

**MODULAÇÃO DA MORFOGÊNESE FÚNGICA POR ESPERMINA VIA  
SINALIZAÇÃO AUXÍNICA E ATIVAÇÃO DO SISTEMA PRIMÁRIO DE  
TRANSPORTE DE PRÓTONS**

**ANTÔNIO JESUS DORIGHETTO COGO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO- UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
OUTUBRO - 2016**

**MODULAÇÃO DA MORFOGÊNESE FÚNGICA POR ESPERMINA VIA  
SINALIZAÇÃO AUXÍNICA E ATIVAÇÃO DO SISTEMA PRIMÁRIO DE  
TRANSPORTE DE PRÓTONS**

**ANTÔNIO JESUS DORIGHETTO COGO**

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.”

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO- UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
OUTUBRO – 2016**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia  
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

664 / 2017

Cogo, Antônio Jesus Dorighetto

Modulação da morfogênese fúngica por espermina via sinalização auxínica e ativação do sistema primário de transporte de prótons / Antônio Jesus Dorighetto Cogo. -- Campos dos Goytacazes, 2016.

x, 115 f. : il.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e Biotecnologia. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual.

Área de concentração: Biologia celular

Orientador: Façanha, Arnaldo Rocha

Bibliografia: f. 99-115

1. Bombas iônicas 2. Poliaminas 3. Transição dimórfica 4. *Yarrowia lipolytica* I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

II. Título

571.6  
C676mo

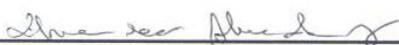
MODULAÇÃO DA MORFOGÊNESE FÚNGICA POR ESPERMINA VIA  
SINALIZAÇÃO AUXÍNICA E ATIVAÇÃO DO SISTEMA PRIMÁRIO DE  
TRANSPORTE DE PRÓTONS

**ANTÔNIO JESUS DORIGHETTO COGO**

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.”

Aprovada em 31 de outubro de 2016

Comissão examinadora

  
Profª Drª Zilma Maria Almeida Cruz (Doutora em Bioquímica) - UVV

  
Profª Drª Claudete Santa-Catarina (Doutora em Biotecnologia) - UENF

  
Prof Dr André de Oliveira Carvalho (Doutor em Biociências e Biotecnologia) - UENF

  
Profª Drª Anna Lvovna Okorokova Façanha (Doutora em Química Biológica) - UENF  
(Co-orientadora)

  
Prof Dr Arnaldo Rocha Façanha (Doutor em Química Biológica) – UENF  
(Orientador)

*Aos meus pais*

## AGREDECIMENTOS

Todo esse trabalho foi inspirado e aperfeiçoado pelos comentários iluminadores de meus orientadores, Drs. Anna Okorokova Façanha e Arnaldo Rocha Façanha. Muito obrigado pelas sugestões, conversas e paciência que me ajudaram no crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Lev Okorokov, muito obrigado por todas as sugestões e conversas. Pela inspiração e amor a ciência. Quando crescer, espero ser assim também.

Ao Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos, muito obrigado pela amizade e apoio. Agradeço pela paciência de ter me ensinado a trabalhar naquela caixa-preta.

Ao Prof. Dr. Marcelo Gomes e ao Dr. Paulo Sérgio pela disponibilidade e ajuda na determinação das concentrações de amônia.

Aos membros da banca: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zilma Maria Almeida Cruz, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudete Santa-Catarina e Prof. Dr. André de Oliveira Carvalho, agradeço imensamente pela disponibilidade.

Ao Dr. Evenilton Pessoa Costa, agradeço a disponibilidade em revisar a tese.

Aos membros do nosso grupo de leveduras e grandes amigos que passaram ou que ainda estão no LFBM: Keilla, Layz, Renan, Bárbara, Camila, Marcela, Larinne, Lívia e Mayara pela contribuição, por estarem sempre dispostos a ajudar e por tornarem a rotina do laboratório mais descontraída.

A todos os amigos de LBCT: Amanda, Luiz Alfredo, Brunna, Sávio, Juliana, Gideilde, Janiélio, Frederico, Raul, Enrico, Danilo, Letícia, Heloísa. Obrigado pelas discussões científicas, ajuda e pelos momentos de alegrias compartilhados.

A todos os demais amigos de trabalho (LFBM, LBCT e UEA) muito obrigado pelo apoio e bom convívio.

Aos técnicos do LFBM, Luiz, Valéria e Noil, muito obrigado por toda a ajuda e suporte.

Aos professores e demais funcionários do CBB, obrigado pelo apoio e convívio.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, agradeço por estarem sempre à disposição.

À UENF, CNPq, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares e amigos, muito obrigado pelo apoio e carinho. Me desculpe por algumas vezes não estar presente em momentos tão importantes.

Muito obrigado meu Deus pela fé, saúde e força de vontade de cada manhã no decorrer de todo o trabalho!

