

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITOS BIOLÓGICOS DO AMILORIDE EM *HERPETOMONAS*
SAMUELPESSOAI: EVIDÊNCIA DA PRESENÇA DO ANTIPORTE Na^+/H^+

Carla Pataro

BELO HORIZONTE
1994

CARLA PATARO

EFEITOS BIOLÓGICOS DO AMILORIDE EM *Herpetomonas samuelpessoai*:
EVIDÊNCIA DA PRESENÇA DO ANTIPOORTE Na^+/H^+

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Artur da Silveira Pinto.
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais.

BELO HORIZONTE
1994

Aos meus pais, PAULO e AMÉLIA, pelo apoio, compreensão e carinho em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Artur da Silveira Pinto pela orientação, incentivo e amizade demonstrados durante a realização desta dissertação.
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, nas pessoas do ex-coordenador Dr. Eduardo Osório Cisalpino e atual Dr. Paulo César Peregrino Ferreira, pelas facilidades recebidas para a execução deste trabalho.
- Aos professores do Departamento de Microbiologia, na pessoa de sua chefe Dra. Maria de Lourdes Petrillo Peixoto, pela colaboração e apoio.
- A todos os colegas do Curso de Mestrado em Microbiologia, pela agradável convivência e, em especial à Elizabeth Fonseca dos Reis.
- Ao pessoal técnico e administrativo, nas pessoas de Manuela Enéas Sofonoff, Maria Cristina de A. Prado, Maria Cecília de S. Lima, Évano L. Nascimento e Marli Alves dos Santos (*in memoriam*), pela dedicação e qualificada cooperação.
- Aos professores e colegas do Laboratório de Biologia Molecular e do Laboratório de Fermentação, Dra. Maria de Lourdes P. Peixoto, Dra. Elizabeth Spangler A. Moreira, Dr. Valter Roberto Linardi, Dr. Carlos Augusto Rosa, Kênia, Juliana, Carla, Sérgio, Paulo, Diana, Leila, Fabiana, Marianne e Newton, pela cooperação e agradável ambiente de trabalho.
- Aos colegas do Laboratório de Fisiologia de Tripanosomatídeos, Adriana, Cláudia, Liliana, Marcos, Ernanda e Luíz Fernando, pelo auxílio prestado, carinho e amizade.
- À Christiane Furlani, pela inestimável ajuda prestada na digitação e impressão desta dissertação e, sobretudo, pela amizade.
- Às instituições financiadoras desta dissertação: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) da Universidade Federal de Minas Gerais.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	01
MATERIAIS E MÉTODOS	08
- Microrganismo	08
- Meio de cultura empregado e manutenção da amostra	08
- Preparo do meio de cultura	08
- Determinação do pH.....	12
- Inóculo.....	12
- Avaliação do crescimento.....	12
- Experiências de crescimento.....	13
- Experiências de diferenciação celular.....	13
- Determinação da diferenciação celular.....	13
- Observação.....	14
- Lavagem da vidraria	14
- Procedência das drogas	15
RESULTADOS.....	16
DISCUSSÃO	33
RESUMO	38
SUMMARY.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

INTRODUÇÃO

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida (HONIBERG et al., 1964). São caracterizados por possuírem uma única mitocôndria que percorre toda extensão da célula, na qual se localiza o cinetoplasto, composto por uma rede de fibras circulares de DNA, unidas entre si (HOARE & WALLACE, 1966; CAMARGO, 1979). Encontram-se comumente parasitando animais invertebrados, vertebrados e plantas (VICKERMAN, 1976). Dentre os membros da família Trypanosomatidae, os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são constituídos de protozoários digenéticos de vertebrados e insetos (CAMARGO, 1979) e são os que mais despertam interesse em medicina humana e veterinária (CANÇADO, 1968). Os graves problemas implicados nas doenças causadas por algumas espécies destes gêneros, tem atraído o interesse de um grande número de pesquisadores para o estudo da biologia dos membros da família Trypanosomatidae. Entre estes incluem-se não só os que se dedicam aos problemas de ordem prática relativos ao controle das tripanosomíases, mas também os voltados para os problemas biológicos de interesse mais geral, que vão desde os estudos filogenéticos até os relacionados com a ultra-estrutura e biologia molecular.

Herpetomonas samuelpessoai é um tripanosomatídeo monogenético de invertebrados, não patogênico, isolado do hemíptero *Zelus leucogrammus* por GALVÃO et al. (1970) e assim denominado por ROITMAN et al. (1976) após clonagem e estudo da sua morfologia e fisiologia.

O ciclo evolutivo apresentado pelos protozoários do gênero *Herpetomonas* Kent, 1880, observado em cultivo ou no inseto hospedeiro, é constituído de três formas de diferenciação celular: promastigota, paramastigota e opistomastigota. Estas denominações referem-se à posição do cinetoplasto (material rico em ácido

desoxirribonucléico) nas regiões anterior, lateral ou posterior ao núcleo do flagelado, respectivamente.

ROITMAN et al. (1972), demonstraram que este microrganismo pode ser cultivado tanto em meio complexo como em meio quimicamente definido a 28°C ou 37°C. Em cultura a 28°C, *H. samuelpeessoai* apresenta predominantemente formas promastigotas nas 24 horas iniciais de crescimento. Porém, após 96 horas de inoculação, as células diferenciam-se em formas paramastigotas e opistomastigotas.

Diversos procedimentos têm sido usados para aumentar o índice de diferenciação celular deste microrganismo, tais como: mudanças nas condições de cultivo e a adição no meio de cultura de substâncias inibidoras do crescimento. Com relação às mudanças nas condições de cultivo, ROITMAN et al. (1976) demonstraram uma indução no processo de diferenciação do flagelado pelo aumento da temperatura de incubação. Estes autores obtiveram uma maior porcentagem (cerca de 34% das células) de formas diferenciadas opistomastigotas pelo cultivo a 37°C durante 72 horas. Várias drogas, quando adicionadas ao meio de cultivo, são capazes de induzir a diferenciação de formas promastigotas em formas paramastigotas e opistomastigotas em *H. samuelpeessoai*, incluindo: 2-deoxi-d-glicose (ANGLUSTER et al., 1977), concanavalina A (DE SOUZA et al., 1980), dimetil sulfóxido (CASTELLANOS et al., 1981), lidocaína (THOMAS et al., 1981a), drogas colinérgicas (THOMAS et al., 1981b) e azul de metileno (CASTELLANOS et al., 1985).

A distribuição ubiqüitária de fluxo iônico celular através da membrana plasmática e a forma como foi conservado durante a evolução, sugerem seu envolvimento em várias atividades celulares, tais como: comunicação inter e intra celular, divisão celular, morfogênese e diferenciação celular (HAROLD, 1977).

Uma questão central na análise da diferenciação e proliferação de células eucarióticas diz respeito à natureza do sinal envolvido na ativação desses processos. Alterações no fluxo de íons através da membrana é um dos eventos mais precoces detectáveis em diferentes tipos de células animais quando essas são estimuladas à

proliferação e à diferenciação (KAPLAN, 1978; ROZENGURT & MENDOZA, 1980). TOBACK (1980) demonstrou que o aumento na concentração de cloreto de sódio no meio de cultivo de células renais (linhagem BSC-1) leva à iniciação da síntese de DNA e à proliferação celular. KOCH & LEFFERT (1979) através de estudos em hepatócitos e PARIS & POUYSSÉGUR (1983) em fibroblastos, observaram que o aumento do influxo do íon sódio (Na^+), após a adição de fatores de crescimento no meio de cultivo, é o sinal mais precoce para proliferação destas células.

O aumento considerável do influxo de Na^+ em condições de proliferação foi também verificado em fibroblastos por MOOLENAAR et al. (1984). Estes autores demonstraram que este aumento do influxo de Na^+ é sempre acompanhado por um aumento do pH intracelular. Foi sugerido para explicar esse fenômeno a atuação do sistema antiporte Na^+/H^+ o qual foi originalmente identificado em células renais por MURER et al. (1976).

O antiporte Na^+/H^+ é uma proteína de transporte associada à membrana plasmática responsável pela troca de Na^+ por H^+ . Este sistema de transporte iônico parece ser ubiqüitário, pois já foi identificado em uma grande variedade de células, incluindo: células animais (células musculares, VIGNE et al., 1982; fibroblastos, PARIS & POUYSSÉGUR, 1983; linfócitos, GRINSTEIN et al., 1984; células renais, WEINMAN & SHENOLIKAR, 1993), células vegetais (BLUMWALD & POOLE, 1985; BLUMWALD et al., 1987; GARBARINO & DUPONT, 1988; BARKLA & BLUMWALD, 1991), leveduras como *Saccharomyces* sp. (JIA et al., 1992 e 1993), algas como *Dunaliella salina* (KATZ et al. 1994) e células procarióticas como *Escherichia coli* (THELEN et al., 1991; PINNER et al., 1993; INABA et al., 1994; PADAN & SCHULDINER, 1994).

O antiporte Na^+/H^+ parece desempenhar um papel central na regulação do pH intracelular, pois a ativação desse sistema é acompanhada pelo efluxo de H^+ e pelo influxo de Na^+ levando a alcalinização do citoplasma através da remoção do excesso de H^+ produzido nas reações metabólicas da célula (MOOLENAAR, 1986; GRINSTEN

et al., 1989). Fibroblastos mutantes de hamster chinês deficientes neste antiporte (POUYSSÉGUR et al., 1984), são incapazes de proliferar em pH neutro e ácido, porém crescem normalmente em pH básico.

Além da função de regular o pH intracelular, o antiporte Na^+/H^+ parece estar envolvido na regulação de várias funções celulares, tais como: volume, proliferação e diferenciação celular (KAPLAN, 1978; ROZENGURT & MENDOZA, 1980; BENOS, 1982; PARIS & POUYSSÉGUR, 1984; GRINSTEIN et al., 1989; CARACCILO et al., 1990; LIVNE & HOFFMANN, 1990; CHAUHAN et al., 1991).

Vários trabalhos foram desenvolvidos a fim de caracterizar bioquímica e funcionalmente este antiporte em uma grande variedade de tipos celulares. A partir desses estudos foi verificado que o amiloride (3,5-diamino-6-cloro-N-(diaminometileno) pirazinacarboxamida) e seus análogos inibem especificamente o antiporte Na^+/H^+ (KLEYMAN et al., 1975; WARNOCK et al., 1988). A adição desta droga em diferentes sistemas celulares provoca alterações nas funções fisiológicas reguladas pelo antiporte Na^+/H^+ , como por exemplo a inibição da proliferação celular, bloqueio da diferenciação, incapacidade de regular o volume celular e de restaurar o pH intracelular após acidificação do citoplasma (LEVENSON et al., 1980; BENOS, 1982; MOOLENAAR et al., 1984; L'ALLEMAIN et al., 1984a e 1984b; FRELIN et al., 1985; OLSNES et al., 1986; HELBIG et al., 1988; LANNIGAN et al., 1988; BROWN et al., 1990; DELVAUX et al., 1990; CARACCILO et al., 1990; SILVER et al., 1992; COUNILLON et al., 1993; ALLIEGRO et al., 1993).

Pela caracterização bioquímica do antiporte Na^+/H^+ sensível ao amiloride foi demonstrado que este sistema apresenta estequiometria 1:1 para a troca Na^+/H^+ (eletroneutro) podendo funcionar nas duas direções dependendo do gradiente de Na^+ e H^+ através da membrana, isto é, da concentração de Na^+ e do pH intracelular e extracelular (ARONSON et al., 1982; PARIS & POUYSSÉGUR, 1983; GREEN et al., 1988; WALL et al., 1988). Segundo este modelo, na face interna, existe dois sítios de ligação para o H^+ , um sítio de transporte e um sítio regulador. A ligação do H^+ no sítio

regulador ativa o antiporte por aumentar a afinidade do sítio de transporte pelo H^+ . O Na^+ e Li^+ podem competir com o H^+ pelo mesmo sítio transportador. A face externa do antiporte possui um único sítio de ligação para o Na^+ sendo que o H^+ , o Li^+ e o amiloride competem com o Na^+ extracelular para ligar no mesmo sítio. Adicionalmente, foi observado que o amiloride inibe competitivamente o influxo de Na^+ por se ligar no mesmo sítio desse cátion. Ao contrário das observações descritas por esses autores, WARNOCK et al. (1988) demonstraram que em células renais (LLC-PK1) o amiloride inibe o antiporte Na^+/H^+ de maneira não competitiva.

O antiporte Na^+/H^+ utiliza a energia provida pelo gradiente eletroquímico do Na^+ para efetuar a translocação do íon através da membrana plasmática. Esta troca não necessita diretamente da hidrólise de ATP para ocorrer, mas depende do nível de energia basal da célula pois o gradiente transmembrana do Na^+ é mantido pelo Na^+/K^+ ATPase. Assim, um estado basal de fosforilação do antiporte é requerido para execução de suas funções (COUNILLON & POUYSSÉGUR, 1993).

SARDET et al. (1990) demonstraram que o antiporte Na^+/H^+ de fibroblasto humano é uma glicoproteína de 110 KD (815 aminoácidos) que apresenta dez segmentos transmembrana terminados em uma longa sequência COOH-terminal hidrofóbica na face interna e que a glicoproteína encontra-se sob a forma fosforilada nas células em crescimento. TSE et al. (1993a), verificaram que a proteína do antiporte Na^+/H^+ pode apresentar de 715 a 831 aminoácidos, de 10 a 12 segmentos transmembrana e que as sequências N-terminal e C-terminal possuem diferentes funções. Essas diferenças na estrutura da proteína do antiporte foram observadas em recentes estudos de clonagem molecular que demonstraram a existência de, pelo menos, 4 isoformas do antiporte Na^+/H^+ em mamíferos, referidos como NHE-1, NHE-2, NHE-3 e NHE-4, que constituem uma família gênica. As isoformas NHE-2, 3 e 4 apresentam menor afinidade pelo amiloride, quando comparadas com a NHE-1. Diferentes formas do antiporte podem ser expressas numa mesma célula, porém em diferentes localizações ou existir uma única isoforma na célula. As isoformas NHE-2 e

NHE-3 são mais frequentemente expressadas em células do intestino delgado e do epitélio renal, o que indica uma maior especialização no transporte iônico (reabsorção de Na^+ e secreção de ácido). Já a isoforma NHE-4 é altamente expressada no trato gastrointestinal e parece estar envolvida com a regulação do pH estomacal (secreção de ácidos).

