico agudo com a adição de $0,001 \text{ }\mu\text{M}$ de HgCl_2 resultou em um aumento no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $0,0610 \pm 0,0044 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 3.2). Tal aumento teve um máximo, em média, de $18,3 \pm 2,2\%$ no terceiro minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a este aumento de volume, seguiu-se a RVD, com retorno à linha de base em até 30 min (Figura 3.2 e Tabela 3.1) e uma constante de decaimento de $-0,0710 \pm 0,0062 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.3).

As células tratadas com $0,01 \text{ }\mu\text{M}$ de HgCl_2 durante a exposição a um choque hiposmótico agudo apresentaram um aumento no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $0,0716 \pm 0,0144 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 3.2). Tal aumento teve um máximo de, em média, $21,8 \pm 2,6\%$ no terceiro minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a este aumento de volume, seguiu-se a RVD, com retorno à linha de base em até 30 min (Figura 3.3 e Tabela 3.1) e uma constante de decaimento de $-0,0763 \pm 0,0089 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.3).

Quando as células foram tratadas com 0,1 μM e 1 μM de HgCl_2 durante a exposição à solução hiposmótica, não foram detectadas diferenças significativas do volume celular ao longo de todo experimento (Figuras 3.4 e 3.5, respectivamente e Tabela 3.1).

A exposição das células a um choque hiposmótico agudo com a adição de 5 μM de HgCl_2 resultou em um aumento no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $0,0041 \pm 0,0003 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 3.2). Tal aumento teve um máximo, em média, de $18,6 \pm 2,6\%$ no quinquagésimo minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a este aumento de volume, seguiu-se a RVD, com retorno à linha de base em até 60 min (Figura 3.6 e Tabela 3.1).

As células expostas a um choque hiposmótico agudo com a adição de 10 μM de HgCl_2 apresentaram um aumento no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $0,0040 \pm 0,0008 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 3.2). Tal aumento teve um máximo, em média, de $19,8 \pm 3,0\%$ no quadragésimo minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a este aumento de volume, seguiu-se a RVD, com retorno à linha de base em até 50 min (Figura 3-7 e Tabela 3-1) e uma constante de decaimento de $-0,8665 \pm 0,1988 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.3).

Quando as células foram expostas a um choque hiposmótico agudo com a adição de 100 μM de HgCl_2 apresentaram um aumento no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $0,0114 \pm 0,0036 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 3.2). Tal aumento teve um máximo, em média, de $23,9 \pm 3,2\%$ no décimo minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a este aumento de volume, seguiu-se a RVD, com retorno à linha de base em até 40 min (Figura 3.8 e Tabela 3.1) e uma constante de decaimento de $-0,0828 \pm 0,0167 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.3).

A exposição das células a um choque hiposmótico agudo com a adição de 1000 μM de HgCl_2 resultou em um aumento no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $0,0647 \pm 0,0050 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 3.2). Tal aumento teve um máximo, em média, de $24,6 \pm 2,4\%$ no quarto minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a este aumento de volume, seguiu-se a RVD, com retorno à linha de base em até 30

min (Figura 3.9 e Tabela 3.1) e uma constante de decaimento de $-0,0654 \pm 0,0145 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.3).

Apesar de apresentar variações em relação aos volumes máximos entre os grupos controle e os tratamentos, estas não foram significativas durante a exposição das células às soluções hiposmóticas (Tabela 3.1).

3.4.2 Efeito de diferentes doses de HgCl_2 em células S91 submetidas a choques hiperosmóticos agudos

As principais respostas osmóticas em células de melanoma murino S-91 incubadas em solução isosmótica após perfusão com solução hiperosmótica na ausência ou presença de HgCl_2 estão sumarizadas na Tabela 3.4.

As células expostas a choque hiperosmótico agudo a 37°C apresentaram, como esperado, uma redução no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $-0,0971 \pm 0,0194 \text{ \%.min}^{-1}$ (Tabela 3.5). Tal redução teve uma máxima, em média, de $27,3 \pm 1,3\%$ no terceiro minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a essa redução de volume, seguiu-se o aumento regulatório de volume (RVI), com retorno à linha de base em até 20 min (Figura 3.10 e Tabela 3.4) e uma constante de decaimento de $-0,0745 \pm 0,0086 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.6).

A exposição das células a um choque hiperosmótico agudo com a adição de $0,001 \text{ }\mu\text{M}$ de HgCl_2 apresentou uma redução no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $-0,0577 \pm 0,0100 \text{ \%.min}^{-1}$ (Tabela 3.5). Tal redução teve uma máxima, em média, de $20,6 \pm 1,1\%$ no quarto minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a essa redução de volume, seguiu-se o RVI, com retorno à linha de base em até 30 min (Figura 3.11 e Tabela 3.4) e uma constante de decaimento de $-0,0702 \pm 0,0066 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.6).

A exposição das células a um choque hiperosmótico agudo com a adição de $0,01 \text{ }\mu\text{M}$ de HgCl_2 apresentou uma redução no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $-0,0496 \pm 0,0078 \text{ \%.min}^{-1}$ (Tabela

3.5). Tal redução teve uma máxima, em média, de $18,1 \pm 1,5\%$ no quarto minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a essa redução de volume, seguiu-se o RVI, com retorno à linha de base em até 40 min (Figura 3.12 e Tabela 3.4) e uma constante de decaimento de $-0,0468 \pm 0,0040 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.6).

Quando as células foram tratadas com $0,1 \text{ }\mu\text{M}$ e $1 \text{ }\mu\text{M}$ de HgCl_2 durante a exposição à solução hiperosmótica, não foram detectadas diferenças significativas do volume celular ao longo de todo experimento (Figuras 3.13 e 3.14, respectivamente e Tabela 3.4).

A exposição das células a um choque hiperosmótico agudo com a adição de $5 \text{ }\mu\text{M}$ de HgCl_2 apresentou uma redução no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $-0,0216 \pm 0,0031 \text{ }\%.\text{min}^{-1}$ (Tabela 3.5). Tal redução teve uma máxima, em média, de $19,3 \pm 1,2\%$ no décimo minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a essa redução de volume, seguiu-se o RVI, com retorno à linha de base em até 60 min (Figura 3.15 e Tabela 3.4) e uma constante de decaimento de $-0,0409 \pm 0,0082 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.6).

A exposição das células a um choque hiperosmótico agudo com a adição de $10 \text{ }\mu\text{M}$ de HgCl_2 apresentou uma redução no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $-0,0525 \pm 0,0076 \text{ }\%.\text{min}^{-1}$ (Tabela 3.5). Tal redução teve uma máxima, em média, de $24,3 \pm 1,1\%$ no quinto minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a essa redução de volume, seguiu-se o RVI, com retorno à linha de base em até 50 min (Figura 3.16 e Tabela 3.4) e uma constante de decaimento de $-0,0400 \pm 0,0051 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.6).

A exposição das células a um choque hiperosmótico agudo com a adição de $100 \text{ }\mu\text{M}$ de HgCl_2 apresentou uma redução no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $-0,0597 \pm 0,0133 \text{ }\%.\text{min}^{-1}$ (Tabela 3.5). Tal redução teve uma máxima, em média, de $24,3 \pm 1,1\%$ no quarto minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a essa redução de volume, seguiu-se o aumento regulatório de volume (RVI), com retorno à linha de base em até 40 min (Figura 3.17 e Tabela 3.4) e uma constante de decaimento de $-0,0585 \pm 0,0064 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.6).

A exposição das células a um choque hiperosmótico agudo com a adição de 1000 μM de HgCl_2 apresentou uma redução no volume celular, com uma taxa de variação linear de volume de $-0,0913 \pm 0,0163 \text{ \%}.\text{min}^{-1}$ (Tabela 3.5). Tal redução teve uma máxima, em média, de $26,4 \pm 1,2\%$ no terceiro minuto, sendo significativa a diferença em relação ao volume inicial. Posteriormente a essa redução de volume, seguiu-se o RVI, com retorno à linha de base em até 20 min (Figura 3.18 e Tabela 3.4) e uma constante de decaimento de $-0,0566 \pm 0,0064 \text{ min}^{-1}$ (Tabela 3.6).