*“Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito.  
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã. Portanto,  
hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e,  
principalmente, viver”*

*Dalai Lama*

*“Tenha paciência com tudo que for insolúvel no seu coração  
e tente amar as perguntas - e a viver as perguntas”*

*Rainer Maria Rilke*

*“Os céus giram acima de você, exibindo-lhe suas glórias  
eternas, e, no entanto, seus olhos permanecem no chão”*

*Dante*

## SUMÁRIO

Índice de Figuras.....	VIII
Índice de Tabelas.....	XI
Lista de Abreviações.....	XII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 A morfogênese fúngica.....	17
1.2 A levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> como modelo.....	19
1.3 Fatores envolvidos no crescimento polarizado de hifas fúngicas....	20
1.4 Poliaminas como possíveis mediadores na morfogênese fúngica...	22
1.5 As H <sup>+</sup> -ATPases e o crescimento polarizado.....	25
1.6 A regulação das H <sup>+</sup> -ATPases por poliaminas.....	28
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Cepas, meio e condições de cultivos.....	31
3.2 Morfologia colonial e tamanho das franjas coloniais.....	31
3.3 Ensaio de invasão do ágar.....	32
3.4 Alcalinização extracelular.....	32
3.5 Microscopia eletrônica de varredura.....	32
3.6 Microscopia de fluorescência.....	33
3.7 Imunofluorescência.....	34
3.8 Obtenção das membrans totais de <i>Y. lipolytica</i> .....	35
3.9 Determinação do gradiente de H <sup>+</sup> ( $\Delta$ pH - transporte de H <sup>+</sup> ).....	36
3.10 Atividade hidrolítica das H <sup>+</sup> -ATPases.....	37
3.11 Determinação do fluxo protônico extracelular.....	38
3.12 Determinação do ácido indol-3-acético.....	38
3.13 <i>Western blotting</i> .....	39
3.14 Determinação da produção de amônia.....	39
3.15 Análise estatística.....	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 Spm e AIA induzem a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	42

4.2	Produção de ácido indol-3-acético (AIA) por <i>Y. lipolytica</i> .....	46
4.3	Ativação da P-H <sup>+</sup> -ATPase durante a morfogênese da <i>Y. lipolytica</i> ....	48
4.4	Spm e AIA induzem o fluxo de H <sup>+</sup> em células de <i>Y. lipolytica</i> .....	53
4.5	Alterações no pH ambiental durante a morfogênese da <i>Y. lipolytica</i>	54
4.6	Produção de amônia (NH <sub>3</sub> ) pelas células de <i>Y. lipolytica</i> .....	58
4.7	Morfologia vacuolar durante a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	59
4.8	ConA previne a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	68
4.9	Ativação da V-H <sup>+</sup> -ATPase durante a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> ....	74
6	DISCUSSÃO.....	81
7	CONCLUSÕES.....	97
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Via biossintética das poliaminas.....	23
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da determinação da velocidade inicial e amplitude máxima do transporte de H <sup>+</sup> em membranas de <i>Y. lipolytica</i> .....	37
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da montagem experimental para detecção de amônia.....	40
<b>Figura 4.</b> Curva de sensibilidade de detecção de moléculas de amônia (NH <sub>3</sub> ) pelo espectrofotômetro fotoacústico.....	41
<b>Figura 5.</b> Crescimento celular e transição morfogênica de <i>Y. lipolytica</i> .....	42
<b>Figura 6.</b> Spm induz a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	44
<b>Figura 7.</b> Bordas coloniais de <i>Y. lipolytica</i> .....	45
<b>Figura 8.</b> Sinalização de Spm via AIA-dependente durante a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	45
<b>Figura 9.</b> Morfologia das colônias de <i>Y. lipolytica</i> .....	46
<b>Figura 10.</b> Produção de AIA pelas células de <i>Y. lipolytica</i> .....	47
<b>Figura 11.</b> Exsudação de AIA no meio de cultura pelas células de <i>Y. lipolytica</i> ....	47
<b>Figura 12.</b> Modulação da atividade da P-H <sup>+</sup> -ATPase pela Spm.....	48
<b>Figura 13.</b> Spm estimula o transporte de H <sup>+</sup> da P-H <sup>+</sup> -ATPase durante a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	49
<b>Figura 14.</b> Spm estimula a atividade hidrolítica e a imuno-resposta da P-H <sup>+</sup> -ATPase durante a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	51
<b>Figura 15.</b> Ativação da P-H <sup>+</sup> -ATPase pela Spm durante a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	52
<b>Figura 16.</b> Spm reverte parcialmente a ação dos inibidores PCIB e TIBA na atividade da P-H <sup>+</sup> -ATPase.....	53