Nessas isoformas do sistema antiporte Na^+/H^+ cerca de 40-60% da sequência de aminoácidos são idênticas, demonstrando a existência de regiões altamente conservadas nestas proteínas. Essas regiões parecem estar envolvidas com a seletividade e transporte dos íons Na^+ e H^+ e com a organização do antiporte na membrana (TSE et al., 1992; COUNILLON & POUYSSÉGUR, 1993; ORLOWSKI, 1993; TSE et al., 1993b; BIEMESDERFER et al., 1993).

O objetivo desse trabalho é verificar o efeito do amiloride sobre o crescimento e diferenciação celular do tripanosomatídeo monogenético *Herpetomonas samuelpeessoai*, sob diferentes condições de cultivo em meio quimicamente definido, e relacionar os efeitos dessa droga com a presença do sistema antiporte Na^+/H^+ neste protozoário.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

No presente trabalho foi utilizado o tripanosomatídeo monogenético *Herpetomonas samuelpessoai* (ATCC 30252), isolado do inseto *Zelus leucogrammus* (GALVÃO et al., 1970) e caracterizado por ROITMAN et al. (1976).

Meio de Cultura Empregado e Manutenção da Amostra

Foi empregado o meio quimicamente definido de ROITMAN et al., (1972), conforme descrito na tabela 1, com pH ajustado em 6.5. A amostra foi mantida nesse meio, em tubos de 16x150 mm com tampa de rosca, contendo alíquotas de 5,0 ml e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Após o crescimento por 48 horas, a 28°C, as culturas foram mantidas sob refrigeração a 4°C em geladeira e submetidas a repiques semanais.

Preparo do Meio de Cultura

O preparo do meio quimicamente definido foi simplificado pelo emprego de misturas sólidas concentradas, dos vários grupos de componentes do meio definido. Sais de cálcio, magnésio, ferro e ácidos orgânicos foram reunidos em uma mistura, assim como as vitaminas, aminoácidos e elementos traços.

Tabela 1. Componentes do meio de cultura quimicamente definido para o cultivo de *Herpetomonas samuelpessoai* (ROITMAN et al., 1972).

Componentes	Concentração (g/l)
Sacarose	20,0
β -Glicerolfosfato Na.5H ₂ O	10,0
Aminoácidos (1)	2,3
Adenina	0,02
Ácido Fólico	0,002
Vitaminas (2)	0,1
Metais (3)	0,2
Base principal (4)	3,73
Hemina (equina tipo III) (5)	0,01
1) Aminoácidos	
L-Arginina HCl	0,4
L-Histidina (base livre)	0,3
L-Isoleucina	0,2
L-Leucina	0,2
L-Lisina HCl	0,2
L-Metionina	0,1
L-Fenilalanina	0,2
L-Treonina	0,2
L-Triptofano	0,1
L-Tirosina-etil-éster	0,2
L-Valina	0,2

.../

.../ Continuação da Tabela 1.

Componentes	Concentração (g/l)
2) Vitaminas	
Pantotenato de Cálcio	2×10^{-3}
Nicotinamida	2×10^{-3}
Riboflavina $\text{NaPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	12×10^{-4}
Tiamina.HCl	6×10^{-4}
Biotina	8×10^{-6}
Piridoxamina.2HCl	6×10^{-4}
3) Metais	
Fe (como $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	6×10^{-3}
Mn (como $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	5×10^{-3}
Cu (como CuSO_4 anidro)	4×10^{-4}
Zn (como $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5×10^{-3}
Mo (como $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	2×10^{-3}
V (como NH_4VO_3)	4×10^{-4}
Co (como $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1×10^{-4}
B (como H_3BO_3)	1×10^{-4}

.../

.../ Continuação da Tabela 1.

Componentes	Concentração (g/l)
4) Base Principal	
Citrato $K_3 \cdot H_2O$	1,0
Ácido cítrico. H_2O	0,5
Ácido málico	0,2
Ácido succínico	1,0
$MgCO_3$	1,0
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	0,01
$CaCO_3$	0,02

5) Hemina

Adicionada a partir de uma solução (10mg/ml) em trietanolamina 50% (2,2',2"-nitrilotrietanol).

As misturas foram homogeneizadas utilizando-se de um gral durante 2 horas, acondicionadas em frascos e estocadas em geladeira. Em misturas contendo concentrações muito reduzidas de substâncias, adicionou-se pentaeritritol para facilitar sua pesagem.

Determinação do pH

Nos experimentos realizados, o pH do meio de cultura foi ajustado para 6.5 ou 7.5 utilizando-se um potenciômetro modelo MICRONAL B374.

Inóculo

O inóculo utilizado para as experiências de crescimento e diferenciação celular, foi obtido a partir de culturas em meio quimicamente definido (TABELA 1), pH 6.5. Após o crescimento por 48 horas (fase exponencial) a 28°C, as células da cultura foram contadas e o inóculo padronizado em 1×10^6 flagelados/ml do meio. A concentração final de células estava contida em 0,1ml que foram adicionados em cada tubo utilizando-se pipeta com volume total de 1,0 ml.

Avaliação do Crescimento

A avaliação do crescimento foi feita pela contagem dos microrganismos utilizando-se uma câmara hematimétrica de Neubauer (Improved Double Neubauer Ruling). Antes das contagens, as células foram diluídas com Tampão Fosfato-Salina (pH 7.6) e imobilizadas com uma solução de formalina a 5%.

Experiências de Crescimento

Para a realização desses experimentos, diferentes concentrações de amiloride (1mM e 5mM), esterilizadas em filtro Millipore, foram adicionadas ao meio quimicamente definido com pH 6.5 ou 7.5, suplementado ou não com cloreto de sódio nas concentrações de 100mM e 200mM. Os diversos sistemas foram previamente esterilizados e distribuídos em tubos com tampa de rosca (16x150mm), com volume final de 2ml. Após inoculação do protozoário, os tubos foram incubados a 28°C e 37°C, em repouso, por um período de 96 horas. Em intervalos regulares de tempo (24 em 24 horas) o crescimento foi avaliado.

Experiências de Diferenciação Celular

A determinação dos estágios de diferenciação celular foi realizada paralelamente aos experimentos de crescimento, em intervalos regulares de tempo (24 em 24 horas) por um período de até 96 horas.

Determinação da Diferenciação Celular

A porcentagem das formas de diferenciação (promastigota, paramastigota e opistomastigota) foi determinada pela contagem das células em esfregaços corados pelo Giemsa, segundo modificação do método descrito por SIMPSOM & BRALY (1970). Uma amostra da cultura foi misturada em igual volume de uma solução de sacarose 0,25 M e albumina bovina, fração V a 1%. Em seguida, foram feitos esfregaços em lâminas de microscopia e deixados secar espontaneamente à temperatura ambiente. Posteriormente, foram fixados em metanol, por 10 minutos, hidrolisados com HCl 5N, por 15 minutos, (CARVALHO & DEANE, 1974) e, em seguida, as preparações foram tratadas com corante de Giemsa, por 30 minutos.

Após esse período de tempo, o excesso do corante foi retirado lavando-se as lâminas com água corrente. As lâminas coradas foram observadas com objetiva de imersão, utilizando-se um microscópio óptico binocular (Olympus CBA). Foram examinadas, pelo menos, 200 células em cada esfregaço. As células com cinetoplasto em posição anterior, lateral ou posterior ao núcleo foram referidas como promastigota, paramastigota e opistomastigota, respectivamente.

Observação

Todas as experiências foram realizadas três (3) vezes em duplicata.

Lavagem da Vidraria

Toda a vidraria utilizada no presente trabalho recebeu o seguinte procedimento de lavagem:

- tratamento a quente, em solução detergente;
- lavagem em água de torneira;
- tratamento com água fervente, por 30 minutos;
- lavagem exaustiva em água de torneira;
- lavagem com água destilada, e
- secagem e armazenamento em local isento de poeira.

Após esse procedimento, o material foi esterilizado em autoclave, a 121°C, por 20 minutos e secados a 80°C.

Procedência das Drogas

As substâncias utilizadas no presente trabalho foram provenientes dos seguintes laboratórios:

- Sigma Chemical Company - Sigma
- E. Merck Ag. Darmstad - Merck
- Mallinckrodt Chemical Works
- Divisione Chimica Industriale - Carlo Erba
- Química Fina Ltda. - Vetec
- Quimibrás Indústrias Químicas S.A. - Reagen

RESULTADOS

O efeito do amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpeessoai* quando cultivada em meio de cultura quimicamente definido, suplementado com 100mM e com 200mM de cloreto de sódio, pH 6.5 a 28°C, está mostrado nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente. Nestas condições de cultivo, a droga na concentração mais elevada (5mM), causou uma pequena inibição do crescimento do flagelado, tanto na presença como na ausência de cloreto de sódio. A elevação do pH do meio de cultura para 7.5, na mesma temperatura de incubação, proporcionou um significativo efeito inibitório da droga sobre o crescimento de *H. samuelpeessoai*, tanto na ausência como na presença de cloreto de sódio (Figuras 4, 5 e 6).

O cultivo do flagelado em presença do amiloride elevando-se a temperatura de incubação para 37°C e mantendo-se o pH do meio em 6.5, causou uma significativa inibição dose-dependente no crescimento do protozoário (Figura 7). Nestas condições a suplementação do meio de cultura com 100mM ou 200mM de cloreto de sódio potencializou significativamente o efeito inibitório do amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpeessoai* (Figura 8 e 9). A elevação concomitante do pH do meio de cultura e da temperatura de incubação proporcionou um acentuado efeito inibitório da droga sobre o crescimento. A adição de cloreto de sódio causou um significativo estímulo sobre a proliferação celular e também potencializou o efeito inibitório do amiloride (figuras 10, 11 e 12).

O efeito do amiloride sobre a diferenciação celular em *H. samuelpeessoai*, quando cultivada em meio quimicamente definido, na ausência e na presença de cloreto de sódio, em pH 6.5 e 7.5, a 28°C e 37°C está representado nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

O cultivo do protozoário em pH mais elevado (7.5) a 28°C ou 37°C tanto na presença como ausência de cloreto de sódio não induziu a diferenciação celular do protozoário. O amiloride não interferiu com a diferenciação do flagelado, quando

cultivado em pH mais elevado (7.5) a 28°C e 37°C, na presença ou não de cloreto de sódio. Apenas 7% de formas opistomastigotas foram observadas após 72 horas de incubação a 37°C, em meio suplementado com cloreto de sódio (100mM e 200 mM). A Figura 13 (A e B) sumariza os resultados obtidos sob o efeito do amiloride na diferenciação celular em *H. samuelpeessoai*, após 72 horas de incubação, em pH 6.5 na presença e na ausência de cloreto de sódio, a 28°C e 37°C. A droga inibiu significativamente o processo de diferenciação celular do flagelado, tanto a 28°C como a 37°C. Na temperatura mais elevada, o cultivo em presença da droga (5mM) reduziu as formas opistomastigotas de 31.7% para 1.2%. Além disso, a adição de cloreto de sódio ao meio de cultura potencializou o efeito inibidor da diferenciação causada pelo amiloride a 37°C. No meio de cultura contendo 200mM de cloreto de sódio e 5mM da droga, não foi detectada nenhuma forma opistomastigota e apenas 2.2% de formas paramastigotas. Nestas condições o amiloride na concentração mais baixa (1mM) também causou a inibição da diferenciação celular.

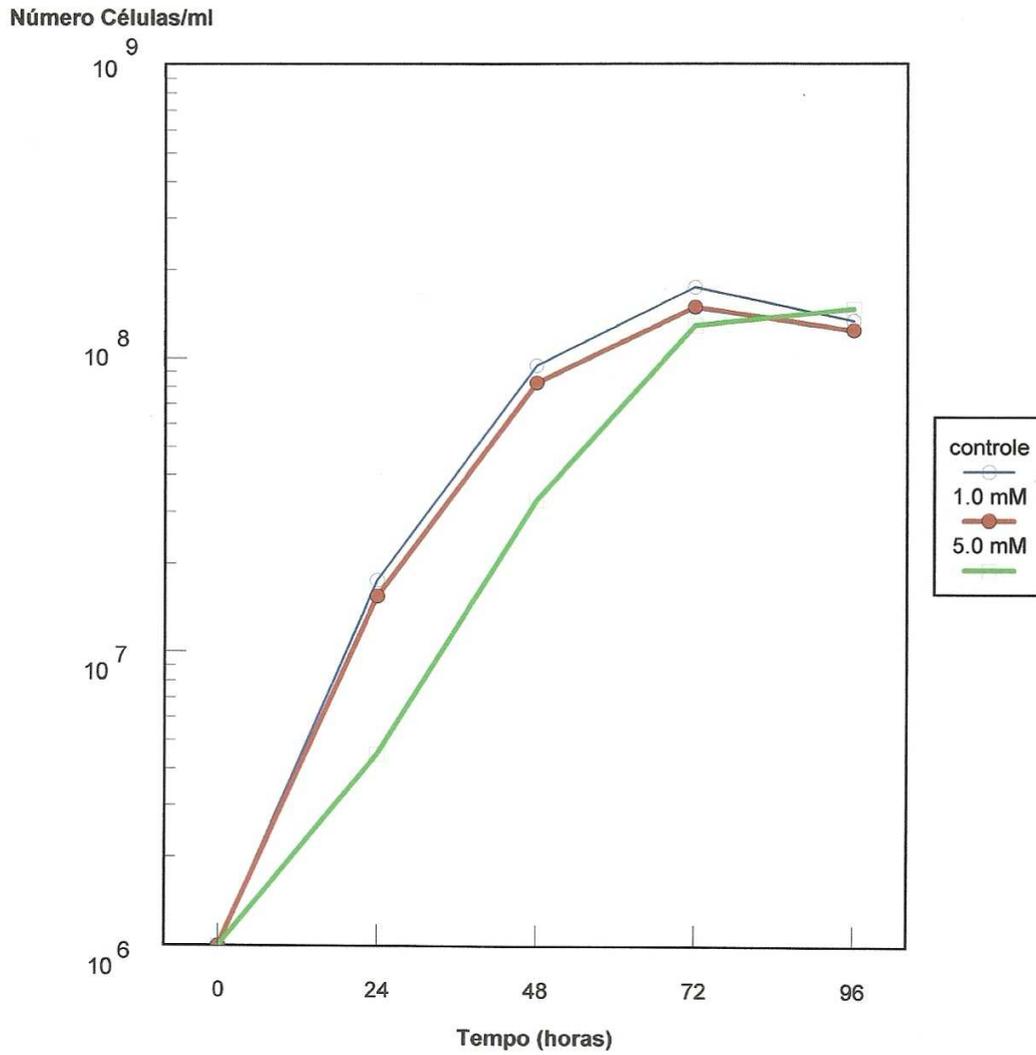


Fig. 01. Efeito do Amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al. ,1972), pH 6.5, a 28 °C.