As variações máximas de volume foram estatisticamente significativas quando as células foram submetidas às soluções hiperosmóticas acrescidas de 0,001; 5 e 0,01 μM de HgCl_2 (Tabela 3.4).

controle

Figura 3.1. Alterações morfológicas (volume) em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de $290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de $190 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$. (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, $n = 120$ células, * $p < 0,001$, & $p < 0,05$ em relação ao volume celular no tempo 0 min).

0,001 μM HgCl_2

Figura 3.2. Alterações morfológicas (volume) em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de 190 mOsm.kgH₂O⁻¹ na presença de 0,001 μM de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, n = 120 células, * p < 0,001, # p < 0,01 em relação ao volume celular no tempo 0 min).

Figura 3.3. Alterações morfométricas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de $290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de $190 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ na presença de $0,01 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, $n = 120$ células, * $p < 0,001$, # $p < 0,01$ em relação ao volume celular no tempo 0 min).

0,1 μM HgCl_2

Figura 3.4. Alterações morfológicas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de 190 mOsm.kgH₂O⁻¹ na presença de 0,1 μM de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, n = 120 células).

1 μM HgCl_2

Figura 3.5. Alterações morfológicas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de $290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de $190 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ na presença de $1 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, $n = 120$ células).

5 μM HgCl_2

Figura 3.6. Alterações morfológicas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de 190 mOsm.kgH₂O⁻¹ na presença de 5 μM de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, n = 120 células, * p < 0,001, & p < 0,05 em relação ao volume celular no tempo 0 min).

Figura 3.7. Alterações morfométricas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de 190 mOsm.kgH₂O⁻¹ na presença de 10 μ M de HgCl₂. (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, n = 120 células, * p < 0,001, # p < 0,01, & p < 0,05 em relação ao volume celular no tempo 0 min).

Figura 3.8. Alterações morfométricas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de $290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de $190 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ na presença de $100 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, $n = 120$ células, * $p < 0,001$, # $p < 0,01$ em relação ao volume celular no tempo 0 min).

Figura 3.9. Alterações morfométricas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de $290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de $190 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ na presença de $100 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, $n = 120$ células, * $p < 0,001$, # $p < 0,01$, & $p < 0,05$ em relação ao volume celular no tempo 0 min).

Figura 3.10. Alterações morfológicas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de $290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de $350 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$. (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, $n = 120$ células, * $p < 0,001$ em relação ao volume celular no tempo 0 min).

0,001 μM HgCl_2

Figura 3.11. Alterações morfológicas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de 350 mOsm.kgH₂O⁻¹ na presença de 0,001 μM de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, n = 120 células, * p < 0,001, # p < 0,01 em relação ao volume celular no tempo 0 min).

Figura 3.12. Alterações morfométricas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de $290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de $350 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ na presença de $0,01 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, $n = 120$ células, * $p < 0,001$, # $p < 0,01$ em relação ao volume celular no tempo 0 min).

Figura 3.13. Alterações morfométricas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de $290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de $350 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ na presença de $0,1 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, $n = 120$ células).

Figura 3.14. Alterações morfométricas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de 350 mOsm.kgH₂O⁻¹ na presença de 1 μ M de HgCl₂. (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, n = 120 células).

Figura 3.15. Alterações morfológicas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de 290 mOsm.kgH₂O⁻¹ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de 350 mOsm.kgH₂O⁻¹ na presença de 5 μ M de HgCl₂. (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, n = 120 células, * p < 0,001, & p < 0,05 em relação ao volume celular no tempo 0 min).

Figura 3.16. Alterações morfométricas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de $290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de $350 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ na presença de $10 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, $n = 120$ células, * $p < 0,001$ em relação ao volume celular no tempo 0 min).

Figura 3.17. Alterações morfométricas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de $290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de $350 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ na presença de $100 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, $n = 120$ células, * $p < 0,001$ em relação ao volume celular no tempo 0 min).

Figura 3.18. Alterações morfométricas em células de melanoma murino S91 incubadas em solução de $290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ expressas em termos de valores relativos de volume, após perfusão com solução de $350 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$ na presença de $1000 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . (média $\pm$ e.p.m. a partir de 3 grupos experimentais, $n = 120$ células, * $p < 0,001$ em relação ao volume celular no tempo 0 min).

Tabela 3.1. Principais respostas osmóticas em células de melanoma murino S-91 incubadas em solução de 290 mOsm.kg H₂O⁻¹ após perfusão com solução de 190 mOsm.kg H₂O⁻¹ na ausência ou presença de HgCl₂. As variações de volume estão expressas como média ± erro padrão da média de três grupos experimentais com um *n* de 120 células.

HgCl ₂ (μM)	Variação Máxima de Volume (%) p < 0.05	Tempo para Volume Máximo (min) p < 0.05	Tempo de RVD (min)
Controle	26,6 ± 2,9	3	20
0,001	18,3 ± 2,2	3	10
0,01	21,8 ± 2,6	3	10
0,1	-	-	-
1	-	-	-
5	18,6 ± 2,6	50	60
10	19,8 ± 3,0	40	50
100	23,9 ± 3,2	10	40
1000	24,6 ± 2,4	4	30

Tabela 3.2. Taxa de variação linear de volume para células de melanoma murino S91 submetidas às condições hiposmóticas agudas em diferentes doses de HgCl₂.

HgCl ₂ (μM)	Taxa de variação linear de volume ± desvio padrão (%.min ⁻¹)
Controle	0,0843 ± 0,0158
0,001	0,0610 ± 0,0044
0,01	0,0716 ± 0,0144
0,1	-
1	-
5	0,0041 ± 0,0003 *
10	0,0040 ± 0,0008 *
100	0,0114 ± 0,0036
1000	0,0647 ± 0,0050

* p < 0,001 em relação ao grupo controle.

Tabela 3.3. Constante de decaimento (k) para células de melanoma murino S91 submetidas às condições hiposmóticas agudas em diferentes doses de HgCl₂.

HgCl ₂ (μM)	Constante de decaimento (k) ± desvio padrão (min ⁻¹)
Controle	-0,0683 ± 0,0053
0,001	-0,0710 ± 0,0062
0,01	-0,0763 ± 0,0089
0,1	-
1	-
5	-
10	-0,8665 ± 0,1988 *
100	-0,0828 ± 0,0167
1000	-0,0654 ± 0,0145

* p < 0,001 em relação ao grupo controle.

Tabela 3.4. Principais respostas osmóticas em células de melanoma murino S-91 incubadas em solução de 290 mOsm.kg H₂O⁻¹ após perfusão com solução de 350 mOsm.kg H₂O⁻¹ na ausência ou presença de HgCl₂. As variações de volume estão expressas como média ± erro padrão da média de três grupos experimentais com um n de 120 células.

HgCl ₂ (μM)	Variação Máxima de Volume (%) p < 0.05	Tempo para Redução Máxima de volume (min) p < 0.05	Tempo de RVD (min)
Controle	27,3 ± 1,3	3	20
0,001	20,6 ± 1,1 #	4	30
0,01	18,1 ± 1,5 #	4	40
0,1	-	-	-
1	-	-	-
5	19,3 ± 1,2 #	10	60
10	24,3 ± 1,1	5	50
100	24,3 ± 1,1	4	40
1000	26,4 ± 1,2	3	20

p < 0.05 em relação à variação máxima de volume do controle (teste t de Student).

Tabela 3.5. Taxa de variação linear de volume para células de melanoma murino S91 submetidas às condições hiperosmóticas agudas em diferentes doses de HgCl_2 .