<b>Figura 17.</b> Spm e AIA estimulam o efluxo de H <sup>+</sup> <i>in vivo</i> durante a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	54
<b>Figura 18.</b> O pH ambiental é alcalinizado durante o desenvolvimento das colônias de <i>Y. lipolytica</i> .....	55
<b>Figura 19.</b> O vanadato (VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) previne a alcalinização ambiental durante o desenvolvimento das colônias de <i>Y. lipolytica</i> .....	55
<b>Figura 20.</b> Avaliação do pH ambiental durante o desenvolvimento das colônias de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas em diferentes indutores e/ou inibidores da morfogênese.....	57
<b>Figura 21.</b> Avaliação do pH ambiental em meio líquido durante a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	58
<b>Figura 22.</b> As células de <i>Y. lipolytica</i> produzem e exsudam amônia.....	59
<b>Figura 23.</b> Morfologia celular e vacuolar nas células de <i>Y. lipolytica</i> .....	61
<b>Figura 24.</b> Morfologia vacuolar das células de <i>Y. lipolytica</i> após 14 h de cultivo...	62
<b>Figura 25.</b> Morfologia vacuolar das células de <i>Y. lipolytica</i> após 20 h de cultivo...	63
<b>Figura 26.</b> Morfologia vacuolar das células de <i>Y. lipolytica</i> após 26 de cultivo.....	65
<b>Figura 27.</b> Morfologia vacuolar das células de <i>Y. lipolytica</i> após 36 h de cultivo...	66
<b>Figura 28.</b> Morfologia vacuolar das células de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas em meio sólido.....	67
<b>Figura 29.</b> ConA previne a morfogênese da <i>Y. lipolytica</i> .....	68
<b>Figura 30.</b> ConA previne a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> cultivada na presença de Spm e AIA.....	69
<b>Figura 31.</b> ConA previne a alcalinização ambiental durante o desenvolvimento das colônias de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas na presença de Spm ou AIA.....	70
<b>Figura 32.</b> ConA e Spm previnem a acidificação vacuolar em células de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas por 26 h.....	72
<b>Figura 33.</b> Os vacúolos de células de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas na presença ou na ausência de ConA ou Spm acidificam após 36 h.....	72
<b>Figura 34.</b> Acidificação vacuolar das células de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas por 36 h	73

<b>Figura 35.</b> Spm estimula a atividade da V-H <sup>+</sup> -ATPase durante a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	75
<b>Figura 36.</b> ConA inibe a atividade da P-H <sup>+</sup> -ATPase durante a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	77
<b>Figura 37.</b> ConA inibe a atividade da V-H <sup>+</sup> -ATPase durante a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	78
<b>Figura 38.</b> ConA inibe a imuno-resposta da subunidade B1/2 da V-H <sup>+</sup> -ATPase durante a morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> .....	79
<b>Figura 39.</b> Distribuição espacial das P- e V-H <sup>+</sup> -ATPases em células de <i>Y. lipolytica</i> .....	80
<b>Figura 40.</b> Esquema representativo do possível mecanismo de modulação da morfogênese por Spm em <i>Y. lipolytica</i> .....	96

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Ativação relativa da amplitude máxima ( $F_{max}$ ), velocidade inicial ( $V_0$ ) do transporte de $H^+$ , hidrólise de ATP e imuno-resposta da Pma1p em vesículas de membranas totais isoladas de células de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas por 14, 20 ou 26 h na presença ou ausência de 1 mM de Spm.....	50
<b>Tabela 2.</b> Razão da amplitude máxima ( $F_{max}$ ), velocidade inicial ( $V_0$ ) do transporte de $H^+$ , hidrólise de ATP e imuno-resposta da Pma1p em vesículas de membranas totais isoladas de células de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas por 14, 18, 20, 22 ou 26 h na presença ou ausência de 1 mM de Spm.....	52
<b>Tabela 3.</b> Ativação relativa da amplitude máxima ( $F_{max}$ ), velocidade inicial ( $V_0$ ) do transporte de $H^+$ e hidrólise de ATP da V- $H^+$ -ATPase em vesículas de membranas totais isoladas de células de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas por 14, 20 ou 26 h na presença ou ausência de 1 mM de Spm.....	76