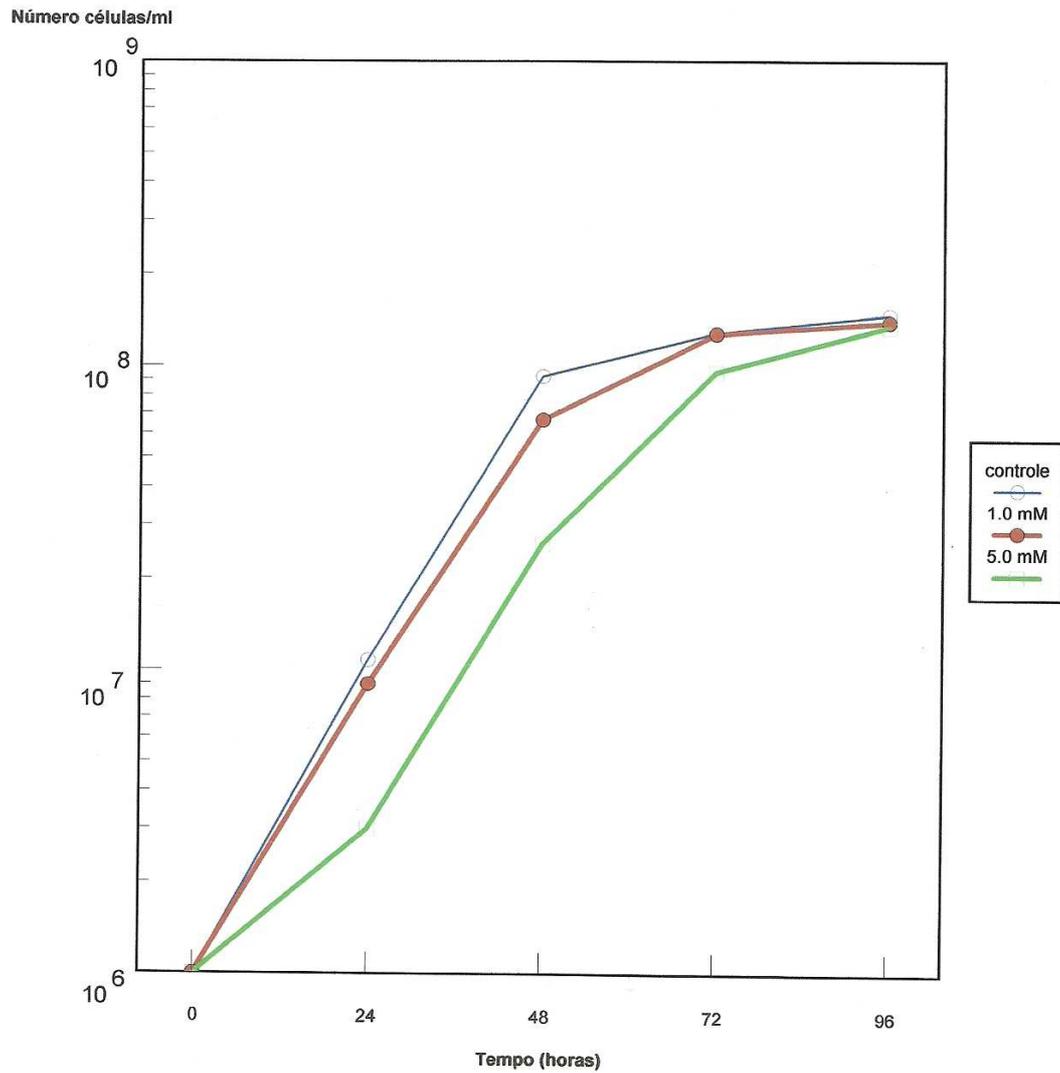


Fig. 02. Efeito do Amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), pH 6.5 a 28°C, suplementado com 100mM de cloreto de sódio.

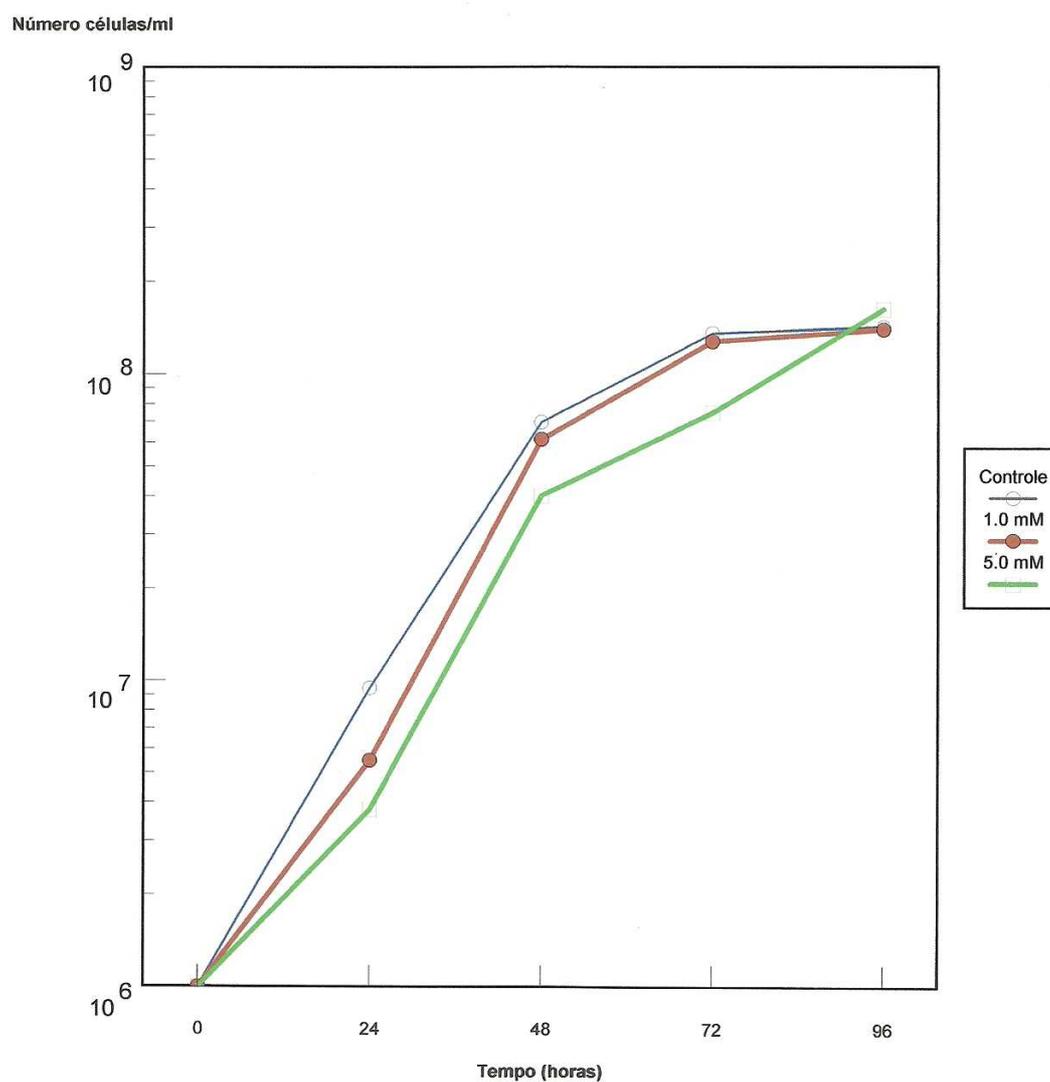


Fig. 03. Efeito do Amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), pH 6.5 a 28 °C, suplementado com 200mM de cloreto de sódio.

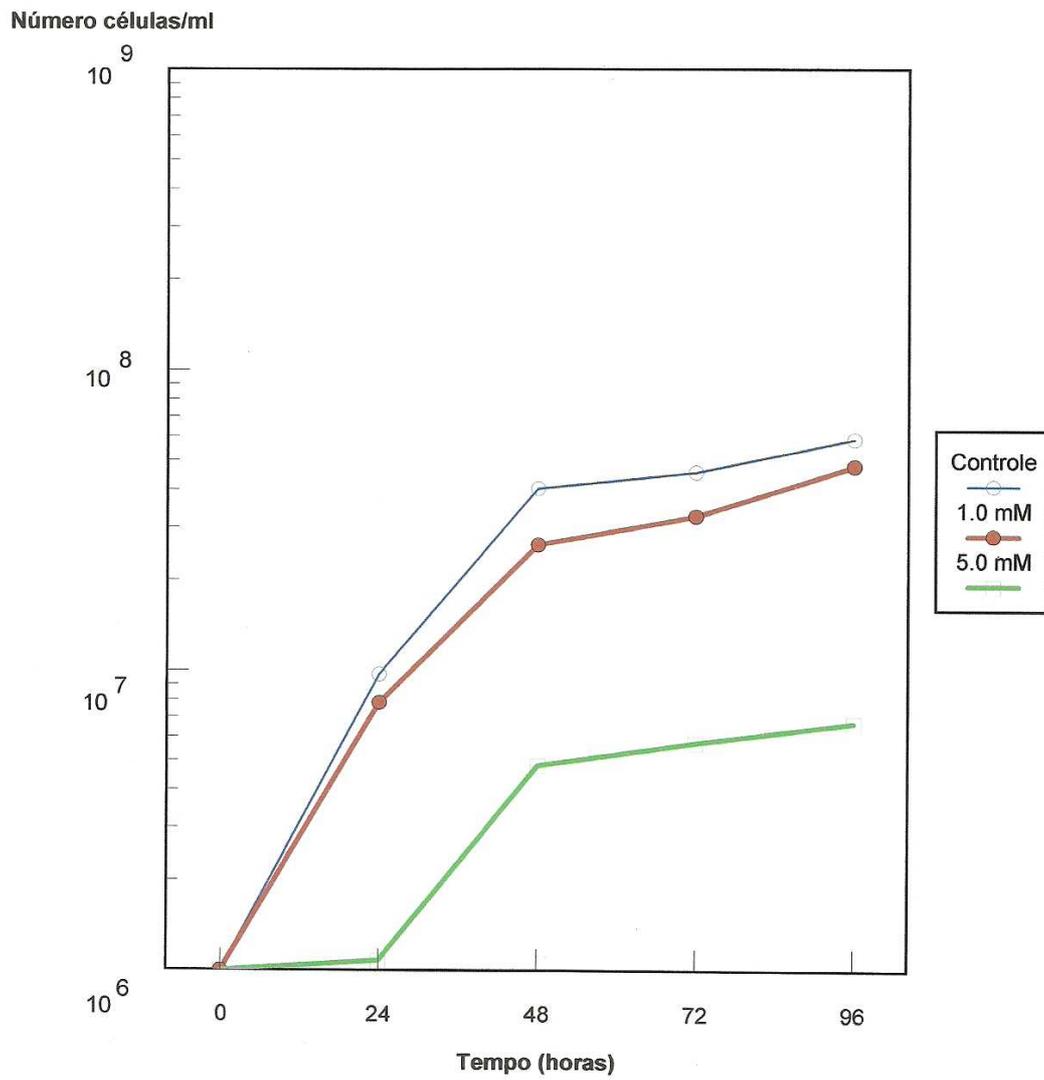


Fig. 04. Efeito do Amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), pH 7.5, a 28 °C.