HgCl_2 (μM)	Taxa de variação linear de volume $\pm$ desvio padrão (%.min ⁻¹)
Controle	-0,0971 $\pm$ 0,0194
0,001	-0,0577 $\pm$ 0,0099
0,01	-0,0496 $\pm$ 0,0078
0,1	-
1	-
5	-0,0216 $\pm$ 0,0031*
10	-0,0525 $\pm$ 0,0076
100	-0,0597 $\pm$ 0,0133
1000	-0,0913 $\pm$ 0,0163

* $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

Tabela 3.6. Constante de decaimento (k) para células de melanoma murino S91 submetidas às condições hiperosmóticas agudas em diferentes doses de HgCl_2 .

HgCl_2 (μM)	Constante de decaimento (k) $\pm$ desvio padrão (min ⁻¹)
Controle	-0,0745 $\pm$ 0,0086
0,001	-0,0702 $\pm$ 0,0066
0,01	-0,0468 $\pm$ 0,0040
0,1	-
1	-
5	-0,0409 $\pm$ 0,0082 *
10	-0,0400 $\pm$ 0,0051 *
100	-0,0585 $\pm$ 0,0064 *
1000	-0,0566 $\pm$ 0,0064 *

* $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

3.5 Discussão

No presente capítulo, verificamos o efeito do HgCl_2 , um bloqueador de aquaporinas, em células de melanoma murino linhagem S91 expostas a choques anisomóticos agudos. Para tanto, foram testadas oito doses de HgCl_2 (0,001 μM ; 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 100 μM e 1000 μM) para cada condição, ou seja, para choques hiposmóticos (190 $\text{mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$) e choques hiperosmóticos (350 $\text{mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$). Diversos trabalhos (Trimarchi, Liu *et al.*, 2002; Najvirtova, Greer *et al.*, 2003; Candia, Alvarez *et al.*, 2006) utilizaram o HgCl_2 em células isoladas submetidas a choques anisomóticos agudos. Porém, a grande maioria destes trabalhos submeteu as células a apenas um choque osmótico (hiposmótico ou hiperosmótico).

Estudos em membranas de vesículas da borda em escova de células renais de ratos mostrou-se que o HgCl_2 (40-50 μM) diminuía a constante de taxa da fase rápida de perda de volume em choques hiperosmóticos, mas não alterava a amplitude do fenômeno. Ao mesmo tempo, o HgCl_2 não interferia na constante das vesículas de resposta lenta. Em concentrações mais baixas (<10 μM), o HgCl_2 não interferia na permeabilidade à água acima descrita, mas aumentou em até 15 vezes a permeabilidade ao NaCl e à uréia (Van Hoek, De Jong *et al.*, 1990).

Em células renais de cães foi observado que tanto o HgCl_2 e um outro agente mercurial (p-cloromercuribenzoilsulfonato), quando em altas concentrações, terminavam por bloquear a recuperação de volume em células de rim canino submetidas a choque hiposmótico. Entretanto, a taxa de retorno ao volume inicial era bastante aumentada se o meio de perfusão não contivesse Na^+ , sugerindo, assim, que os distúrbios causados pelos agentes se relacionavam a fluxos de íons pelas membranas (Rothstein e Mack, 1991). Neste sentido, estudos com hepatócitos de um elasmobrânquio marinho osmoconformador (*Raja erinacea*) mostraram que a ação dos mercuriais se dá em múltiplos sítios relacionados à regulação de volume celular, como o fluxo de osmólitos e de íons (Ballatori e Boyer, 1996, 1997). Mais recentemente, um outro estudo, a respeito da permeabilidade à água em células de timócitos de ratos expostas ao HgCl_2 , observou que tal permeabilidade apresentava um

efeito bimodal, ou seja, era inibida em doses baixas e restaurada (ou mesmo aumentada) em doses altas (Kurbannazarova, Tashmukhamedov *et al.*, 2003).

Os dados obtidos em choques hiposmóticos e hiperosmóticos frente a doses de mercúrio 0,001 μM (Figuras 3.2 e 3.11) e 0,01 μM (Figuras 3.3 e 3.11) estão muito próximos do que ocorre com as células em experimentos controle (Figuras 3.1 e 3.10). Isso nos leva a supor que estas doses, para as células de melanoma murino S91, não sejam suficientes para alterar a permeabilidade da membrana e, consequentemente, o volume celular.

Células S91 tratadas com 0,1 (Figuras 3.4 e 3.13) e 1 μM HgCl_2 (Figuras 3.5 e 3.14) não alteraram seu volume durante todo experimento. Estas mesmas doses foram utilizadas em timócitos de ratos por, sendo que os autores reportam uma inibição do inchamento celular da ordem de 20% (Kurbannazarova, Tashmukhamedov *et al.*, 2003).

Nossos resultados mostram que, à medida em que aumenta-se a dose de mercúrio (5-1000 μM) há progressivo retardo no tempo necessário para a ocorrência das alterações máximas de volume e de regulação do mesmo em relação aos controles, ou seja, quanto maior a dose de HgCl_2 mais rápido as células atingiram seus volume extremos e mais rápida foi a regulação de volume. Estes dados estão de acordo com resultados obtidos em timócitos de ratos (Kurbannazarova, Tashmukhamedov *et al.*, 2003) e em ovócitos de *Xenopus laevis* (Hazama, Kozono *et al.*, 2002).

Um estudo sobre a eficácia comparativa de HgCl_2 com outros inibidores para AQP1 em eritrócitos de ratos mostrou que TEA, acetazolamida e DMSO não inibiram a AQP1. Entretanto, a AQP 1 foi inibida por HgCl_2 , Au^{3+} e Ag^+ , com um IC50 de aproximadamente 10, 14 e 6 μM , respectivamente. Embora o Au^{3+} e Ag^+ efetivamente inibiram a permeabilidade à água da AQP1, eles não são usados como tratamento clínico, pois não são específicos em suas ações. Ag^+ é insolúvel em soluções contendo Cl^- fisiológico e Au^{3+} é tóxico em concentrações necessárias para inibir a permeabilidade à água da AQP1 (Yang, Kim *et al.*, 2006).

Canais específicos que são regulados por osmolalidades não fisiológicas ainda não foram identificados. O uso de 0,5 mM HgCl_2 como um agente implicado no envolvimento de AQPs em observadas mudanças no fluxo

unidirecional de água resultou em dados inconclusivos. Quando esta dose foi aplicada nos dois lados da membrana (apical e basolateral) do epitélio conjuntivo de coelho não houve diferenças no fluxo de água; porém, quando foi aplicado nas membranas separadamente, na presença de uma solução hiperosmótica, reduziu o fluxo de água em 6% (Candia, Alvarez *et al.*, 2006). O bloqueio da função de AQP1 foi completo com 65 μM HgCl_2 e impediu a rápida acidificação de eritrócitos humanos (Blank e Ehmke, 2003).

Em ovócitos de *Xenopus laevis* a permeabilidade da água em AQP6 foi ativada por 300 μM HgCl_2 com uma taxa de variação linear de volume de 0,3 $\%.\text{min}^{-1}$ (Holm, Klaerke *et al.*, 2004). Este estudo mostrou uma via para tráfego de pequenas moléculas, tais como uréia e glicerol como foi evidenciado pelo aumento de incorporação destas substâncias marcadas radioativamente. AQP3 e AQP6 exibem permeabilidade a água e glicerol e seria esperado que estas AQPs também compartilhassem outras propriedades. Em um estudo anterior foi encontrado que AQP3 foi inibida em pH externo ácido (Zeuthen e Klaerke, 1999). A AQP6 ativada por Hg^{2+} , entretanto, não compartilha esta propriedade. Assim conclui-se que AQP6, funcionalmente, pelo menos, pode ser caracterizada como uma aquagliceroporina, juntamente com AQP3, AQP7 e AQP9 e tem a habilidade de suportar o fluxo de glicerol e uréia. Esta caracterização funcional conflita com a sequência de aminoácidos e a localização genética na qual a AQP6 está próxima das aquaporinas (Ma, Yang *et al.*, 1996; Ma, Yang *et al.*, 1997; Krane, Towne *et al.*, 1999; Zardoya e Villalba, 2001). Este é o primeiro trabalho de interesse ao nível molecular. Foi mostrado que AQP6 pode assumir uma conformação na qual seu poro aquoso é funcionalmente amplo, sem tornar-se inteiramente não seletivo; o poro permanece impermeável às grandes moléculas, tais como a sucrose. Este trabalho tem uma direta relevância sob condições patofisiológicas, tais como envenenamento por mercúrio (Holm, Klaerke *et al.*, 2004).