## LISTA DE ABREVIACÃO

<b>ACMA</b>	6-Amino-6-cloro-2-metoxiacridina (“ <i>9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine</i> ”)
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>AFB</b>	<i>Auxin Singnaling F-Box</i>
<b>AHA</b>	Arabidopsis H <sup>+</sup> -ATPase
<b>AIA</b>	Ácido indol-3-acético
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATPase</b>	Adenosina trifosfatase
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino (“ <i>Bovine Serum Albumin</i> ”)
<b>CHA</b>	Ciclohexilamino
<b>CMAC</b>	<i>Chloromethylcoumarin</i>
<b>ConA</b>	Concanamicina A
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol (“ <i>4',6-diamino-2-phenylindole</i> ”)
<b>DCFDA</b>	Diacetato diclorofluoresceína (“ <i>dichlorofluorescein diacetate</i> ”)
<b>DFMA</b>	$\alpha$ -Difluorometilarginina (“ <i><math>\alpha</math>-difluoromethylarginine</i> ”)
<b>DFMO</b>	$\alpha$ -Difluorometilornitina (“ <i><math>\alpha</math>-difluoromethylornithine</i> ”)
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>DTT</b>	1,4-Ditiotreitol (“ <i>1,4-dithiothreitol</i> ”)
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetraacético (“ <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> ”)
<b>FITC</b>	Fluoresceína-5-isotiocianato (“ <i>fluorescein isothiocyanate</i> ”)
<b>F<sub>máx</sub></b>	Amplitude máxima
<b>G</b>	Gravidade
<b>GSNO</b>	<i>S-Nitroso glutathione</i>
<b>HEPES</b>	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
<b>LCFIS</b>	Laboratório de ciências físicas
<b>LCQ</b>	Laser de cascata quântica
<b>MGBG</b>	<i>Methylglyoxalbisguanylhydrazone</i>
<b>MOPS</b>	Ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico (“ <i>3-[N-morpholino] propanesulfonic acid</i> ”)
<b>NIH</b>	Instituto Nacional de Saúde (“ <i>National Institutes f Health</i> ”)
<b>NO</b>	Óxido nítrico (“ <i>Nitric Oxide</i> ”)
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino (“ <i>phosphate buffered saline</i> ”)
<b>PCIB</b>	Ácido $\alpha$ - <i>p</i> -(clorofenoxi) isobutírico (“ <i>p-chlorophenoxyisobutyric acid</i> ”)
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>P-H<sup>+</sup>-ATPase</b>	Próton ATPase do tipo P
<b>P<sub>i</sub></b>	Fosfato inorgânico
<b>PMA</b>	H <sup>+</sup> -ATPase da membrana plasmática (“ <i>Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase</i> ”)
<b>PMSF</b>	Fluoretro de fenilmetilsulfonil (“ <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> ”)

<b>PP2C</b>	Proteína fosfatase da família 2C ( <i>“Protein Phosphatase 2C”</i> )
<b>Put</b>	Putrescina
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RNS</b>	Espécies reativas de nitrogênio ( <i>“Reactive Nitrogen Species”</i> )
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio ( <i>“Reactive Oxygen Species”</i> )
<b>SAUR</b>	<i>Small Auxin Up-RNA</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio ( <i>“lauryl sulfate sodium salt”</i> )
<b>SIET</b>	<i>Scanning Ion-selective Electrode Technique</i>
<b>SNP</b>	<i>Sodium nitroprusside</i>
<b>Spd</b>	Espermidina
<b>Spm</b>	Espermina
<b>Thr</b>	Treonina (aminoácido)
<b>TIBA</b>	Ácido 2,3,5-triidobenzóico ( <i>“2,3,5-triiodobenzoic acid”</i> )
<b>TIR1</b>	<i>Transport Inhibitor Response 1</i>
<b>Tris</b>	Tris-hidroximetil-aminometano ( <i>“tris-hydroxymethyl-aminomethane”</i> )
<b>urf</b>	Unidade relativa de fluorescência
<b>V<sub>0</sub></b>	Velocidade inicial do transporte H <sup>+</sup>
<b>VMA</b>	H <sup>+</sup> -ATPase vacuolar ( <i>“Vacuolar Membrane H<sup>+</sup>-ATPase”</i> )
<b>VO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	Vanadato
<b>V-H<sup>+</sup>-ATPase</b>	Próton ATPase do tipo V
<b>YED</b>	Extrato de levedura e dextrose ( <i>“Yeast Extract Dextrose”</i> )
<b>ΔpH</b>	Gradiente de prótons através da membrana