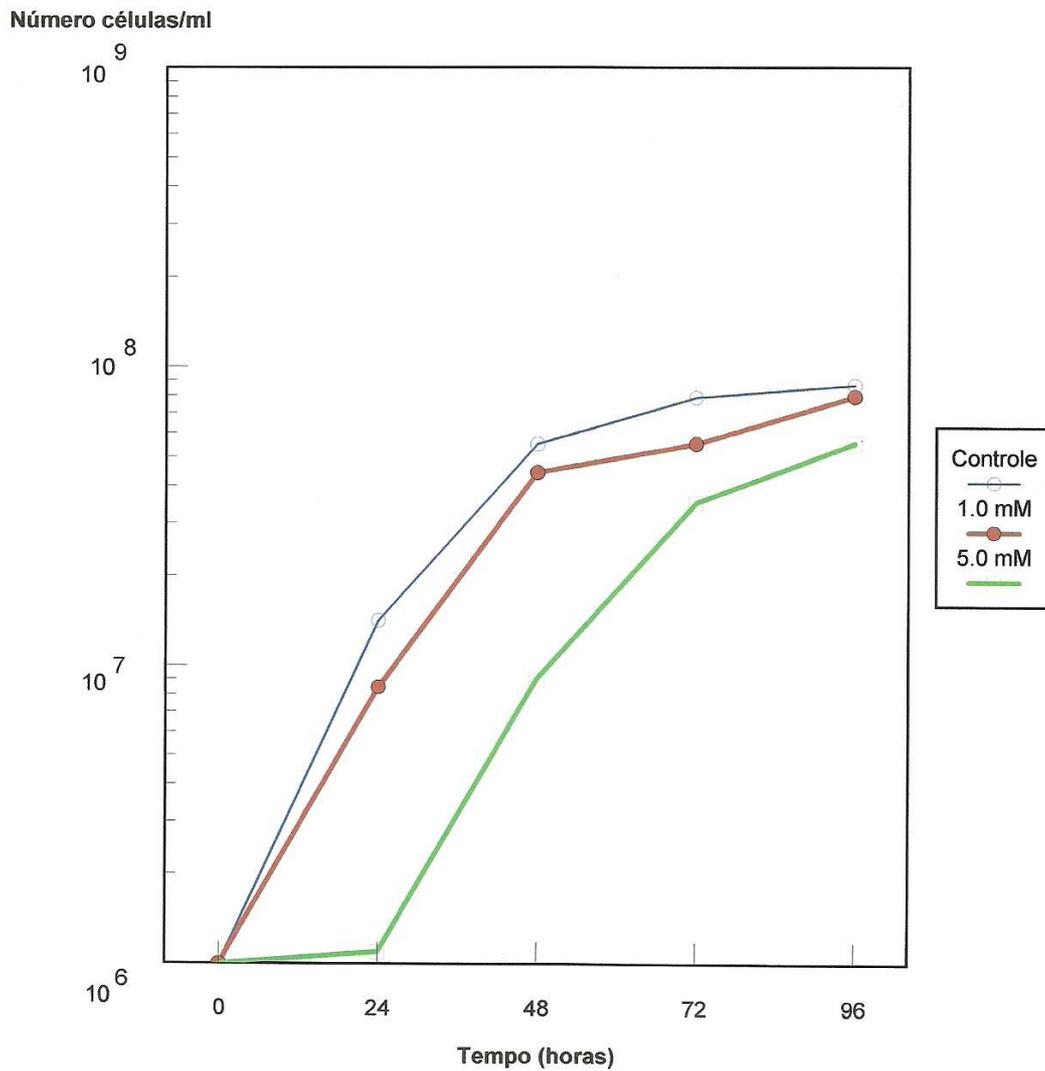


Fig. 05. Efeito do Amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), pH 7.5 a 28 °C, suplementado com 100mM de cloreto de sódio.

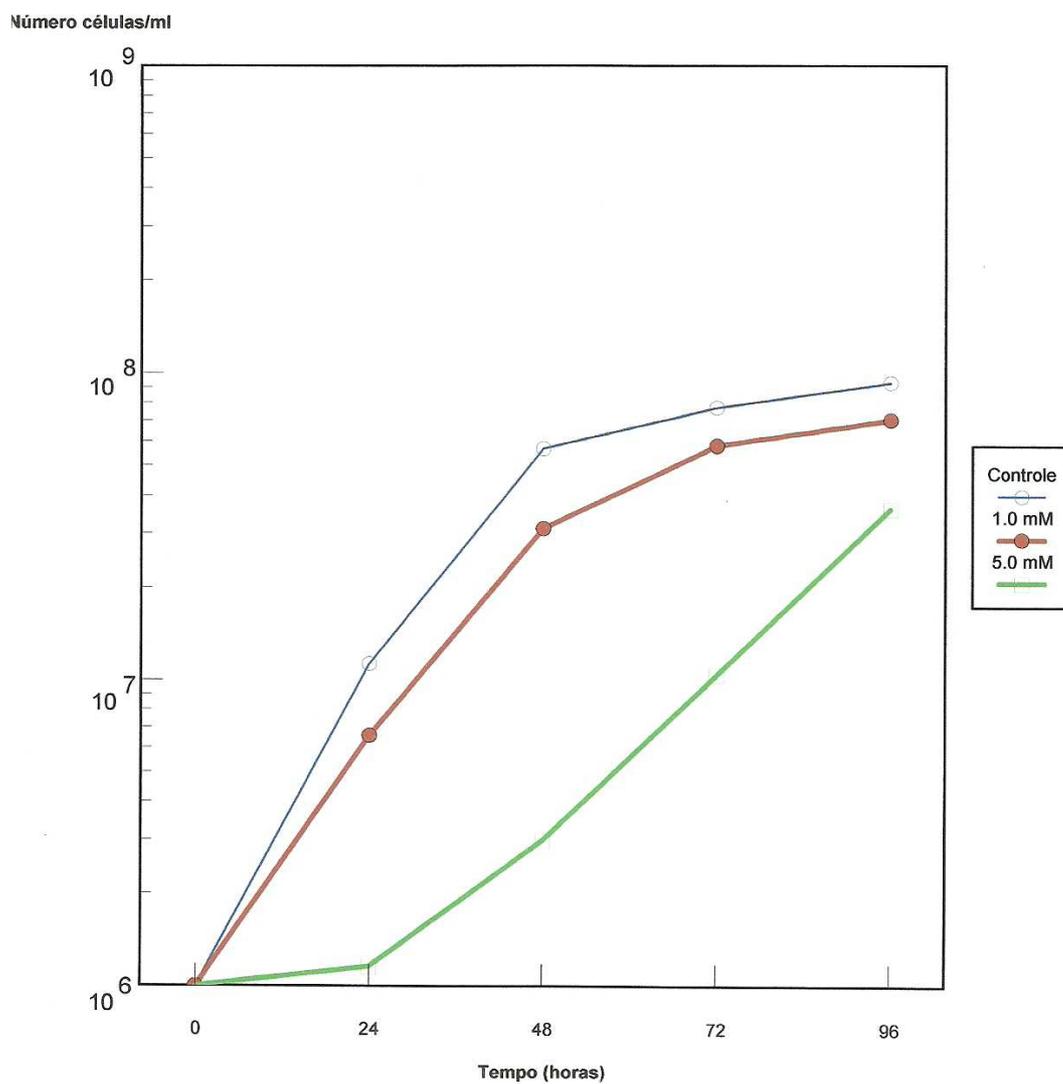


Fig. 06. Efeito do Amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), pH 7.5 a 28°C, suplementado com 200mM de cloreto de sódio.

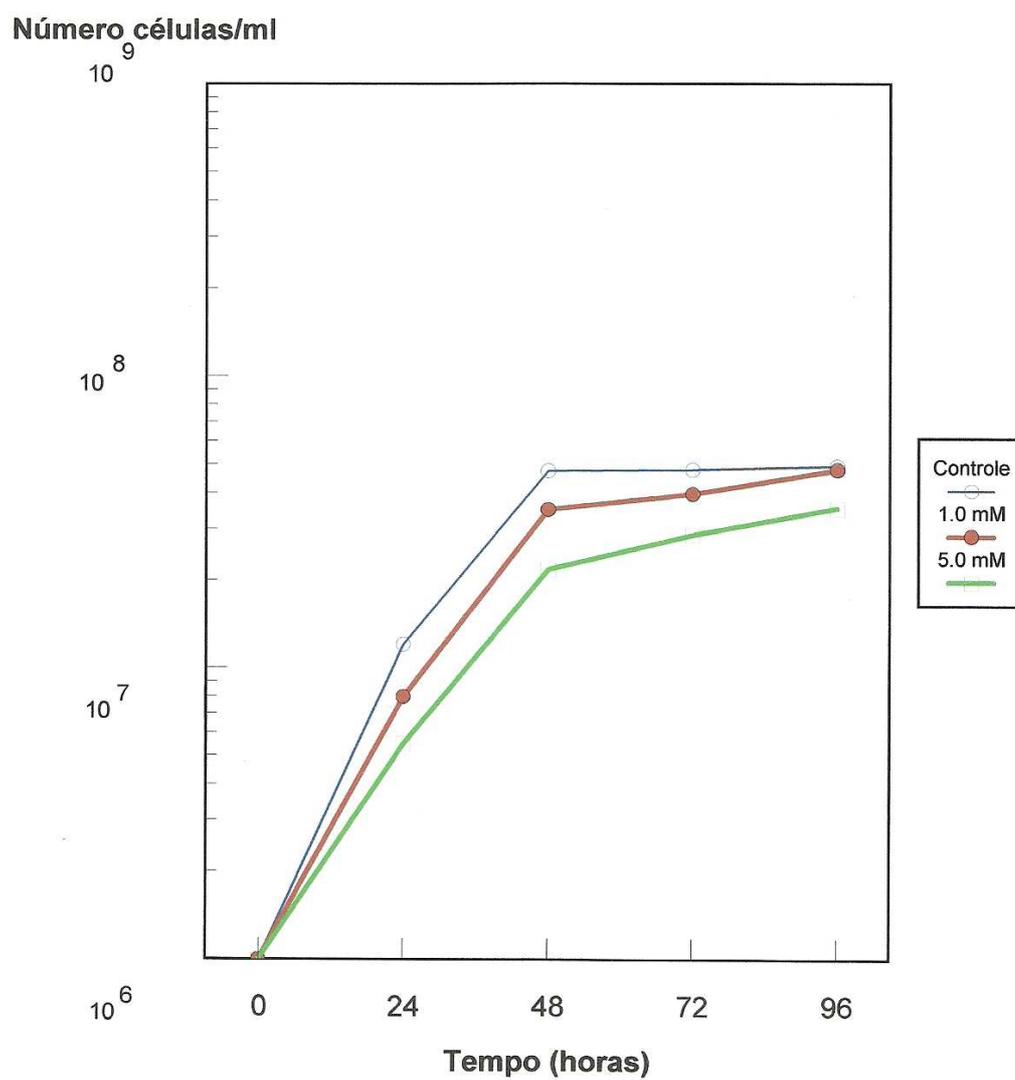


Fig. 07. Efeito do Amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), pH 6.5, a 37 °C.

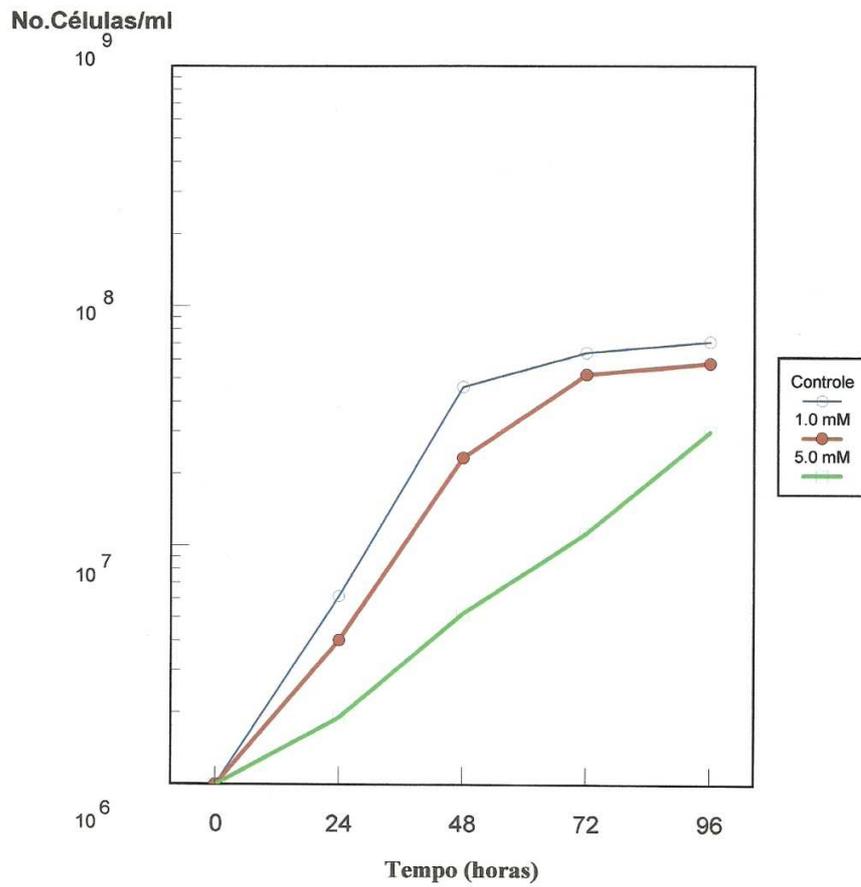


Fig. 08. Efeito do Amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), pH 6.5 a 37 °C, suplementado com 100mM de cloreto de sódio.