Em ovócitos imaturos (proestro) de ratos foi encontrada a presença de AQP9 que desaparece em ovócito maduro (estro). Esta AQP9 foi inibida reversivelmente na presença de 300 μM HgCl_2 ((Ford, Merot *et al.*, 2000).

Células do epitélio intestinal humano sofreram uma redução de aproximadamente 30% da permeabilidade osmótica quando expostas a

choques hiposmóticos na presença de 10 μM HgCl_2 . Com bases em dados de RT-PCR, conclui-se que AQP3 está presente nestas células, indicando um papel principal na RVD (Kida et al., 2005). É possível que as AQPs apresentem algum outro papel na RVD, por exemplo, agindo como um sensor de estresse mecânico ou diferença de pressão de turgor na membrana plasmática (Hill, Shachar-Hill et al., 2004).

Recentes estudos têm evidenciado a ação do cloreto de níquel (NiCl_2) também sobre aquaporinas. O efeito do NiCl_2 sobre um grupo de aquaporinas (AQP3) presentes em células do epitélio pulmonar humano foi imediato e reversível, alterando a permeabilidade deste canal, permeabilidade esta dependente do pH (Zelenina, Bondar et al., 2003). Estudos anteriores (Perci-Lima, 2005) sugere que o reduzido aumento de volume (10%) em células de melanoma murino S91 submetidas a choques hiposmóticos acrescidos de 4 mM NiCl_2 foi, principalmente, devido ao bloqueio de aquaporinas (impedindo, assim, o influxo de água), uma vez que o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} não foi observado nestas células, quando expostas a choques hiposmóticos.

Em choques hiposmóticos na presença de 5 e 10 μM HgCl_2 as taxas de variação de volume foram significativas em relação ao controle, apesar de não ter uma diferença significativa nos volume máximos e na constante de decaimento (exceto para 10 μM HgCl_2) em relação ao controle. Já para os choques hiperosmóticos, houve alteração nos volumes extremos quando acrescidos de 0,001; 0,01 e 5 μM HgCl_2 . Em relação a constante de decaimento, para este choque, observamos diferenças significativas em relação ao controle quando as doses foram 5. 10; 1000; 1000 μM HgCl_2 . Assim, parece-nos razoável sugerir que estas doses, para estes determinados choques, alteraram a permeabilidade da membrana à água em AQPs. Outra possível explicação, no caso de não alteração nos volumes máximos, é de estas células respondem melhor para os choques hiposmóticos (para um gradiente de 100 $\text{mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$) do que para hiperosmóticos (60 $\text{mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$). Além disso, a capacidade de regulação de volume envolve uma grande diversidade de sistemas de transporte iônico na membrana celular

e mecanismos que atuam em determinados choques osmóticos podem não atuar ou mesmo ter sua ação diferenciada.

Neste capítulo, podemos concluir que o HgCl_2 afeta de forma dose dependente as respostas osmóticas em células de melanoma murino S91 e sugerem a presença de mais de um tipo de AQP. Nestas condições as concentrações necessárias para reduzir ao máximo a permeabilidade osmótica à água estão localizadas na faixa de 0,1-1,0 μM HgCl_2 .

3.6 Referências Bibliográficas

Ballatori, N. e J. L. Boyer. Disruption of cell volume regulation by mercuric chloride is mediated by an increase in sodium permeability and inhibition of an osmolyte channel in skate hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol, v.140, n.2, Oct, p.404-10. 1996.

_____. ATP regulation of a swelling-activated osmolyte channel in skate hepatocytes. J Exp Zool, v.279, n.5, Dec 1, p.471-5. 1997.

Blank, M. E. e H. Ehmke. Aquaporin-1 and HCO₃⁻-Cl⁻ transporter-mediated transport of CO₂ across the human erythrocyte membrane. J Physiol, v.550, n.Pt 2, Jul 15, p.419-29. 2003.

Borgnia, M., S. Nielsen, *et al.* Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. Annu Rev Biochem, v.68, p.425-58. 1999.

Candia, O. A., L. J. Alvarez, *et al.* Regulation of water permeability in rabbit conjunctival epithelium by anisotonic conditions. Am J Physiol Cell Physiol, v.290, n.4, Apr, p.C1168-78. 2006.

De Groot, B. L. e H. Grubmuller. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. Science, v.294, n.5550, Dec 14, p.2353-7. 2001.

Ford, P., J. Merot, *et al.* Water permeability in rat oocytes at different maturity stages: aquaporin-9 expression. J Membr Biol, v.176, n.2, Jul 15, p.151-8. 2000.

Greger, R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. Physiol Rev, v.65, n.3, Jul, p.760-97. 1985.

Guest, G. M. Osmometric behavior of normal and abnormal human erythrocytes. Blood, v.3, p.541. 1948.

Hazama, A., D. Kozono, *et al.* Ion permeation of AQP6 water channel protein. Single channel recordings after Hg²⁺ activation. J Biol Chem, v.277, n.32, Aug 9, p.29224-30. 2002.

Hill, A. E., B. Shachar-Hill, *et al.* What are aquaporins for? J Membr Biol, v.197, n.1, Jan 1, p.1-32. 2004.

Holm, L. M., D. A. Klaerke, *et al.* Aquaporin 6 is permeable to glycerol and urea. Pflugers Arch, v.448, n.2, May, p.181-6. 2004.

Kozono, D., M. Yasui, *et al.* Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. J Clin Invest, v.109, n.11, Jun, p.1395-9. 2002.

Krane, C. M., J. E. Towne, *et al.* Cloning and characterization of murine Aqp5: evidence for a conserved aquaporin gene cluster. Mamm Genome, v.10, n.5, May, p.498-505. 1999.

Kurbannazarova, R. S., B. A. Tashmukhamedov, *et al.* Osmotic water permeability and regulatory volume decrease of rat thymocytes. Gen Physiol Biophys, v.22, n.2, Jun, p.221-32. 2003.

Lang, F., G. L. Busch, *et al.* Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. Physiol Rev, v.78, n.1, Jan, p.247-306. 1998.

Lang, F., F. Friedrich, *et al.* Ion channels in Madin-Darby canine kidney cells. Ren Physiol Biochem, v.13, n.1-2, Jan-Apr, p.82-93. 1990.

Ma, T., B. Yang, *et al.* cDNA cloning and gene structure of a novel water channel expressed exclusively in human kidney: evidence for a gene cluster of aquaporins at chromosome locus 12q13. Genomics, v.35, n.3, Aug 1, p.543-50. 1996.

_____. Closely spaced tandem arrangement of AQP2, AQP5, and AQP6 genes in a 27-kilobase segment at chromosome locus 12q13. Genomics, v.43, n.3, Aug 1, p.387-9. 1997.

Macey, R. I. Transport of water and urea in red blood cells. Am J Physiol, v.246, n.3 Pt 1, Mar, p.C195-203. 1984.

Maeda, T., S. M. Wurgler-Murphy, *et al.* A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. Nature, v.369, n.6477, May 19, p.242-5. 1994.