## RESUMO

As poliaminas exercem o papel regulatório no crescimento e morfogênese das células eucarióticas. Apesar de avanços moleculares, os mecanismos de ação regulatória ainda não são compreendidos. A morfogênese fúngica é importante na otimização nutricional, contribuindo na colonização de novos habitats e interações parasitárias e simbióticas. Aqui, investigamos a modulação da morfogênese por espermina (Spm) no fungo dimórfico *Yarrowia lipolytica* e a possível participação de uma via de sinalização auxina-dependente e ativação dos sistemas primários de transporte de H<sup>+</sup>. A Spm e ácido indol-3-acético (AIA) exógenos induziram a transição levedura-hifa, a arquitetura e o padrão de invasão nas colônias de *Y. lipolytica*, enquanto que os inibidores da síntese de espermidina (CHA), da sinalização (PCIB) ou do transporte (TIBA) de auxina bloquearam essas respostas morfológicas. O efeito inibitório do CHA foi revertido pelo AIA, todavia o efeito dos inibidores PCIB ou TIBA não foi revertido pela Spm, indicando que Spm possa atuar *upstream* da via de sinalização de AIA. Mostramos que Spm aumenta a exsudação do AIA nas células de *Y. lipolytica*. Demonstramos que durante a morfogênese ocorre aumento gradativo na expressão e na atividade das bombas de H<sup>+</sup> de membrana plasmática e vacuolar (P- e V-H<sup>+</sup>-ATPase, respectivamente), e que Spm estimula ambas as H<sup>+</sup>-ATPases, principalmente no momento da transição levedura-hifa. Assim como na morfogênese, o estímulo da P-H<sup>+</sup>-ATPase foi prevenido em células tratadas com TIBA ou PCIB, mesmo na presença de Spm. Ainda, a determinação do fluxo de H<sup>+</sup> em células vivas mostrou que Spm e AIA aumentaram o efluxo de H<sup>+</sup>. Demonstramos a importância da ativação da V-H<sup>+</sup>-ATPases na acidificação e na forma vacuolar durante a morfogênese da *Y. lipolytica*. A formação dos vacúolos tubulares ao longo da hifa ocorreu após a acidificação e pela fusão dos pequenos vacúolos presentes nos estágios iniciais da morfogênese. O inibidor da V-ATPase, concanamicina A (ConA), interferiu na morfogênese, assim como na acidificação e nas atividades de ambas as bombas protônicas. Durante a morfogênese foi detectada a alcalinização ambiental, resultante da exsudação de amônia. Assim como CHA, PCIB ou TIBA, os inibidores de P- e V-ATPases (vanadato e ConA, respectivamente) preveniram a alcalinização ambiental. Dessa forma, esse estudo fornece uma evidência convincente da morfogênese fúngica modulada por Spm ser induzida por um mecanismo análogo ao crescimento ácido, descrito previamente na regulação de células vegetais.

**Palavras-chave:** Bombas iônicas, poliaminas, transição dimórfica, *Yarrowia lipolytica*.

## ABSTRACT

Polyamines exert regulatory role in the growth and morphogenesis of eukaryotic cells. Although molecular advances, mechanisms of regulatory action are not yet understood. Fungal morphogenesis is important in nutritional optimization, contributing to the colonization of new habits and parasitic and symbiotic interactions. Here, we investigated the modulation of morphogenesis by spermine (Spm) in the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, with a possible auxin-dependent signaling pathway and activation of primary transport of H<sup>+</sup> systems. The exogenous Spm and indole-3-acetic acid (IAA) induced the yeast-to-hyphae transition, the architecture and invasion pattern in *Y. lipolytica* colonies, whereas spermidine synthesis inhibitor (CHA), auxin signaling (PCIB) or transport inhibitors (TIBA) blocked these morphological responses. IAA reversed the inhibitory effect of CHA, whereas Spm did not reverse the PCIB or TIBA effect, indicating that Spm should act upstream of IAA signaling pathway. We showed that Spm increases the exudation of IAA in *Y. lipolytica* cells. We demonstrated that during morphogenesis occurs gradual increase in the expression and activity of plasma membrane and vacuolar H<sup>+</sup> pumps (P- and V-H<sup>+</sup>-ATPase, respectively) and Spm stimulates both H<sup>+</sup>-ATPases activities, especially in transition time point. As in morphogenesis, PCIB or TIBA treated-cells prevented the stimulation of P-H<sup>+</sup>-ATPase, even in the presence of Spm. Furthermore, the determination of the H<sup>+</sup> flux in living cells showed that Spm and IAA increased H<sup>+</sup> efflux. We demonstrated the importance of V-H<sup>+</sup>-ATPase activity on acidification and vacuolar dynamics during morphogenesis of *Y. lipolytica*. The formation of tubular vacuoles along the hyphae occurred after acidification and the fusion of vacuoles present in the early stages of morphogenesis. The inhibitor of V-ATPase, Concanamycin A (ConA), interferes with morphogenesis, as well as acidification and the activities of both proton pumps. During morphogenesis was detected environmental alkalinization resulting from the exudation of ammonia. As CHA, PCIB or TIBA, the P- and V-ATPases inhibitors (vanadate and conA, respectively) prevented environmental alkalinization. Thus, this study provides the first compelling evidence on the fungal morphogenesis and colony development as modulated by a Spm-induced acid growth mechanism analogous to those previously postulated for the multicellular growth regulation of plants.

**Key-words:** Ionic pumps, polyamines, fungal morphogenesis, *Yarrowia lipolytica*.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde as primeiras observações dos “animáculos” por Antonie van Leeuwenhoek, e o isolamento e cultivo por Robert Koch, os microrganismos têm sido genericamente considerados organismos unicelulares simples. Todavia, essas células são capazes de alterar sua morfologia e formar entidades multicelulares complexas, como colônias e biofilmes, capazes de coordenar e manter a sincronia metabólica e morfológica, demonstrando que não são tão simples assim (Cáp et al., 2012).