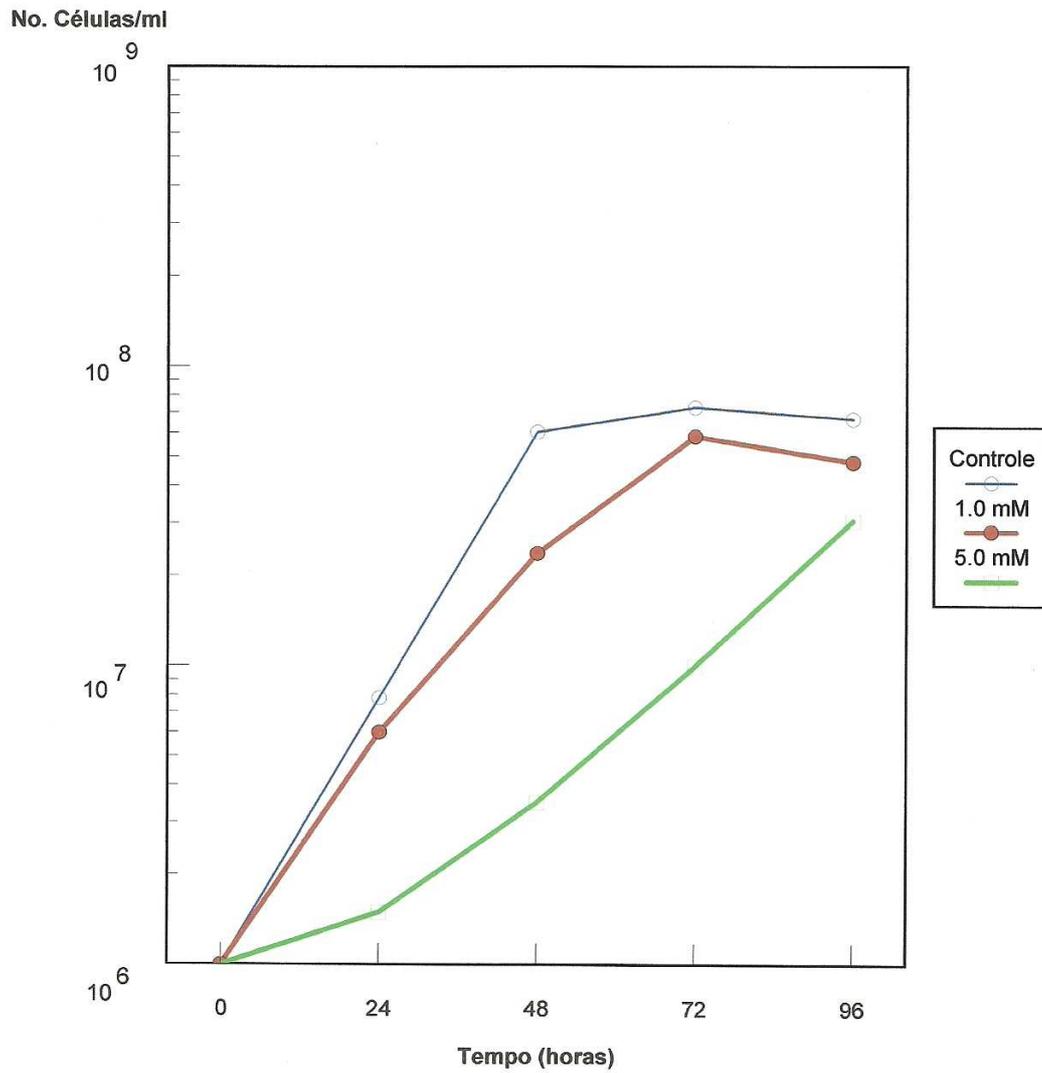


Fig. 09. Efeito do Amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), pH 6.5 a 37 °C, suplementado com 200mM de cloreto de sódio.

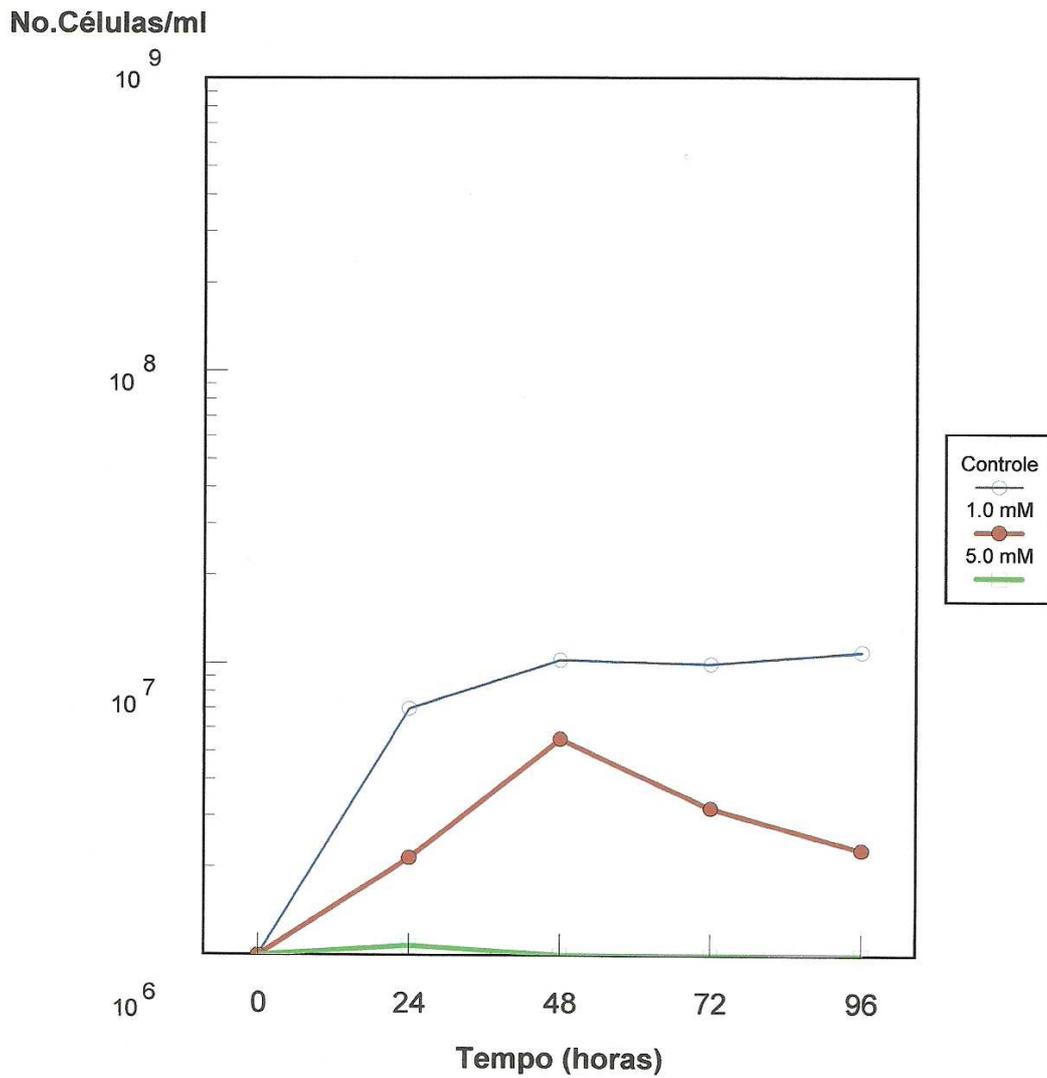


Fig. 10. Efeito do Amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), pH 7.5, a 37 °C.

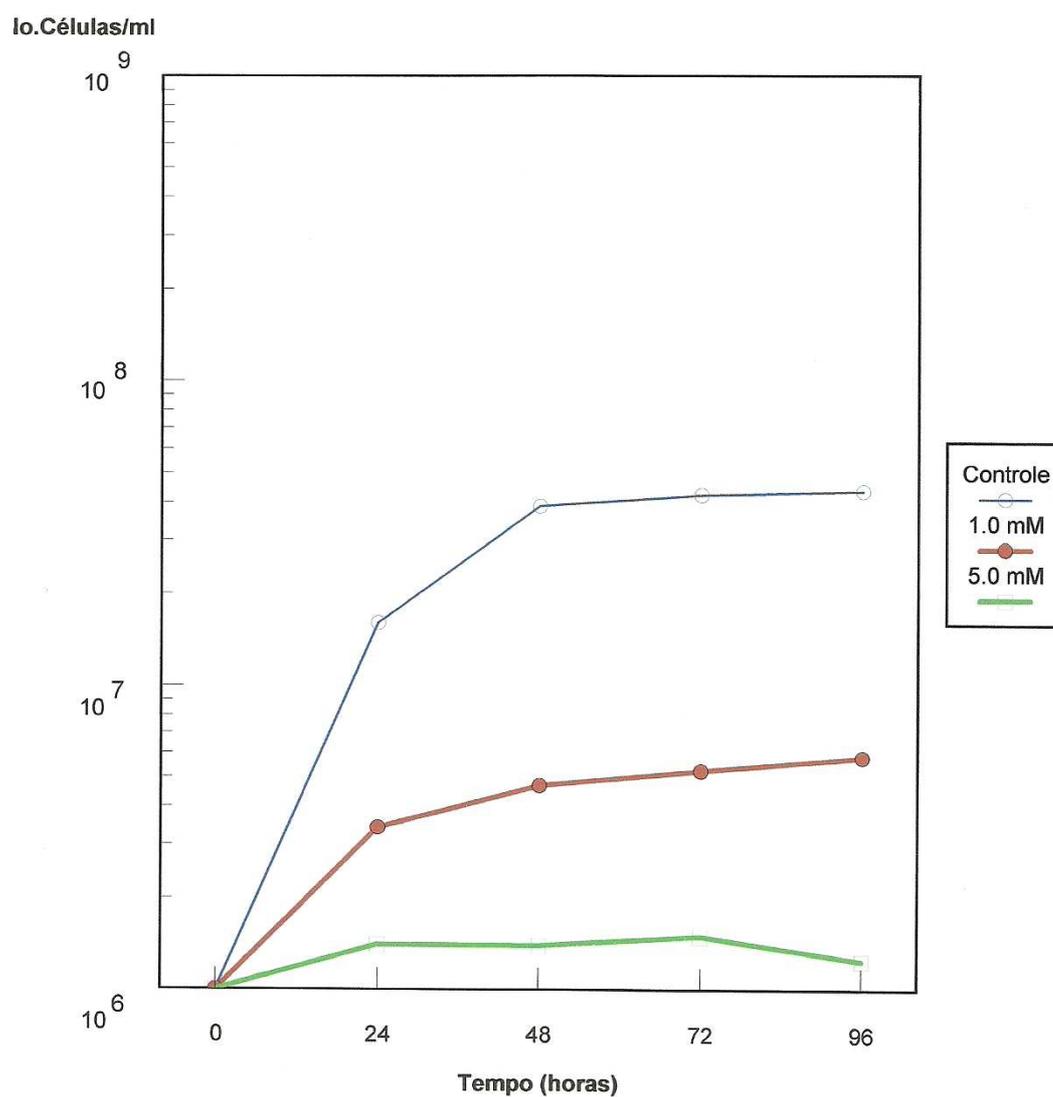


Fig. 11. Efeito do Amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), pH 7.5 a 37 °C, suplementado com 100mM de cloreto de sódio.

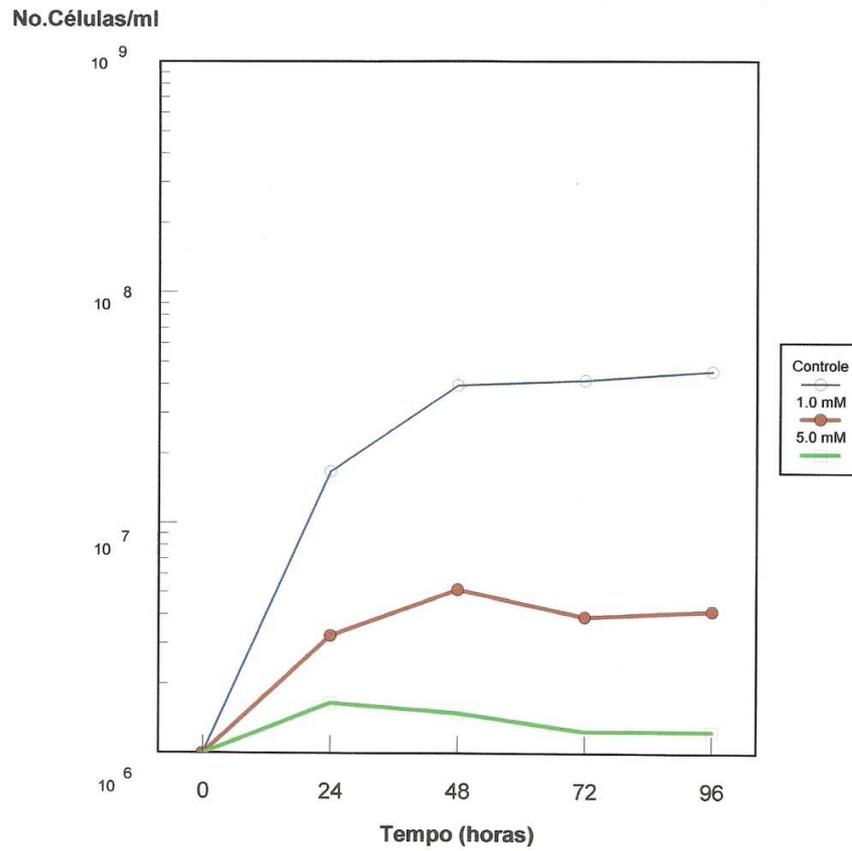


Fig. 12. Efeito do Amiloride sobre o crescimento de *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), pH 7.5 a 37°C, suplementado com 200mM de cloreto de sódio.

Tabela 2. Efeito do Amiloride sobre a diferenciação celular de *H. samuelpessoai*, quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), na ausência ou na presença de cloreto de sódio, pH 6.5 e 7.5, a 28°C.