Marples, D. Aquaporins: roles in renal function and peritoneal dialysis. Perit Dial Int, v.21, n.2, Mar-Apr, p.212-8. 2001.

Mobasheri, A., E. Trujillo, *et al.* Aquaporin water channels AQP1 and AQP3, are expressed in equine articular chondrocytes. Vet J, v.168, n.2, Sep, p.143-50. 2004.

Murata, K., K. Mitsuoka, *et al.* Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. Nature, v.407, n.6804, Oct 5, p.599-605. 2000.

Najvirtova, M., S. E. Greer, *et al.* Cell volume induced hormone secretion: studies on signal transduction and specificity. Cell Physiol Biochem, v.13, n.2, p.113-22. 2003.

Noe, B., F. Schliess, *et al.* Regulation of taurocholate excretion by a hypo-osmolarity-activated signal transduction pathway in rat liver. Gastroenterology, v.110, n.3, Mar, p.858-65. 1996.

Perci-Lima, R. D. Participação do cálcio na regulação de volume em células de melanoma murino, linhagem S-91. Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia para obtenção do título de doutor, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. iii, 104 p: il p.

Preston, G. M., T. P. Carroll, *et al.* Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. Science, v.256, n.5055, Apr 17, p.385-7. 1992.

Preston, G. M., J. S. Jung, *et al.* The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. J Biol Chem, v.268, n.1, Jan 5, p.17-20. 1993.

Rothstein, A. e E. Mack. Actions of mercurials on cell volume regulation of dissociated MDCK cells. Am J Physiol, v.260, n.1 Pt 1, Jan, p.C113-21. 1991.

- Sabolíc, I. e D. Brown. Water channel in renal and nonrenal tissues. NIPS, v.10, p.12-17. 1995.
- Schultz, S. G. Volume Preservation: then and now. News Physiol Sci, v.4, p.169-172. 1989.
- Sui, H., B. G. Han, *et al.* Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. Nature, v.414, n.6866, Dec 20-27, p.872-8. 2001.
- Tilly, B. C., N. Van Den Berghe, *et al.* Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances. J Biol Chem, v.268, n.27, Sep 25, p.19919-22. 1993.
- Trimarchi, J. R., L. Liu, *et al.* Apoptosis recruits two-pore domain potassium channels used for homeostatic volume regulation. Am J Physiol Cell Physiol, v.282, n.3, Mar, p.C588-94. 2002.
- Van Hoek, A. N., M. D. De Jong, *et al.* Effects of dimethylsulfoxide and mercurial sulfhydryl reagents on water and solute permeability of rat kidney brush border membranes. Biochim Biophys Acta, v.1030, n.2, Dec 14, p.203-10. 1990.
- Verkman, A. S., A. N. Van Hoek, *et al.* Water transport across mammalian cell membranes. Am J Physiol, v.270, n.1 Pt 1, Jan, p.C12-30. 1996.
- Yang, B., J. K. Kim, *et al.* Comparative efficacy of HgCl₂ with candidate aquaporin-1 inhibitors DMSO, gold, TEA⁺ and acetazolamide. FEBS Lett, v.580, n.28-29, Dec 11, p.6679-84. 2006.
- Yano, M., R. A. Marinelli, *et al.* Rat hepatocytes transport water mainly via a non-channel-mediated pathway. J Biol Chem, v.271, n.12, Mar 22, p.6702-7. 1996.
- Yasui, M., T. H. Kwon, *et al.* Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.10, May 11, p.5808-13. 1999.
- Zardoya, R. e S. Villalba. A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes. J Mol Evol, v.52, n.5, May, p.391-404. 2001.
- Zelenina, M., A. A. Bondar, *et al.* Nickel and extracellular acidification inhibit the water permeability of human aquaporin-3 in lung epithelial cells. J Biol Chem, v.278, n.32, Aug 8, p.30037-43. 2003.
- Zeuthen, T. e D. A. Klaerke. Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H⁽⁺⁾. J Biol Chem, v.274, n.31, Jul 30, p.21631-6. 1999.

Capítulo 4.

DISCUSSÃO GERAL.

"Não se pode ensinar tudo a alguém, pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por si mesmo".

Galileu Galilei

4.1 Discussão Geral

De acordo com registros sobre a epidemiologia do câncer, melanomas, juntamente com carcinomas pulmonares, são tipos de câncer cuja incidência tem aumentado continuamente (Liotta, Guirguis *et al.*, 1987). A utilização de modelos animais tornou-se pré-requisito para uma série de testes, visando a descoberta de novas terapias para o tratamento destas formas de tumores. Linhagens como B16, K1735 e S91, são frequentemente utilizadas como modelos de melanoma, sendo que, dentre estas, apenas a linhagem K1735 não parece ser apropriada (Peter, Mezzacasa *et al.*, 2001).

Assim, o modelo escolhido para o presente trabalho foi a S91 que, como já foi mencionado no capítulo 1, foi retirada de tumor surgido espontaneamente em camundongos da linhagem DBA/2J. Estas células, quando estabelecidas em cultura, mantiveram ao menos uma de suas funções órgão-específicas, no caso, a produção de melanina. Além disso, estas células, quando inoculadas, são capazes de produzir novo tumor em seu respectivo hospedeiro (Yasumura, Tashjian Jr. *et al.*, 1966). Com isso, novas células podem ser obtidas, eliminando, assim, os problemas decorrentes da propagação serial.

Entretanto, um problema bem comum de células em cultura é sua instabilidade fenotípica e genotípica, resultado de variações genéticas (Freshney, 2000). Há duas causas para a ocorrência de variações genéticas. Uma delas é a taxa de mutação espontânea pode ser mais alta *in vitro*, associada, talvez, à alta taxa de proliferação. A outra é a não eliminação de células mutantes, a menos que tenham sua capacidade de crescimento prejudicada.

Células de linhagens contínuas como carcinomas, sarcomas, gliomas e melanomas têm vantagem de sobreviverem indefinidamente, crescerem mais rapidamente e poderem ser clonadas mais facilmente, quando comparadas às células de linhagens finitas. Por outro lado, são menos estáveis geneticamente (Freshney, 2000).

Trabalhos realizados com células de melanoma murino S91 sugerem que estas permanecem praticamente estáveis quando utilizadas até a décima passagem (Kadekaro, Andrade *et al.*, 2004). Entretanto, observações mais

acuradas revelaram uma população heterogênea no tocante à regulação do volume celular. As células S91 até a décima passagem não perdem sua capacidade de regular o volume frente a um choque hiposmótico agudo, porém, a análise célula a célula mostrou um comportamento peculiar em relação à regulação de volume (Perci-Lima, 2005). No presente trabalho, a fim de evitar qualquer problema desta natureza, utilizamos células até a quinta passagem. Além disso, ao fim de cada experimento, algumas gotas de “Trypan Blue” foram adicionadas e observamos que as células mantinham-se viáveis e com capacidade de regulação de volume.

Sob o ponto de vista de regulação de volume, quaisquer mudanças no volume de uma célula animal submetidas a condições anisomóticas são, em princípio, baseadas em uma permeabilidade da membrana plasmática para a água. Em muitas instâncias, esta permeabilidade é aumentada por proteínas especializadas de membrana, as quais medeiam a difusão facilitada de água, chamadas canais para água ou aquaporinas (Maunsbach, Marples *et al.*, 1997; Ma e Verkman, 1999). Dada uma permeabilidade para água um pouco maior na sua membrana externa, a célula então exibe um comportamento osmométrico como resposta primária a anisomotividade, ou seja, um movimento de água irá ocorrer, modificando o volume celular até que a diferença na concentração osmótica seja equalizada e um novo equilíbrio químico para a água através da membrana plasmática seja alcançado. Em células S91, tanto em choques hiposmóticos (Perci-Lima, 2000) quanto em choques hiperosmóticos (Macfadem, 2002) nas diferentes concentrações osmóticas estudadas, as alterações de volume indicam um comportamento muito próximo ao de um “osmômetro”, podendo ser descrito por uma função linear do tipo $y = ax + b$; onde **y** corresponde ao volume relativo, **x** à concentração osmótica relativa e **a** ao coeficiente angular. O valor de **b**, ponto de intersecção da reta com o eixo de y indica o volume celular osmoticamente inativo, isto é, o volume dos componentes estruturais (proteínas).