Tal dinâmica estrutural se assemelha em parte à complexidade encontrada em seres pluricelulares, compartilhando com estes vários mecanismos de controle morfogênico, dentre os quais, o crescimento polarizado representa uma propriedade fundamental de inúmeros tipos celulares. O fenômeno está presente na formação de hifas nos fungos, no desenvolvimento de pêlos radiculares e no alongamento do tubo polínico nas plantas, e até em células animais, no desenvolvimento e diferenciação das células neuronais. Todavia, eucariotos inferiores como as leveduras representam bons modelos biológicos na compreensão do estabelecimento e manutenção do crescimento polarizado por apresentar facilidade na manipulação genética, curto tempo de cultivo e um conjunto de vias metabólicas já bem conhecidas. Além disso, o crescimento polarizado de hifas fúngicas representa um processo-chave na virulência de diversos fungos patogênicos e fitopatogênicos. Em células animais, a *Candida albicans* representa o principal fungo patogênico oportunista humano, causadora da candidíase, além do *Cryptococcus neoformans* (cryptococcosis) e *Paracoccidioides brasiliensis* (paracoccidioidomicoses) entre outros (Pérez-Martín; Di Pietro, 2012; Gow et al., 2012). Entre os principais fungos fitopatogênicos dimórficos, estão o *Ustilago maydis* e *Mucor ramosus* (Flor-Parra et al., 2007; Brefort et al., 2009). Juntos, esses fungos são responsáveis por grandes prejuízos à saúde e à agricultura.

Por outro lado, o mesmo processo de crescimento polarizado é utilizado por fungos micorrízicos durante a colonização simbiótica das raízes vegetais (Ramos et al., 2008a,b, 2009). A colonização da rizosfera por fungos micorrízicos é capaz de promover o aumento da área radicular da planta e, desta forma, aumentar a captação de água e nutrientes, minimizar danos causados por agentes estressores e promover o desenvolvimento de uma agricultura sustentável. Nesta tese produzimos e integramos um conjunto de evidências que apontam para a existência de vias conservadas entre eucariotos que modulam a morfogênese de hifas fúngicas.

Tal linha de investigação é fundamental para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de controle da virulência e simbiose fúngicas, na busca de novos alvos

moleculares para drogas mais específicas e efetivas tanto na terapia antifúngica quanto na promoção do potencial de bioinóculos compostos por fungos promotores do crescimento vegetal. Adicionalmente, merece destaque o potencial ainda pouco explorado da utilização de fungos dimórficos na recuperação de áreas degradadas ou na biorremediação de solos exauridos pelo uso extrativista e considerado pobres pelos altos índices de alumínio e de outros metais, recorrente em todo o território nacional e em largas extensões de terras agricultáveis ao redor do globo.

### **1.1 A morfogênese fúngica**

O crescimento polarizado é um processo que envolve vários mecanismos intra e extra-celulares, compreendendo desde o remodelamento do citoesqueleto e migração de vesículas secretórias, até dinâmicas na matriz extracelular ainda pouco exploradas. Nos fungos e vegetais tais dinâmicas ocorrem em nível da parede celular se estende pela síntese e expansão predominante ou exclusivamente da região apical da célula. A formação de células tubulares é um processo amplamente difundido, ocorrendo desde procariotos até os organismos eucarióticos mais complexos. Particularmente, tal fenômeno integra a forma de crescimento dominante nos fungos que produzem hifas, que crescem na forma de leveduras de fissão e, de uma maneira específica, também nas leveduras de brotamento. Em plantas, o crescimento polarizado também é altamente difundido, mas restrito a poucos tipos de células. Por exemplo, ele é responsável pelo crescimento de tubos polínicos e pêlos radiculares em plantas superiores e, dentre as plantas não-vasculares, promove o crescimento da fase gametofítica de vários grupos. Em animais, o crescimento polarizado é observado na formação das células neuronais (Heath, 1990; Harris, 2011).

A grande plasticidade adaptativa observada em células fúngicas, que permite a sobrevivências em condições adversas e a colonização de novos habitats, certamente está relacionada com a capacidade de crescimento de hifas fúngicas. O crescimento das hifas auxilia na invasão de substratos, translocação direcional entre hospedeiros, consolidação de colônias, aquisição de nutrientes e a formação de uma matriz tridimensional (Sudbery, 2011; Brand, 2012).

Muitos fungos possuem a capacidade de transitar de levedura para pseudohifas e/ou hifas verdadeiras por um processo que envolve a indução de polarização celular. A formação de células filamentosas é prevalente e filogeneticamente mais ancestral que a forma leveduriforme, no entanto, muitos fungos podem alterar o tipo de crescimento, o qual deixa de ser isotrópico, observado

em células leveduriformes, para ser polarizado em hifas fúngicas (Harris, 2011). O estabelecimento da polaridade em hifas requer a síntese contínua de proteínas, lipídeos e parede celular, variações na dinâmica do citoesqueleto, pressão hidrostática interna, gradiente localizado de  $\text{Ca}^{2+}$ , transporte e acumulação de vesículas secretoras direcionadas para a ponta das hifas (Lew, 2011; Riquelme, 2013). A transição morfológica também é acompanhada por alterações na fisiologia e estrutura celular (revisado por Han et al., 2011; Lin et al., 2015) e representa uma resposta adaptativa altamente regulada a vários fatores ambientais, incluindo o hospedeiro.