Tempo de Incubação (horas)	Condições de Cultivo	Porcentagens de					
		Promastigota		Paramastigota		Opistomastigota	
		pH 6.5	pH 7.5	pH 6.5	pH 7.5	pH 6.5	pH 7.5
24	Controle	98.2	99.6	1.8	0.4	-	-
	Amiloride 1 mM	99.3	99.1	0.7	0.9	-	-
	Amiloride 5 mM	99.8	99.6	0.2	0.4	-	-
	NaCl 100 mM	95.1	99.6	4.9	0.4	-	-
	NaCl 200 mM	95.4	99.1	4.6	0.9	-	-
	NaCl 100 mM+Amiloride 1 mM	95.4	99.3	4.6	0.7	-	-
	NaCl 100 mM+Amiloride 5 mM	95.0	99.9	5.0	0.1	-	-
	NaCl 200 mM+Amiloride 1 mM	93.9	99.5	6.1	0.5	-	-
	NaCl 200 mM+Amiloride 5 mM	94.3	99.8	5.7	0.2	-	-
	48	Controle	93.7	98.3	6.3	1.7	-
Amiloride 1 mM		95.0	99.3	5.0	0.7	-	-
Amiloride 5 mM		97.9	98.9	2.1	1.1	-	-
NaCl 100 mM		95.4	97.5	4.6	2.5	-	-
NaCl 200 mM		92.4	97.3	7.6	2.7	-	-
NaCl 100 mM+Amiloride 1 mM		91.9	98.1	8.1	1.9	-	-
NaCl 100 mM+Amiloride 5 mM		87.4	98.8	12.6	1.2	-	-
NaCl 200 mM+Amiloride 1 mM		94.8	97.7	5.2	2.3	-	-
NaCl 200 mM+Amiloride 5 mM		90.5	98.3	9.5	1.7	-	-
72		Controle	67.1	96.9	29.0	3.1	3.9
	Amiloride 1 mM	77.8	97.3	20.6	2.7	1.6	-
	Amiloride 5 mM	95.4	98.7	4.4	1.3	0.2	-
	NaCl 100 mM	70.3	94.5	27.8	5.5	1.6	-
	NaCl 200 mM	70.8	93.1	27.8	6.9	1.4	-
	NaCl 100 mM+Amiloride 1 mM	78.8	95.9	20.2	4.1	1.0	-
	NaCl 100 mM+Amiloride 5 mM	75.6	95.0	23.0	5.0	1.4	-
	NaCl 200 mM+Amiloride 1 mM	75.6	95.6	23.6	4.4	0.8	-
	NaCl 200 mM+Amiloride 5 mM	69.3	96.6	29.5	4.6	1.2	-
	96	Controle	53.9	84.4	38.3	14.2	7.8
Amiloride 1 mM		56.2	90.1	37.8	9.9	6.0	-
Amiloride 5 mM		88.5	96.3	11.3	3.7	0.2	-
NaCl 100 mM		60.3	79.4	38.1	18.1	1.6	2.5
NaCl 200 mM		64.0	71.6	34.5	24.8	1.5	3.6
NaCl 100 mM+Amiloride 1 mM		66.3	84.2	31.9	14.7	1.8	1.1
NaCl 100 mM+Amiloride 5 mM		65.1	91.3	33.1	8.7	1.8	-
NaCl 200 mM+Amiloride 1 mM		69.4	95.3	29.6	4.7	1.0	-
NaCl 200 mM+Amiloride 5 mM		68.8	96.3	29.1	3.7	2.1	-

Tabela 3. Efeito do Amiloride sobre a diferenciação celular de *H. samuelpessoai*, quando cultivada em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), na ausência ou na presença de cloreto de sódio, pH 6.5 e 7.5, a 37°C.

Tempo de Incubação (horas)	Condições de Cultivo	Porcentagens de					
		Promastigota		Paramastigota		Opistomastigota	
		pH 6.5	pH 7.5	pH 6.5	pH 7.5	pH 6.5	pH 7.5
24	Controle	95.5	97.4	4.5	2.6	-	-
	Amiloride 1 mM	96.3	96.1	3.7	3.9	-	-
	Amiloride 5 mM	98.3	ND	1.7	ND	-	ND
	NaCl 100 mM	95.0	99.5	5.0	0.5	-	-
	NaCl 200 mM	96.1	98.5	3.9	1.5	-	-
	NaCl 100 mM+Amiloride 1 mM	95.8	98.2	4.2	1.8	-	-
	NaCl 100 mM+Amiloride 5 mM	96.7	ND	3.3	ND	-	ND
	NaCl 200 mM+Amiloride 1 mM	97.0	98.1	3.0	1.9	-	-
	NaCl 200 mM+Amiloride 5 mM	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	48	Controle	92.3	91.0	7.5	8.0	0.2
Amiloride 1 mM		95.8	89.0	4.3	9.2	-	1.8
Amiloride 5 mM		96.9	ND	3.2	ND	-	ND
NaCl 100 mM		93.3	94.2	6.6	5.8	0.1	-
NaCl 200 mM		94.4	94.4	5.6	5.6	-	-
NaCl 100 mM+Amiloride 1 mM		95.0	89.3	5.0	10.7	-	-
NaCl 100 mM+Amiloride 5 mM		94.8	ND	5.2	ND	-	ND
NaCl 200 mM+Amiloride 1 mM		96.7	92.0	3.3	8.0	-	-
NaCl 200 mM+Amiloride 5 mM		97.2	ND	2.8	ND	-	ND
72		Controle	24.9	38.9	43.4	31.6	31.7
	Amiloride 1 mM	38.7	43.2	38.4	30.6	23.8	26.2
	Amiloride 5 mM	87.1	ND	11.8	ND	1.2	ND
	NaCl 100 mM	30.8	75.0	38.7	18.7	30.5	6.3
	NaCl 200 mM	38.9	73.6	35.9	19.0	25.2	7.4
	NaCl 100 mM+Amiloride 1 mM	66.9	74.0	23.8	21.4	9.3	4.6
	NaCl 100 mM+Amiloride 5 mM	94.7	ND	5.0	ND	0.25	ND
	NaCl 200 mM+Amiloride 1 mM	92.7	51.1	7.0	32.7	0.3	26.2
	NaCl 200 mM+Amiloride 5 mM	97.8	ND	2.2	ND	-	ND
	96	Controle	12.8	ND	45.0	ND	42.2
Amiloride 1 mM		31.2	ND	39.6	ND	29.2	ND
Amiloride 5 mM		50.2	ND	26.5	ND	23.3	ND
NaCl 100 mM		14.0	ND	40.3	ND	45.7	ND
NaCl 200 mM		12.3	ND	41.9	ND	45.8	ND
NaCl 100 mM+Amiloride 1 mM		30.4	ND	35.6	ND	34.0	ND
NaCl 100 mM+Amiloride 5 mM		80.1	ND	15.5	ND	4.4	ND
NaCl 200 mM+Amiloride 5 mM		55.2	ND	32.1	ND	12.7	ND

ND - Não Determinado

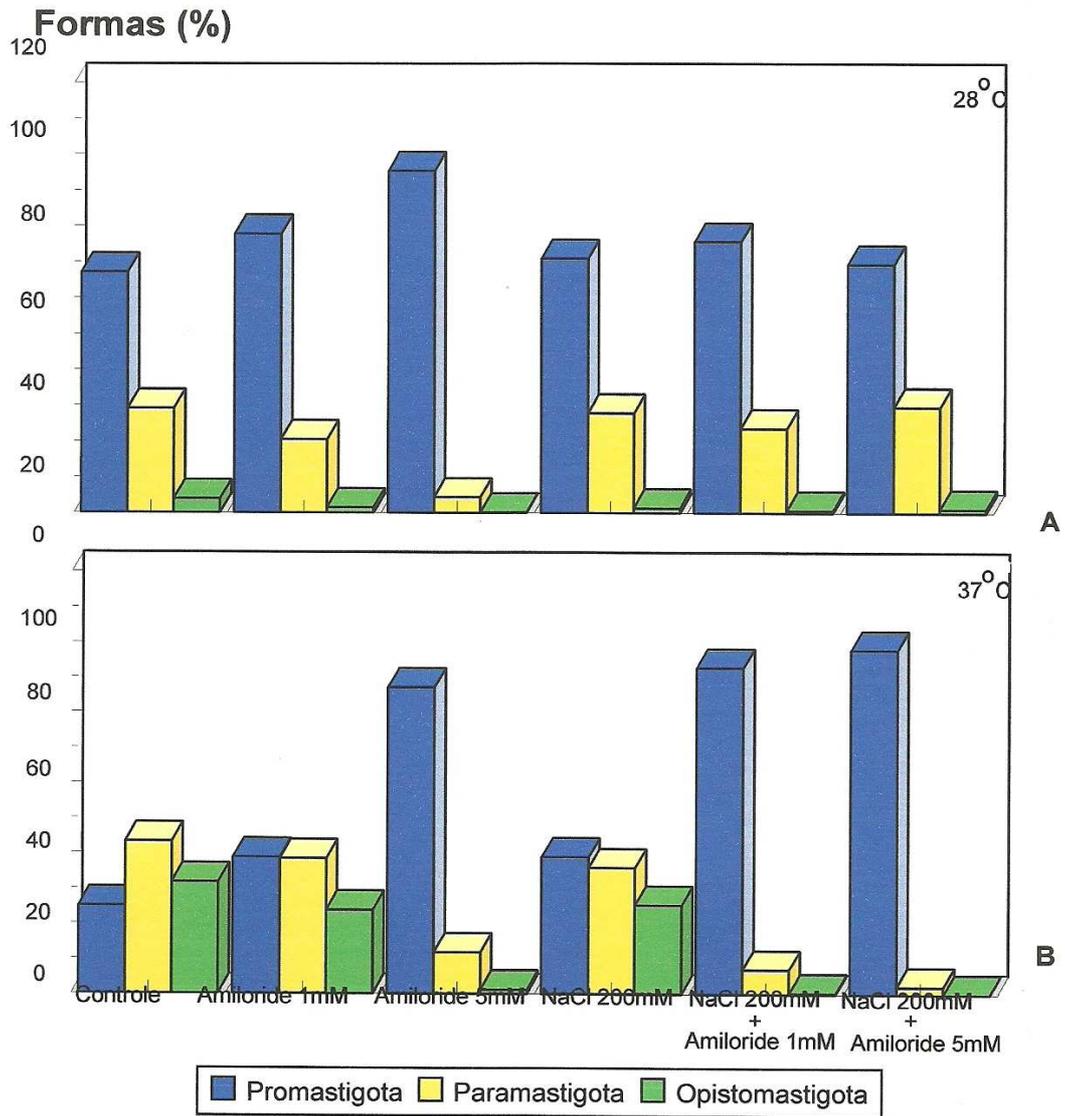


Figura 13. Resultados típicos mostrando a porcentagem de formas diferenciadas de *H. samueli* após 72 horas de cultivo em meio quimicamente definido (Roitman et al., 1972), em pH 6.5, adicionado ou não de cloreto de sódio, a 28°C (A) e 37°C (B).

DISCUSSÃO

Um sistema de transporte de membrana que troca Na^+ por H^+ tem sido descrito em membranas plasmáticas de diversas espécies de células eucarióticas e procarióticas. Este sistema parece estar envolvido na regulação do pH intracelular (pH_i) e pode ser a principal via de entrada de Na^+ nas células. A inibição do sistema antiporte Na^+/H^+ pelo amiloride foi descrita pela primeira vez por JOHNSON et al. (1976) e, desde então, essa droga tem sido usada como inibidor tanto do sistema antiporte Na^+/H^+ como dos eventos celulares subsequentes que podem ser alterados através da regulação deste sistema de transporte (KLEYMAN & CRAGOE, 1988).

No presente estudo, foi avaliado o efeito do amiloride sobre o crescimento e a diferenciação celular de *H. samuelpeessoai*, variando-se as condições de cultivo, entre as quais o pH, a concentração de cloreto de sódio do meio de cultura e a temperatura de incubação. Os resultados mostram que o amiloride (5mM) inibiu o crescimento do flagelado em pH 7.5 tanto a 28°C como a 37°C. Esse efeito inibitório no pH 6.5 somente ocorreu quando o meio estava suplementado com cloreto de sódio (100mM e 200 mM) a 37°C. Diversos autores demonstraram que o amiloride e seus análogos, inibem a proliferação celular em alguns sistemas, tais como: fibroblastos (L'ALLEMAIN et al., 1984a), células leucêmicas (CARACCILO et al., 1990), células pancreáticas (DELVAUX et al., 1990), macrófagos (VAIRO et al., 1990) e células endoteliais (ALLIEGRO et al., 1993).

A atividade inibitória do amiloride sobre o crescimento deste flagelado sugere a presença de um sistema antiporte Na^+/H^+ sensível ao amiloride o qual, provavelmente, foi ativado pelo cultivo do flagelado em pH mais elevado (7.5), tanto a 28°C como a 37°C. Já em pH mais baixo (6.5), a ativação do sistema de transporte pode ter ocorrido pelo aumento da concentração de cloreto de sódio no meio de cultura. Estes resultados estão de acordo com alguns dados descritos na literatura

(FRELIN et al., 1983; MOOLENAAR et al., 1984; PARIS & POUYSSÉGUR, 1984; JEAN et al., 1985; FRELIN et al., 1988; WALL et al., 1988), segundo os quais a ativação do sistema antiporte é dependente do pH e da concentração de sódio extracelulares, ou seja, a taxa de influxo do Na⁺ e efluxo do H⁺ aumenta com a elevação da concentração de Na⁺ e com o decréscimo do H⁺ extracelular.

STIERNBERG et al. (1983) verificaram que a síntese de DNA em células estimuladas a proliferar por fatores de crescimento é dependente do influxo de Na⁺. Este influxo parece ser mediado pelo antiporte Na⁺/H⁺, uma vez que é inibido pelo amiloride. Posteriormente, MOOLENAAR (1986) e ROZENGURT (1986) verificaram que a ativação do antiporte Na⁺/H⁺ é um evento crucial para proliferação celular.

Resultados do trabalho de CARACCIOLO et al. (1990), mostram que fatores de crescimento, em concentrações necessárias para estimular a proliferação de células leucêmicas *in vitro*, provocam alcalinização do citoplasma, sendo que esta resposta é inibida pela adição do amiloride. Tal alcalinização não ocorre em células mutantes deficientes no antiporte Na⁺/H⁺ (POUYSSÉGUR et al., 1984). Através dos resultados obtidos por esses autores, foi sugerido que o pH interno desempenha um papel determinante no controle do crescimento celular e que a inativação do antiporte Na⁺/H⁺, por mutação ou pela ação do amiloride, torna as células incapazes de extrair prótons (H⁺) do citoplasma, provenientes do metabolismo ou da incubação das células na presença de NH₄⁺. Essa incapacidade do antiporte de restaurar o pH interno impede a síntese de DNA, a qual somente tem início quando o pH intracelular apresenta-se alcalino.