Um aspecto que merece consideração na análise das alterações de volume durante choques osmóticos, particularmente hiposmóticos, é o aumento da superfície celular aparente em valores superiores à capacidade elástica da bicamada fosfolipídica, que está na ordem de 3-7% (Nichol e Hutter, 1996). Dessa forma, uma questão intrigante no estudo de células submetidas a

choques hiposmóticos é saber como elas resistem a aumento de volume que chegam a 50%, sem que ocorra lise. Alguns estudos sugerem que fragmentos de membrana, originados de estoques intracelulares, presentes no citosol, poderiam ser incorporados à membrana plasmática e, durante o murchamento os excessos de membrana seriam reinternalizados (Sukhorukov, Arnold *et al.*, 1993; Mills e Morris, 1998). Em neurônios de moluscos submetidos a choques hiposmóticos, observou-se que a membrana em contato com o substrato sofreu invaginações, formando vacúolos denominados VLDs (“vacuole-like dilatations”), e poderiam indicar a fase inicial de recuperação do volume. Esses vacúolos são posteriormente reinternalizados, completando o processo de regulação de volume (Daí *et al.*, 1998).

Como foi dito no capítulo 1, a regulação de volume em células de melanoma murino S91 tem sido alvo de estudos no nosso laboratório. A figura 4.1 resume as principais vias de transporte em membranas presentes nestas células, durante a regulação de volume, quando expostas a condições anisomóticas.

Figura 4.1. Modelo esquemático dos transportadores de membrana envolvidos nos fenômenos de RVD (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11) e RVI (1, 6, 8, 9, 10) proposto para células de melanoma murino S91 (Perci-Lima, 2005).

Outro fato investigado nestas células foi a correlação entre regulação de volume e proliferação celular, demonstrando que a taxa de proliferação sofreu redução quando estas células foram mantidas em meios de cultura anisomóticos. O mesmo aconteceu quando ao meio de cultura foram adicionados determinados bloqueadores de canais iônicos (Pergher, 2004). Além disso, não houve um aumento na concentração de cálcio durante a RVD, detectável pelas técnicas utilizadas; porém, o bloqueio de canais para cálcio impediu a RVD, indicando a necessidade do influxo deste durante o choque hiposmótico, mesmo de maneira reduzida e localizada (Perci-Lima, 2005).

Todos estes resultados foram muito significativos, uma vez que em células de melanoma murino S91 não existiam dados sobre a regulação de volume. Entretanto, aspectos sobre o transporte de água em células de melanoma murino S91 submetidas a condições anisomóticas não haviam sido explorados. Uma vez que a coleta dos resultados anteriores, tais como mostrado na Figura 4.1, foi realizado em temperatura ambiente, a primeira pergunta que surgiu foi sobre a influência da temperatura na regulação de volume destas células em condições anisomóticas.

A concentração osmótica das células de melanoma murino S91, em condições isomóticas é de $290 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$. Os choques hiposmóticos e hiperosmóticos foram, respectivamente, 190 e $350 \text{ mOsm.kgH}_2\text{O}^{-1}$, pois representam os extremos da faixa de regulação de volume destas células (Perci-Lima, 2000; MacFadem, 2002).

Nossos resultados indicaram uma clara dependência do tempo de RVD e de RVI em relação à temperatura em células de melanoma murino S-91, sendo que a 17°C , estas células não apresentaram regulação de volume ao longo do experimento.

Admite-se, para uma grande variedade de tipos celulares, que o inchamento celular leva a ativação de canais para K^+ e ânions (O'Neill, 1999). O movimento de tais íons através da membrana celular é ditado pelos respectivos gradientes eletroquímicos. Como para a maioria dos tipos celulares, o gradiente eletroquímico do K^+ é dirigido para fora da célula, a ativação de canais para potássio e/ou do cotransporte $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ ocasiona o efluxo do K^+ celular e o efluxo acoplado de água. Por outro lado, o cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ é ativado pelo murchamento celular em uma grande variedade de células,

podendo ser efetivo sozinho ou em cooperação com o permutador Na^+/H^+ (Lang, Ritter *et al.*, 1993; O'Neill, 1999). A principal desvantagem do cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ como sistema regulador de volume é sua pequena força motriz, que pode ser facilmente dissipada por alterações moderadas nas atividades intra e extracelulares dos íons (Lang, Ritter *et al.*, 1993).

Se admitirmos que os bloqueadores testados agem sobre diversos mecanismos de transporte em membranas e que o volume de uma célula deve ser considerado como uma função da permeabilidade plasmática a todos os solutos osmoticamente ativos pertinentes e às forças resultantes de entrada e/ou saída destes solutos, então o bloqueio de um único mecanismo de transporte não pode explicar os resultados observados na Figura 4.1.

Desta forma, podemos sugerir que para estas células, expostas a choques hiposmóticos, a temperatura está agindo também na dinâmica dos canais para potássio, cloreto e cálcio, além do cotransporte K^+-Cl^- que são os primeiros tipos de transporte em membranas que agem frente a este estresse osmótico. Do mesmo modo, para o choque hiperosmótico, a temperatura está agindo sobre o cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$; os permutadores Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e a $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$. No caso de células expostas a condições isosmóticas em diferentes temperaturas não observamos nenhuma mudança significativa de volume. Nestas condições, a $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ parece não ser alterada para as temperaturas de 37 a 17 °C. Todos estes fatos estão relacionados como o fato de que, para células de animais homeotermos, como é o caso das células S91, os componentes do transporte passivo e ativo dependem da temperatura para funcionar, por completo, nos mecanismos de regulação de volume destas células.

É geralmente aceito que a água atravessa a membrana celular através de duas diferentes vias: a bicamada lipídica ou canais específicos para água (aquaporinas) (Diamond, 1979; Finkelstein, 1987; Agre, Sasaki *et al.*, 1993; Nielsen e Agre, 1995; Parisi, Amodeo *et al.*, 1997; Ma e Verkman, 1999). Um terceiro mecanismo possível tem sido proposto para explicar o fluxo de água associado com os cotransportadores K^+-Cl^- ou Na^+ -glicose (Zeuthen, 1994; Zeuthen, Meinild *et al.*, 1997). Ao longo desta linha, tem sido reportado que CFTR, um canal para Cl^- , pode também funcionar como um canal para água (Hasegawa, Skach *et al.*, 1992; Schreiber, Greger *et al.*, 1997).

Tanto os dados de condutividade hidráulica da membrana quanto os de energia de ativação para as células S91 revelam a presença de canais para água. Desse modo, o próximo passo da pesquisa foi investigar o mecanismo de ação das aquaporinas na regulação de volume em células de melanoma murino. Para isso, o HgCl_2 , um bloqueador para aquaporinas (AQP) foi escolhido. Com exceção de algumas toxinas cujo efeito como bloqueadores parece ser altamente específico a determinados tipos de transportadores (Hille, 1992), os demais são moderadamente específicos, ou seja, bloqueiam mais eficiente alguns mecanismos que outros. Esta eficiência parece abranger mecanismos de transporte para um mesmo soluto. Uma dificuldade adicional que não deve ser negligenciada é o fato de que não se conhece a maior parte das isoformas e seu funcionamento ao longo da escala filogenética. Canais para água não fogem desta regra e, até o momento, nenhuma toxina mostrou-se ser capaz de bloquear tais canais.