Muitos fungos patogênicos humanos, dentre eles, *C. albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii* e *Blastomyces dermatitidis* são capazes de crescer como leveduras ou hifas filamentosas, por isso são normalmente denominados fungos dimórficos, embora sejam polimórficos, mais precisamente (Pérez-Martín; Di Pietro, 2012; Gow et al., 2012). Normalmente esses microrganismos se tornam virulentos após transitar para a forma filamentosa no interior do hospedeiro, por esse motivo a modulação da morfogênese tem sido constantemente estudada (recentemente revisado por Wang; Lin, 2012; Pérez-Martín; Di Pietro, 2012; Lin et al., 2015). A transição de levedura para hifa é induzida por uma variedade de fatores ambientais que refletem as condições do hospedeiro (temperatura de 37 °C, alteração do pH ambiental, presença de soro) que ativam uma complexa rede de vias de sinalização (Whiteway; Bachewick, 2007; Biswas et al., 2007; Han et al., 2011; Polke et al., 2016). Embora recentes trabalhos têm demonstrado que a transição levedura-hifa não é sempre necessária para a virulência em candidíases sistêmicas (Jacobsen et al., 2014), este fenômeno morfogênico continua a representar um importante fator de patogenicidade (Lo et al., 1997; Han et al., 2011). Destarte, o desenvolvimento de hifas é necessário para sobreviver a fagocitose das células de defesa (Vylkova et al., 2014), colonizar e formar biofilmes (Nobile; Mitchell, 2005), demonstrando a importância da morfogênese para a virulência dessa espécie.

O fungo *C. albicans* normalmente infecta e se dissemina pela circulação sanguínea na forma de leveduras, mas quando atinge o tecido-alvo inicia um processo de transição dimórfica gerando células filamentosas que capacitam o fungo a invadir e colonizar o tecido (Gow et al., 2012; Jacobsen et al., 2014). Assim como *C. albicans*, o fungo fitopatogênico *Ustilago maydis* também se torna patogênico após passar pelo mesmo processo de dimorfismo (Brefort et al., 2009; García-Pedrajas et al., 2010). A

morfogênese desses fungos é capaz de produzir grandes prejuízos, seja na saúde ou na agricultura.

## 1.2 A levedura *Yarrowia lipolytica* como modelo

A maioria dos dados referentes a morfogênese fúngica tem sido obtido a partir de células de *Saccharomyces cerevisiae* e *C. albicans*. No entanto, *S. cerevisiae* transita apenas de células leveduriformes para pseudohifas (cadeia alongada de células-filha, caracterizada pela constrição na região dos septos). Além disso, esse processo de conversão não é exatamente o mesmo que ocorre em outros fungos que formam hifas verdadeiras. O uso da *C. albicans* como modelo é dificultada por problemas relacionados a sua patogenicidade e manipulação genética, por tratar-se de um fungo assexual e diploide. Neste contexto, a *Yarrowia lipolytica* tem sido considerada um promissor modelo alternativo no estudo do dimorfismo celular, pois apresenta um eficiente sistema genético de transformação, com a formação de leveduras, pseudohifas e hifas verdadeiras (Domínguez et al., 2000). Além disso, esta levedura não-convencional possui várias semelhanças com *C. albicans* (classificada inicialmente como *Candida lipolytica*, depois *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica*). Adicionalmente, a *Y. lipolytica* oferece as vantagens de possuir o genoma haplóide e não ser patogênica, possivelmente devido a incapacidade de crescer em temperaturas superiores a 32 °C (Herrero et al., 1999; Nicaud, 2012).

A *Y. lipolytica* é um fungo pertencente ao grupo dos hemiascomicetos (uma subdivisão dos ascomicetos, a qual abriga a maioria das leveduras), e está entre as leveduras “não-convencionais” mais estudadas (Nicaud, 2012). Desde a sua descoberta, a *Y. lipolytica* já foi isolada a partir de várias fontes de matéria orgânica, desde queijos e salsichas até solos, lodo de esgoto e ambientes contaminados com óleo. A ocorrência desse microrganismo está relacionada à atividade lipolítica e proteolítica, além da capacidade de crescer em baixas temperaturas e em pHs ácidos, apesar de ser estritamente aeróbica (Fickers et al., 2011). A levedura possui interesse biotecnológico e industrial, na produção de ácido cítrico, ácido  $\alpha$ -cetoglutarato, alimentos agroindustriais, produtos farmacêuticos, na biotransformação de esteróis, no tratamento de resíduos, na produção de proteínas heterólogas, principalmente lipases (Fickers et al., 2011; Nicaud, 2012), na produção de biodiesel microbiológico (Tsigie et al., 2011) e, até mesmo, como agente biorremediador de solos e águas

contaminadas por poluentes tóxicos, como petróleo e metais pesados (Zinjarde et al., 2014).