A maior atividade inibitória do amiloride sobre o crescimento foi observada quando *H. samuelpessoai* foi cultivada em pH 7.5, a 37°C. LEVY & LIVNE (1984) verificaram que o transporte de lítio na membrana de eritrócitos sofre alterações devido a variações de temperatura. Da mesma forma que a temperatura alterou o transporte do lítio também pode ter interferido com a interação do amiloride no

sistema antiporte Na^+/H^+ , pois, tanto o lítio como o amiloride se ligam no mesmo sítio desse sistema (MAHNENSMITH & ARONSON, 1985).

A adição de cloreto de sódio ao meio de cultura estimulou o crescimento do flagelado, principalmente, com a elevação do pH e da temperatura de incubação. Este efeito poderia ser explicado pela ativação de sistemas de cotransporte de sódio e substratos, uma vez que esse cátion promove o transporte de açúcares e aminoácidos em células eucarióticas e procarióticas (KAUNITZ & WRIGTH, 1984; WRIGT & PEERCE, 1984; CHEN et al., 1985).

O presente estudo mostrou que o amiloride inibiu a diferenciação celular em *H. samuelpeessoai*. Essa droga também foi efetiva em inibir a diferenciação de células eritroleucêmicas de Friend, porém não afetando os níveis de proliferação (LEVENSON et al., 1980; LANNIGAN et al., 1988) e de células humanas promielocíticas HL60 (BESTERMAN et al., 1985).

RAO et al. (1991) demonstraram que células HL60 tratadas com o indutor da diferenciação (forbol éster), apresentaram um considerável aumento da expressão dos gens que codificam o antiporte Na^+/H^+ , antes de iniciar o processo de diferenciação celular. Provavelmente, este fato está relacionado com a necessidade de defesa da célula contra a acidificação do citoplasma decorrente dos eventos celulares envolvidos na diferenciação (GRINSTEIN & FURUYA, 1986).

Foi observado em nosso estudo, que o aumento da concentração de cloreto de sódio no meio de cultura, nas condições em que o amiloride foi mais eficiente na inibição da diferenciação (pH 6.5 a 37°C), potencializou o efeito inibitório da droga sobre esse processo. GRINSTEIN & FURUYA (1986) verificaram que o aumento na osmolaridade do meio leva à ativação do antiporte Na^+/H^+ em diferentes tipos celulares. Alguns estudos têm demonstrado que esta ativação do antiporte frente a estímulos osmóticos é devida a um aumento na sensibilidade desse sistema em relação ao pH intracelular (SOLEIMANI et al., 1994).

A adição de cloreto de sódio ao meio proporcionou uma inibição acentuada sobre a diferenciação do flagelado, quando cultivado em pH 7.5, a 37°C, mas o crescimento foi estimulado. É fato amplamente conhecido que o estímulo do crescimento de tripanosomatídeos não favorece o processo de diferenciação celular (ROITMAN, 1976; ANGLUSTER, 1977).

Quando utilizado em culturas de células, as concentrações inibitórias do amiloride na proliferação e diferenciação foram menores quando comparadas às usadas em *H. samuelpeessoai*. Esta diferença, provavelmente, deve-se ao fato da sensibilidade do antiporte Na^+/H^+ pelo amiloride ser dependente do estado metabólico (SEMPPLICINI et al., 1989), fisiológico (COSTA-CASNELLIE et al., 1988) e do tipo celular (BROWN et al., 1990). As observações feitas por ORLOWSKI (1993) sugerem que as distintas isoformas do antiporte Na^+/H^+ (NHEs), com suas diferenças farmacológicas (tal como: sensibilidade ao amiloride) e funcionais, podem apresentar uma distribuição específica nos diferentes tipos celulares. Adicionalmente, reduzida sensibilidade do antiporte pelo amiloride foi observada em fibroblasto mutante (FRANCHI et al., 1986), LLC-PK1 mutante (HAGGERTY et al., 1988), tímócito (GRINSTEIN et al., 1984) e células renais murinas (GURICH & WARNOCK, 1986). Já o antiporte Na^+/H^+ de neurônios murinos é totalmente insensível ao amiloride (RALEY-SUSMAN, et al., 1991).

O fato de poder ser cultivada em condições quimicamente definidas e em diferentes valores de pH e temperatura, justifica o uso de *H. samuelpeessoai* como modelo de estudo do sistema antiporte Na^+/H^+ em tripanosomatídeos. Por outro lado, o estudo deste sistema de transporte abre novas perspectivas para uma melhor compreensão dos eventos que regulam tanto a proliferação quanto a diferenciação celular em tripanosomatídeos.

RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o efeito do amiloride sobre o crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai*, cultivada em meio quimicamente definido (ROITMAN et al., 1972), na ausência e na presença de cloreto de sódio, em pH 6.5 e 7.5, nas temperaturas de 28°C e 37°C. O pH externo, a presença de cloreto de sódio e a temperatura de incubação interferem com o efeito inibitório do amiloride sobre o crescimento e diferenciação celular deste tripanosomatídeo.

O amiloride, na concentração mais elevada (5mM), inibiu significativamente o crescimento do flagelado, quando incubado em pH 7.5, a 28°C e 37°C. Neste mesmo pH e na temperatura de 37°C, a concentração de 1mM da droga também promoveu a inibição do crescimento. Em pH 6.5, a inibição desse processo pelo amiloride somente foi observada quando o protozoário foi cultivado em presença de cloreto de sódio, nas concentrações de 100mM e 200 mM e a 37°C.

A diferenciação celular do protozoário, quando cultivado em pH 6.5, a 37°C, foi marcadamente inibida pelo amiloride (a 5mM). Nestas condições, o cloreto de sódio potencializou o efeito inibitório da droga sobre a diferenciação celular de *H. samuelpessoai*. Entretanto, em pH 7.5, a 37°C, o amiloride não interferiu com este processo.

SUMMARY

The effect of Amiloride on the growth and cell differentiation of the tripanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai* grown in chemically defined medium depend on the medium pH (6,5 and 7,5), the temperature of incubation (28°C and 37°C) and the presence or absence of sodium chloride.

At 5mM of Amiloride, the growth was markedly reduced when the flagellates were incubated at pH 7,5 at 28°C and 37°C. At this same pH, but at 37°C, lower concentration of Amiloride (1 mM) was able to inhibit the growth. At pH 6,5 and 37°C, growth inhibition was only observed when the cells were grown at the presence of 100mM and 200 mM sodium chloride concentrations.

The cell differentiation was inhibited by Amiloride at 5 mM only when the parasites were grown at pH 6,5 at 37°C. At those conditions, both concentrations of sodium chloride (100mM and 200 mM) enhanced the inhibitory drug effect over *H. samuelpessoai* cell differentiation. However, at pH 7,5 and at 37°C, the drug did not interfere with this process.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLIEGRO, M. C.; ALLIEGRO, M. A.; CRAGOE, E. J. & GLASER, B.M. Amiloride inhibition of angiogenesis in vitro. **J. Exp. Zool.**, v. 267, p. 245-252, 1993.
- ANGLUSTER, J.; BUNN, M.M. & DE SOUZA, W. Effect of 2-deoxy-D-glycose on differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai*. **J. Parasitol.**, v. 63, p. 922-924, 1977.
- ARONSON, P.; NEE, J. & SHUM, M. Modifier role of internal H⁺ in activating the Na⁺/H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. **Nature**, v. 299, p. 161-163, 1982.
- BARKLA, B. J. & BLUMWALD, E. Identification of a 170-KDa protein associated with the vacuolar Na⁺/H⁺ antiport of *Beta vulgaris*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 88, p. 11177-11181, 1991.
- BENOS, D. J. Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. **Am. J. Physiol.**, v. 242, p. C11131-C145, 1982.
- BESTERMAN, J. M.; MAY, W. S.; LEVINE III, H.; CRAGOE, E. J. & CUATRECASAS, P. Amiloride inhibits phorbol ester- stimulated Na⁺/H⁺ exchanger and protein kinase C. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 1155-1159, 1985.
- BIEMESDERFER, D.; PIZZONIA, J.; ABU-ALFA, A.; EXNER, M.; REILLY, R.; IGARASHI, P. & ARONSON, P. S. NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. F736-F742, 1993.
- BLUMWALD, E. & POOLE, R. J. Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. **Plant. Physiol.**, v. 78, p. 163-167, 1985.
- BLUMWALD, E.; CRAGOE, E. J. & POOLE, R. J. Inhibition of Na⁺/H⁺ antiport activity in sugar beet tonoplast by analogs of amiloride. **Plant. Physiol.**, v. 85, p. 30-33, 1987.

- BROWN, K. K.; YEE, R.; GRANT, A. O. & STRAUSS, H. C. Effect of amiloride on pH regulation in canine cardiac purkinje fibers. **J. Pharm. Experim. Therap.**, v. 254, p. 83-90, 1990.
- CAMARGO, E. P. Enzimas do ciclo ornitina-arginina em tripanosomatídeos: significado fisiológico e valor taxonômico. São Paulo, Instituto de Química, USP, tese de livre docência, 1979.
- CANÇADO, R. Tratamento da Doença de Chagas. Em: **Doença de Chagas**, ed.: R. Cançado, Universidade Federal de Minas Gerais, 1968, p. 517-537.
- CARACCILO, D.; PANNOCCHIA, A.; TREVES, S. ; GHIGO, D.; GALLO, E.; TARELLA, C.; BUSSOLINO, F.; TURRINI, F. TAMPONE, G. & BOSIA, A. Role of Na⁺/H⁺ exchanger in the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent growth of a leukemic cell line. **J. Cel. Physiol.**, v. 143, p. 133-139, 1990.
- CARVALHO, A.L.M. & DEANE, M. P. Trypanosomatidae isolated from *Zellus leucogrammus* (Perty,1834) (Hemiptera, Reduviidae), with a discussion on flagellates of insectivorous bugs. **J. Protozool.**, v. 21, p. 5-8, 1974.
- CASTELLANOS, G. B.; ANGLUSTER, J. & DE SOUZA, W. Induction of differentiation in *Herpetomonas samuelpessoai* by dimethylsulfoxide. **Acta Tropica**, v. 38, p. 29-37, 1981.
- CASTELLANOS, G. B.; MENEZES, S.; ANGLUSTER, J.; DE SOUZA, W. & CALDAS, L. R. Effect of methylene blue and illumination on the process of differentiation of the protozoan *Herpetomonas samuelpessoai*. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 47, p. 191-195, 1985.
- CHAUHAN, A.; CHAUHAN, U. P. S. & BROCKERHOFF, H. Activation of protein kinase C by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: possible involvement in Na⁺/H⁺ antiport down-regulation and cell proliferation. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 175, p. 852-857, 1991.
- CHEN, C. C.; TSUCHIYA, T.; YAMANE, Y.; WOOD, J.M. & WILSON, H. Na⁺(Li⁺) - proline co-transport in *Escherichia coli*. **J. Membrane Biol.**, v.84, p.157-164, 1985.

- COSTA-CASNELLIE, M.; SEGEL, G. B. & LICHTMAN, M. A. The Na⁺/H⁺ exchanger in immature and mature granulocytic HL60 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 11851-11855, 1988.
- COUNILLON, L.; FRANCHI, A. & POUYSSÉGUR, J. A point mutation of the Na⁺/H⁺ exchanger gene (NHE1) and amplification of the mutated allele confer amiloride resistance upon chronic acidosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA v. 90, p. 4508-4512, 1993.
- COUNILLON, L. & POUYSSÉGUR, J. Molecular biology and hormonal regulation of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. In: REUSS, L.; RUSSEL, J. M. Jr. & JENNINGS, J. (Eds.). **Molecular Biology and Function of Carrier Proteins**. The Rockefeller University Press, New York (Society of General Physiologists), 1993, p. 169-185.
- DE SOUZA, E. T.; THOMAS, M. E.; ESTEVES, M. J. G.; ANGLUSTER, J. & DE SOUZA, W. Concanavalin A induced cell differentiation in the protozoan *Herpetomonas samuelpessoai*. **J. Parasitol.**, v. 66, p. 985-988, 1980.
- DELVAUX, M.; BASTIE, M. J. & CHENTOUFI, J. Amiloride and analogues inhibit Na⁺/H⁺ exchange and cell proliferation in AR42J pancreatic cell line. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. G842-G849, 1990.
- FRANCHI, A.; CRAGOE, E. J. & POUYSSÉGUE, J. Isolation and properties of fibroblasts mutants overexpressing and altered Na⁺/H⁺ antiporter. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 14614-14620, 1986.
- FRELIN, C.; VIGNE, P. & LAZDUNSKI, M. The amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiport in 3T3 fibroblast. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 6272-6276, 1983.
- FRELIN, C.; VIGNE, P. & LAZDUNSKI, M. The role of the Na⁺/H⁺ exchange in the regulation of the internal pH in cultured cardiac cells. **Eur. J. Biochem.**, v. 149, p. 1-4, 1985.
- FRELIN, C.; VIGNE, P.; LADOUX, A. & LAZDUNSKI, M. The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. **Eur. J. Biochem.**, v. 174, p. 3-14, 1988.