As doses de HgCl_2 em soluções anisomóticas para as células S91 foram baseadas, *a priori*, em estudos com timócitos de ratos (Kurbannazarova, Tashmukhamedov *et al.*, 2003), em que os autores utilizaram quatro doses (0,1; 1; 10 e 100 μM) de HgCl_2 e concluíram que a permeabilidade à água apresentava um efeito bimodal, ou seja, era inibida em doses baixas e restaurada (ou mesmo aumentada) em doses altas. Nossos resultados mostraram-se muito semelhantes com os encontrados em timócitos de ratos. Assim, resolvemos expandir as doses a fim de obter uma visão mais clara sobre o efeito deste bloqueador nestas células submetidas a condições anisomóticas.

Os dados mostraram que, quando as células S91 são expostas a choques anisomóticos na presença de HgCl_2 , não houve grandes diferenças em relação aos controles (0,001 e 0,01 μM); não houve alterações significativas de volume no tempo do experimento (0,1 e 1 μM); e houve progressivo retardo no tempo necessário para a ocorrência das alterações máximas de volume e de regulação do mesmo em relação aos controles (5, 10, 100 e 1000 μM). Estes dados indicam que o principal transporte de água é através de aquaporinas, uma vez que em 0,001 e 0,01 μM HgCl_2 a permeabilidade à água foi completamente inibida. Além disso, o HgCl_2 afeta de forma dose dependente

as respostas osmóticas em células de melanoma murino S91 e sugerem a presença de mais de um tipo de AQP.

As evidências experimentais sobre o comportamento osmótico de células de melanoma murino S91, seu transporte de água e seus mecanismos regulatórios de volume são intrigantes, mas longe de ser conclusivos. Contudo, algumas propostas podem ser feitas visando um prosseguimento deste trabalho.

Um primeiro passo seria observar que tipos de aquaporinas as células de melanoma murino S91 expressam quando são expostas a condições iso e anisomóticas. Tal fato torna-se relevante, pois diversos trabalhos (Saadoun, Papadopoulos *et al.*, 2005; Verkman, 2006; Wang, Feng *et al.*, 2006; Mints, Hildenbrand *et al.*, 2007; Wakayama, 2007) tem mostrado que AQP1 está relacionada com a proliferação celular e a angiogênese. Os mecanismos de regulação de volume celular estão implicados na proliferação de células S91 (Pergher, 2004). Se a AQP1, uma isoforma que é sensível a HgCl_2 , estiver presente nestas células é possível que ela seja um fator determinante neste processo. Este fato traria não só a elucidação deste fenômeno, mas também seria um passo a mais em novas perspectivas para o tratamento deste tumor, bem como outros tumores relacionados, uma vez que as aquaporinas estão representadas em todos os reinos e em todas as espécies.

As AQPs podem ser alvos potenciais de drogas para não somente novos reagentes diuréticos para várias formas de retenção patológica da água, mas também alvos para novas terapias do edema do cérebro, doenças inflamatórias, glaucoma, obesidade, e câncer. Entretanto, os potentes moduladores de AQP para a aplicação *in vivo* permanecem desconhecidos (Wang, Feng *et al.*, 2006). Neste sentido, um melhor entendimento dos processos de regulação de volume e proliferação em células S91 poderia levar a descoberta de algum modulador potente e não tóxico para ser aplicado no camundongo que originou este tipo de tumor.

4.2 Referências Bibliográficas

Agre, P., S. Sasaki, *et al.* Aquaporins: a family of water channel proteins. Am J Physiol, v.265, n.3 Pt 2, Sep, p.F461. 1993.

Diamond, J. M. Osmotic water flow in leaky epithelia. J Membr Biol, v.51, n.3-4, Dec 31, p.195-216. 1979.

Finkelstein, A. Water movements through lipid bilayers, pores and plasma membranes: theory and reality. New York: Wiley. 1987

Freshney, I. R. Culture of animal cells - a manual of basic technique. New York: Wiley-Liss. 2000

Hasegawa, H., W. Skach, *et al.* A multifunctional aqueous channel formed by CFTR. Science, v.258, n.5087, Nov 27, p.1477-9. 1992.

Kadekaro, A. L., L. N. Andrade, *et al.* MT-1 melatonin receptor expression increases the antiproliferative effect of melatonin on S-91 murine melanoma cells. J Pineal Res, v.36, n.3, Apr, p.204-11. 2004.

Kurbannazarova, R. S., B. A. Tashmukhamedov, *et al.* Osmotic water permeability and regulatory volume decrease of rat thymocytes. Gen Physiol Biophys, v.22, n.2, Jun, p.221-32. 2003.

Lang, F., M. Ritter, *et al.* The biological significance of cell volume. Ren Physiol Biochem, v.16, n.1-2, Jan-Apr, p.48-65. 1993.

Liotta, L. A., R. Guirguis, *et al.* Biology of melanoma invasion and metastasis. Pigment Cell Res, v.1, n.1, p.5-15. 1987.

Ma, T. e A. S. Verkman. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. J Physiol, v.517 (Pt 2), Jun 1, p.317-26. 1999.

Macfadem, S. R. M. Regulação de volume em células de melanoma murino, linhagem S-91: aumento regulatório de volume (RVI). Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia para obtenção do título de mestre, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002. 81 p: il p.

Maunsbach, A. B., D. Marples, *et al.* Aquaporin-1 water channel expression in human kidney. J Am Soc Nephrol, v.8, n.1, Jan, p.1-14. 1997.

Mills, L. R. e C. E. Morris. Neuronal plasma membrane dynamics evoked by osmomechanical perturbations. J Membr Biol, v.166, n.3, Dec 1, p.223-35. 1998.

Mints, M., A. Hildenbrand, *et al.* Expression of aquaporin-1 in endometrial blood vessels in menorrhagia. Int J Mol Med, v.19, n.3, Mar, p.407-11. 2007.

Nichol, J. A. e O. F. Hutter. Tensile strength and dilatational elasticity of giant sarcolemmal vesicles shed from rabbit muscle. J Physiol, v.493 (Pt 1), May 15, p.187-98. 1996.

Nielsen, S. e P. Agre. The aquaporin family of water channels in kidney. Kidney Int, v.48, n.4, Oct, p.1057-68. 1995.

O'Neill, W. C. Physiological significance of volume-regulatory transporters. Am J Physiol, v.276, n.5 Pt 1, May, p.C995-C1011. 1999.

Parisi, M., G. Amodeo, *et al.* Biophysical properties of epithelial water channels. Biophys Chem, v.68, n.1-3, Oct, p.255-63. 1997.

Perci-Lima, R. D. Regulação de volume em células de melanoma murino, linhagem S-91: participação de canais iônicos e do citoesqueleto. Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia para obtenção do título de mestre, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. 69 p p.

_____. Participação do cálcio na regulação de volume em células de melanoma murino, linhagem S-91. Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia para obtenção do título de doutor, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. iii, 104 p: il p.

Pergher, P. S. Regulação de volume em células de melanoma murino: correlação entre concentração osmótica, volume e proliferação celular. Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia para obtenção do título de mestre, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. 73 p: il p.

Peter, I., A. Mezzacasa, *et al.* Comparative analysis of immunocritical melanoma markers in the mouse melanoma cell lines B16, K1735 and S91-M3. Melanoma Res, v.11, n.1, Feb, p.21-30. 2001.

Saadoun, S., M. C. Papadopoulos, *et al.* Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. Nature, v.434, n.7034, Apr 7, p.786-92. 2005.

Schreiber, R., R. Greger, *et al.* Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates water conductance in *Xenopus* oocytes. Pflugers Arch, v.434, n.6, Nov, p.841-7. 1997.

Sukhorukov, V. L., W. M. Arnold, *et al.* Hypotonically induced changes in the plasma membrane of cultured mammalian cells. J Membr Biol, v.132, n.1, Feb, p.27-40. 1993.

Verkman, A. S. Aquaporins in endothelia. Kidney Int, v.69, n.7, Apr, p.1120-3. 2006.

Wakayama, Y. Skeletal muscle regeneration may be enhanced by overexpression of aquaporin 1 in intramuscular capillary endothelial cells. Med Hypotheses, v.68, n.4, p.856-9. 2007.

Wang, F., X. C. Feng, *et al.* Aquaporins as potential drug targets. Acta Pharmacol Sin, v.27, n.4, Apr, p.395-401. 2006.

Yasumura, Y., A. Tashjian Jr., *et al.* Establishment of four functional clonal strains of animal cells in culture. Science, v.154, p.1186-1189. 1966.

Zeuthen, T. Cotransport of K⁺, Cl⁻ and H₂O by membrane proteins from choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus*. J Physiol, v.478 (Pt 2), Jul 15, p.203-19. 1994.

Zeuthen, T., A. K. Meinild, *et al.* Water transport by the Na⁺/glucose cotransporter under isotonic conditions. Biol Cell, v.89, n.5-6, Aug, p.307-12. 1997.

APÊNDICE

A descoberta das aquaporinas

Até 1986, canais para água não tinham sido detectados, isolados ou localizados. Macey e Moura, em 1986, detectaram, pela primeira vez, uma proteína de canal para água na membrana de eritrócitos humanos, porém eles não conseguiram isolá-la e nem purificá-la.

A descoberta da proteína de membrana integral de 28 kDa em eritrócitos e túbulos renais (Denker, Smith *et al.*, 1988) finalizou as controvérsias sobre a possível existência de canais moleculares para água. A proteína, agora conhecida como aquaporina 1 (AQP 1), foi primeiro purificada de membranas de eritrócitos e encontrada por existir como um tetrâmero com N- e C-terminal intracelular – uma organização similar a diversas proteínas de canais para íons (Smith e Agre, 1991). A sequência primária de cDNA revelou duas repetições seguidas, cada uma contendo três segmentos α -hélices transmembrânicos (Preston e Agre, 1991). As alças contendo o segundo e terceiro segmento transmembrânicos em cada repetição continham diversos resíduos altamente conservados e a assinatura principal, asparagina-prolina-alanina (NPA). As bases de dados genéticos até aquele momento apresentavam um pequeno número de proteínas homólogas de uma curiosa variedade de achados, incluindo objetiva bovina, cérebro de *Drosophila*, bactérias e plantas, mas as funções eram amplamente desconhecidas. Além disso, a possibilidade de transporte de água não tinha, aparentemente, sido considerada (Agre e Kozono, 2003).

Dada sua distribuição em tecidos altamente permeáveis à água e a existência de proteínas de sequências relacionadas em plantas, a possibilidade que a proteína de 28 kDa poderia conferir permeabilidade à água quando expressada em ovócitos de *Xenopus laevis* que normalmente tem baixa permeabilidade à água. Quando transferidos para um tampão hiposmótico, os cRNA injetados de ovócitos contendo a proteína de 28 kDa foram encontrados por

terem aumentado a permeabilidade à água, causando inchamento e estouro das células (Preston, Carroll *et al.*, 1992). A permeabilidade à água foi reversivelmente inibida por Hg^{2+} , exibindo baixa energia de ativação, e não foi acompanhada pelas correntes de membrana. Além disso, a proteína de 28 kDa purificada de eritrócitos foi reconstituída dentro de vesículas lipídicas que exibiram as mesmas propriedades. A permeabilidade à água foi encontrada por ser extremamente alta, $\sim 3 \cdot 10^9$ moléculas por segundo, enquanto que o transporte de outros solutos ou íon (incluindo prótons) foi desprezível (Van Hoek e Verkman, 1992; Zeidel, Ambudkar *et al.*, 1992). Notavelmente, os estudos em ovócitos e membranas reconstituídas confirmaram que membranas simples exibem baixa permeabilidade à água, mas a permeabilidade à água de membranas contendo AQP1 foi aumentada mais de 100 vezes. Ambos os sistemas demonstram que o movimento de água representa uma difusão facilitada com a força motriz determinada pelos gradientes osmóticos. Assim, ambos os lados neste debate de longa duração chegaram num acordo de que o transporte de água através da membrana plasmática poderia ser por simples difusão ou por hipotéticos canais para água (Agre e Kozono, 2003).

A forma ampulheta das aquaporinas

Sob diferentes estímulos fisiológicos, a água pode ser absorvida ou liberada pelas células. Assim, a arquitetura molecular para um transportador seletivo à água deve explicar essa bi-direcionalidade do processo. A sensibilidade do transporte de água ao mercúrio indica a existência de sulfidrila livre dentro da proteína de canal para água, a qual é bloqueada pela reação com um íon Hg^{2+} e restabelecida por agentes reducionais. A sequência primária do aminoácido de AQP1 contém quatro cisteínas, mas apenas uma (C189) confere sensibilidade ao mercúrio, sugerindo que ela pode residir dentro do canal (Preston, Jung *et al.*, 1993). A prognostica topologia das duas seqüências repetidas primeiro indicou que duas alças contendo a assinatura NPA numa subunidade AQP1 residem sobre superfícies opostas da bicamada lipídica (Smith e Agre, 1991). Estudos

mutagênicos direcionados do sítio refinam mais a topologia (Preston, Jung *et al.*, 1994), levando ao “modelo ampulheta” uma pseudo-estrutura simétrica de duas dobras com seis segmentos α -hélices transmembrânicos ao redor do canal formado a partir das duas alças contendo a assinatura NPA que entram na bicamada da superfície oposta e sobrepõe à junção das duas NPA principais (Jung, Preston *et al.*, 1994).

A estrutura da AQP1 foi estabelecida pela reconstituição da proteína purificada a altas concentrações dentro da bicamada lipídica sintética. A exibição dos resultados simétricos de proteínas é referida como cristais de membrana. Esta aproximação permitiu a demonstração funcional que a permeabilidade à água foi inteiramente preservada, indicando que a deduzida estrutura representa o estado fisiológico da proteína (Walz, Smith *et al.*, 1994).

Referências Bibliográficas

Agre, P. e D. Kozono. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. FEBS Lett, v.555, n.1, Nov 27, p.72-8. 2003.

Denker, B. M., B. L. Smith, *et al.* Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. J Biol Chem, v.263, n.30, Oct 25, p.15634-42. 1988.

Jung, J. S., G. M. Preston, *et al.* Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. J Biol Chem, v.269, n.20, May 20, p.14648-54. 1994.

Macey, R. I. e T. Moura. Water channels. Methods in enzymology. 1986. 598-609 p.

Preston, G. M. e P. Agre. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.24, Dec 15, p.11110-4. 1991.

Preston, G. M., T. P. Carroll, *et al.* Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. Science, v.256, n.5055, Apr 17, p.385-7. 1992.

Preston, G. M., J. S. Jung, *et al.* The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. J Biol Chem, v.268, n.1, Jan 5, p.17-20. 1993.

_____. Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis. J Biol Chem, v.269, n.3, Jan 21, p.1668-73. 1994.

Smith, B. L. e P. Agre. Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. J Biol Chem, v.266, n.10, Apr 5, p.6407-15. 1991.

Van Hoek, A. N. e A. S. Verkman. Functional reconstitution of the isolated erythrocyte water channel CHIP28. J Biol Chem, v.267, n.26, Sep 15, p.18267-9. 1992.

Walz, T., B. L. Smith, *et al.* Biologically active two-dimensional crystals of aquaporin CHIP. J Biol Chem, v.269, n.3, Jan 21, p.1583-6. 1994.

Zeidel, M. L., S. V. Ambudkar, *et al.* Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. Biochemistry, v.31, n.33, Aug 25, p.7436-40. 1992.