- GALVÃO, A. B.; OLIVEIRA, R. L.; CARVALHO, A. L. M. & VEIGA, G. P. *Leptomonas pessoai* sp. N. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida, Protozoa). **Rev. Goiana Med.**, v. 16, p. 229-236, 1970.
- GARBARINO, J. & DUPONT, F. NaCl induces a Na⁺/H⁺ antiport in tonoplast vesicles from barley roots. **Plant. Physiol.**, v. 86, p. 231-236, 1988.
- GREEN, J.; YAMAGUCHI, D. T.; KLEEMAN, C. R. & MUALLEM, S. Cytosolic pH regulation in osteoblasts. Interaction of Na⁺ and H⁺ with the extracellular and intracellular faces of the Na⁺/H⁺ exchanger. **J. Gen. Physiol.**, v. 92, p. 239-261, 1988.
- GRINSTEIN, S. & FURUYA, W. Characterization of amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiport of human neutrophils. **Am. J. Physiol.**, v. 250, p. C283-C291, 1986.
- GRINSTEN, S.; COHEN, S. & ROTHSTEIN, A. Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ antiport. **J. Gen. Physiol.**, v. 83, p. 341-369, 1984.
- GRINSTEN, S.; ROTIN, D. & MARSON, M. J. Na⁺/H⁺ exchanger and growth factor-induced cytosolic pH change. Role in cellular proliferation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 988, p. 73-91, 1989.
- GURICH, R. W. & WARNOCK, D. G. Electrically neutral Na⁺/H⁺ exchange in endosomes obtained from rabbit renal cortex. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. F702-F709, 1986.
- HAGGERTY, J. G.; AGARWAL, N.; REILLY, R. F.; ADELBERG, E. A. & SLAYMAN, C. W. Pharmacologically different antiporters on the apical and basolateral surfaces of cultured kidney cells (LLC-PK1). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 6797-6801, 1988.
- HAROLD, F. M. Ion currents and physiological functions in microorganisms. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 31, p. 181-203, 1977.
- HELBIG, H.; KORBMACHER, C.; STUMPF, F.; COCA-PRADOS, M. & WIEDERHOLT, M. Na⁺/H⁺ exchange regulates intracellular pH in a cell clone

- derived from bovine pigmented ciliary epithelium. **J. Cel. Physiol.**, v. 137, p. 384-359, 1988.
- HOARE, C.H. & WALLACE , I. G. Developmental stage of trypanosomatids flagellates: a new terminology. **Nature**, v. 212, p. 1385, 1966.
- HONIBERG, B. M.; BALAMUTH, W.; BOVEE, E. C.; CORLISS, J. O.; GODJICS, M.; HALL, R. P.; KUDO, R. R.; LEVINE, N. D.; LOEBLIC, A. R.; WEISER, J. & WENRICH, B. H. A revised classification of the phylum Protozoa. **J. Protozool.**, v. 11, p. 7-20, 1964.
- INABA, K.; KURODA, T.; SHIMAMOTO, T.; KAYAHARA, T.; TSUDA, M. & TSUCHIYA, T. Lithium toxicity and $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ antiporter in *Escherichia coli*. **Biol. Pharm. Bull.**, v.17, p. 395-398, 1994.
- JEAN, T.; FRELIN, C.; VIGNE, P.; BARBRY, P. & LAZDUNSKI, M. Biochemical properties of the Na^+/H^+ exchanger system in rat brain synaptosomes. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 9678-9684, 1985.
- JIA, Z. P.; McCULLOUGH, N.; WONG, L. & YOUNG, P. G. The amiloride resistance gene, *car1*, of *Schizosaccharomyces pombe*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 241, p. 298-304, 1993.
- JIA, Z. P.; McCULLOUGH, N.; MARTEL, R.; HEMMINGSEN, S. & YOUNG, P. G. Gene amplification at a locus encoding a putative Na^+/H^+ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. **EMBO. J.**, v. 11, p. 1831-1840, 1992.
- JOHNSON, J. D.; EPEL, D. & PAUL, M. Intracellular pH activation of sea urchin eggs after fertilization. **Nature**, v. 262, p. 661-664, 1976.
- KAPLAN, J. G. Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells. **Ann. Rev Physiol.**, v. 40, p. 19-41, 1978.
- KATZ, A.; KLEYMAN, T. R. & PICK, V. Utilization of amiloride analogs for characterization and labeling of the plasma membrane Na^+/H^+ antiporter from *Dunaliella salina*. **Biochemistry**, v. 33, p. 2389-2393, 1994.

- KAUNITZ, J. D. & WRIGTH, E. M. Kinetics of sodium D - glucose cotransport in bovine intestinal brush border vesicles. **J. Membrane Biol.**, v. 79, p. 41-51, 1984.
- KLEYMAN, T. & CRAGOE, E. J. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. **J. Membrane Biol.**, v. 105, p. 1-21, 1988.
- KLEYMAN, T. R.; KRAEHENBUHL, J. P.; ROSSIER, B. C.; CRAGOE, E. J. & WARNOCK, D. G. Distinct epitopes on amiloride. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. C1135-C1141, 1989.
- KOCH, K. S. & LEFFERT, A. Increased sodium ion influx is necessary to initiate rat hepatocyte proliferation. **Cell**, v. 18, p. 153-163, 1979.
- L'ALLEMAIN, G.; FRANCHI, A.; CRAGOE, E. & POUYSSÉGUR, J. Blockade of the Na^+/H^+ antiport abolishes growth factor-induced DNA synthesis in fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 4313-4319, 1984a.
- L'ALLEMAIN, G; PARIS, S. & POUYSSÉGUR, J. Growth factor action and intracellular pH regulation in fibroblasts - evidence for a major role of the Na^+/H^+ antiport. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 5809-5815, 1984b.
- LANNIGAN, D. A.; BENNINGTON, J. B.; CRAGOE, E. J. & KNAUF, P. A. Phenamil, an amiloride analogue, inhibits differentiation of friend murine erythroleukemic cells. **Am. J. Physiol.**, v. 254, p. C122-C129, 1988.
- LEVENSON, R.; HOUSMAN, D. & CANTLEY, L. Amiloride inhibits murine erythroleukemia cell differentiation: evidence for a Ca^{2+} requirement for commitment. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 77, p. 5948-5952, 1980.
- LEVY, R. & LIVNE, A. The erythrocyte membrane in essential hypertension characterization of the temperature dependence of lithium efflux. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 769, p. 41-48, 1984.
- LIVNE, A. & HOFFMAN, E. K. Cytoplasmic acidification and activation of Na^+/H^+ exchanger during regulatory volume decrease in erlich ascites tumor cells. **J. Membrane Biol.**, v. 114, p. 153-157, 1990.

- MAHNENSMITH, R. L. & ARONSON, P. S. Interrelationships among quinidine, amiloride, and lithium as inhibitors of the renal Na⁺/H⁺ exchanger. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 12586-12592, 1985.
- MOOLENAAR, W. H. Effects of growth factors on intracellular pH regulation. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 48, p. 363-376, 1986.
- MOOLENAAR, W. H.; TERTOOLEN, L. G. J. & LAAT, S. W. The regulation of cytoplasmic pH in human fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 7563-7570, 1984.
- MURER, H.; HOPPER, V. & KINNE, R. Sodium/proton antiport in Brush-Border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. **Biochem. J.**, v. 154, p. 597-604, 1976.
- OLSNES, S.; TONNESSEN, T. I. & SANDUIG, K. PH-regulated anion antiport in nucleated mammalian cells. **J. Cel. Biol.**, v. 102, p. 967-971, 1986.
- ORLOWSKI, J. Heterologous expression and functional properties of amiloride high affinity (NHE-1) and low affinity (NHE-3) isoforms of the rat Na/H exchanger. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 16393-16367, 1993.
- PADAN, E. & SCHULDINER, S. Molecular physiology of Na⁺/H⁺ antiporters key transporters in circulation of Na⁺ and H⁺ in cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1185, p. 129-151, 1994.
- PARIS, S. & POUYSSÉGUR, J. Biochemical characterization of the amiloride sensitive Na⁺/H⁺ antiport in chinese hamster lung fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 3503-3508, 1983.
- PARIS, S. & POUYSSÉGUR, J. Growth factors activate the Na⁺/H⁺ antiporter in quiescent fibroblast by increasing its affinity for intracellular H⁺. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 10989-10994, 1984.
- PINNER, E.; KOTLER, Y.; PADAN, E. & SCHULDINER, S. Physiological role of NhaB, a specific Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v.267, p. 11064-11072, 1993.

- POUYSSÉGUR, J.; SARDET, C.; FRANCHI, A.; L'ALLEMAIN, G. & PARIS, S. A specific mutation abolishing Na⁺/H⁺ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neural and acidic pH. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 81, p. 4833-4837, 1984.
- RALEY-SUSMAN, K. M.; CRAGOE, E. J.; SAPOLSKY, R. M. & KOPITO, R.R. Regulation of intracellular pH in cultured hippocampal neurons by an amiloride - insensitive Na⁺/H⁺ exchanger. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 2739-2745, 1991.
- RAO, G. N.; ROUX, N.; SARDET, C.; POUYSSÉGUR, J. & BERK, B. C. Na⁺/H⁺ antiporter gene expression during monocytic differentiation of HL60 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 13485-13488, 1991.
- ROITMAN, C.; ROITMAN, I. & AZEVEDO, H. P. Growth of an insect trypanosomatid at 37°C in a defined medium. **J. Protozool.**, v. 19, p. 346-349, 1972.
- ROITMAN, I.; BRENER, Z.; ROITMAN, C. & KITAJIMA, E. W. Demonstration that *Leptomonas pessoai* GALVÃO, OLIVEIRA, CARVALHO & VEIGA, 1970, is a *Herpetomonas*. **J. Protozool.**, v. 23, p. 291-293, 1976.
- ROZENGURT, E. & MENDOZA, S. Monovalent ion fluxes and the control of cell proliferation in cultured fibroblasts. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 339, p. 175-190, 1980.
- ROZENGURT, E. Early signals in the mitogenic response. **Science**, v. 234, p. 161-166, 1986.
- SARDET, C.; COUNILLON, L.; FRANCHI, A. & POUYSSÉGUR, J. Growth factors induce phosphorylation of the Na⁺/H⁺ antiporter, a glycoprotein of 110KD. **Science**, v. 247, p. 723-726, 1990.
- SEMPPLICINI, A.; SPALUINS, A. & CANESSA, M. Kinetics and stoichiometry of the human red cell Na⁺/H⁺ exchanger. **J. Membrane Biol.**, v. 107, p. 219-228, 1989.
- SILVER, R. B.; FRINDT, G. & PALMER, L. G. Regulation of principal cell pH by Na⁺/H⁺ exchange in rabbit cortical collecting tubule. **J. Membrane Biol.**, v. 125, p. 13-24, 1992.

- SIMPSON, L. & BRALY, P. Synchronization of *Leishmania tarentolae* by hidroxyurea. **J. Protozool.**, v. 17, p. 511-517, 1970.
- SOLEIMANI, M., BOOKSTEIN, C.; McATEER, J.; HATTABAUGH, Y. J.; BIZAL, G. L.; MUSCH, M. W.; VILLEREAL, M.; RAO, M. C.; HOWARD, R. L. & CHANG, E. B. Effect of high osmolarity on Na⁺/H⁺ exchange in renal proximal tubule cells. **J. Biol. Chem.**, v.269, p. 15613-15618, 1994.
- STIERNBERG, J. LaBELLE, E. & CARNEY, D. H. Demonstration of a late amiloride-sensitive event as a necessary step in initiation of DNA synthesis by thrombin. **J. Cell. Physiol.**, v. 117, p. 272-281, 1983.
- THELEN, P., TSUCHIYA, T. & GOLDBERG, E. Characterization and mapping of a major Na⁺/H⁺ antiporter gene of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 6553-6557, 1991.
- THOMAS, E. M.; DE SOUZA, E. T.; ESTEVES, M. I. G.; ANGLUSTER, J. & DE SOUZA, W. *Herpetomonas samuelpessoai*: changes in cell shape and induction of differentiation by local anesthetic. **Exp. Parasitol.**, v. 51, p. 366-372, 1981a.
- THOMAS, E. M.; ESTEVES, M. J. G.; ANGLUSTER, J.; DE SOUZA, W. & JURKIEWICZ, A. Changes in cell shape and induction of cell differentiation in the protozoan *Herpetomonas samuelpessoai* by colinergic drugs. **Res. Comm. In Chem. Pathol. And Pharmacol.**, v. 34, p. 81-88, 1981b.
- TOBACK, F. G. Induction of growth in kidney epithelial in culture by Na⁺. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 77, p. 6654-6656, 1980.
- TSE, C. M.; BRANT, S. R.; WALKER, S.; POUYSSÉGUR, J. & DONOWITZ, M. Cloning and sequencing a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3). **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 9340-9346, 1992.
- TSE, M.; LEVINE, S.; YUN, C.; BRANT, S.; COUNILLON, L. T. & POUYSSÉGUR, J. Structure/function studies of the epithelial isoforms of the mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family. **J. Membrane Biol.**, v. 135, p. 93-108, 1993a.

- TSE, C. M.; LEVINE, S. A.; YUN, C. H. C.; BRANT, S. R.; POUYSSÉGUR, J.; MONTROSE, M. H. & DONOWITZ, M. Functional characteristics of a cloned epithelial Na^+/H^+ exchanger (NHE-3): resistance to amiloride and inhibition by protein kinase C. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 90, p. 9110-9114, 1993b.
- VAIRO, G.; ARGYRION, S.; BORDUN, A.; GONDA, T. J.; CRAGOE, E. J. & HAMILTON, J. A. Na^+/H^+ exchanger involvement in colony-stimulating factor-1-stimulated macrophage proliferation. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 16926-16939, 1990.
- VICKERMAN, K. The diversity of kinetoplastid flagellates. In: LUMSDEN, W.H.R., EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1976, v. 1, p. 1-34.
- VIGNE, P.; FRELIN, C. & LAZDUNSKI, M. The amiloride-sensitive Na^+/H^+ exchanger system in skeletal muscle cells in culture. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 9394-9400, 1982.
- WALL, S. M.; KRAUT, J. A. & MUALLEM, S. Modulation of Na^+/H^+ exchange activity by intracellular Na^+ , H^+ and Li^+ in IMCD cells. **Am. J. Physiol.**, v. 255, p. F331-F339, 1988.
- WARNOCK, D. G.; YANG, W. C.; HUANG, Z. Q. & CRAGOE, E. J. Interaction of chloride and amiloride with the renal Na^+/H^+ antiporter. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 7216-7221, 1988.
- WEINMAN, E. J. & SHENOLIKAR, S. Regulation of the renal brush border membrane Na^+/H^+ exchanger. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 55, p. 289-304, 1993.
- WRIGTH, E. M. & PEERCE, B. E. Identification and conformational changes of the intestinal proline carrier. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 14993-14996, 1984.