Desde o primeiro trabalho que relata o estudo da morfologia em células de *Y. lipolytica* (Rodriguez; Domínguez, 1984), diversos fatores ambientais (incluindo pH, fonte de carbono e nitrogênio e concentração de oxigênio) foram identificados como indutores do crescimento polarizado dessas hifas (Pérez-Campo; Dominguez, 2001; Ruiz-Herrera; Sendandreu, 2002; Bellou et al., 2014). Análises de microarranjo e proteômica aprofundaram o conhecimento detectando vários genes e proteínas relacionados com a morfogênese da célula (Morín et al., 2007; Morales-Vargas et al., 2012). O genoma inteiramente sequenciado e a disponibilidade de eficientes técnicas de transformação genéticas tem proporcionado grandes avanços na elucidação de vias de sinalização e fatores de transcrição envolvidos na morfogênese de *Y. lipolytica* (Cervantes-Chavez et al., 2006; Martinez-Vazquez et al., 2013). Todos esses fatos evidenciam o potencial deste fungo como modelo em estudos da morfogênese fúngica. Além disso, o microrganismo também tem sido adotado como modelo estratégico em estudos do metabolismo de alcanos e ácidos graxos, do complexo mitocondrial, na secreção de proteínas, na dinâmica de peroxissomos e na acumulação e produção de lipases (Beopoulos et al., 2009; Nicaud, 2012).

### **1.3 Fatores envolvidos no crescimento polarizado de hifas fúngicas**

As condições exógenas e endógenas que induzem e influenciam a morfogênese em fungos dimórficos são extremamente variáveis. Fatores como temperatura, pH, concentração de gases atmosféricos ou a presença de compostos específicos no meio de cultivo, incluindo as fontes de carbono e nitrogênio podem induzir a morfogênese (Ruiz-Herrera; Sentandreu, 2002; Szabo; Stofanikova, 2002; Han et al., 2011). O pH ambiental, por exemplo, representa um fator importante na transição dimórfica, pois em *Y. lipolytica*, assim como em *C. albicans*, as células crescem como leveduras em pH ácido, enquanto meios cujo pH esteja neutro ou básico, favorecem o crescimento de hifas (Ruiz-Herrera; Sentandreu, 2002). No nível gênico, foi estabelecido que a sinalização por pH é regulada por uma via chamada Pal em fungos filamentosos e Rim em leveduras (recentemente revisado por Blachin-Roland, 2013).

Além dos fatores presentes no meio, os microrganismos também produzem substâncias envolvidas na regulação da morfogênese. A sincronia no crescimento e na diferenciação celular requer necessariamente a comunicação entre as células, a

qual ocorre pela produção e liberação de substâncias *quorum sensing*. Quanto maior a densidade da população, maior será o acúmulo e efetividade dessas moléculas (Albuquerque; Casadevall, 2012). Os fungos podem secretar moléculas *quorum sensing* como o farnesol, tirosol, feniletanol e o triptofol (Wongsuk et al., 2016). Uma das moléculas mais estudadas em fungos dimórficos é o farnesol, descrito como um bloqueador na transição levedura-hifa em altas densidades de células, até mesmo na presença de efetores da filamentação (Han et al., 2011). Além da morfogênese, as moléculas *quorum sensing* são importantes na formação de biofilmes (diversas moléculas são produzidas a fim de controlar a população e a morfologia da comunidade do biofilme) e patogênese (Wongsuk et al., 2016).

O hormônio auxínico ácido indol-3-acético (AIA) é outro efector da morfogênese. Interessantemente, a presença de AIA induz a morfogênese em *S. cerevisiae* mediada pela transição levedura-pseudohifa (Prusty et al., 2004) e o crescimento de hifas em *C. albicans* (Rao et al., 2010). O AIA é o hormônio vegetal mais estudado, no entanto microrganismos também são capazes de sintetizá-lo. Em fungos, por exemplo, a síntese de AIA tem sido proposta como um metabólito do triptofano, apesar de existirem sugestões que indicam vias biossintéticas independentes de triptofano em leveduras (Rao et al., 2010).

Em conformidade, Dutra (2010) e Lobão (2012) demonstraram que pequenas concentrações de AIA (pmol) são capazes de promover o crescimento polarizado de hifas fúngicas de *Y. lipolytica*. Além disso, aqueles autores determinaram a produção de compostos indólicos durante a transição, bem como a ativação no transporte de H<sup>+</sup> e o aumento na expressão das P-H<sup>+</sup>-ATPases em células de *Y. lipolytica* durante a morfogênese induzida por AIA, sugerindo a existência de uma via de transição auxina-dependente e ativação da P-H<sup>+</sup>-ATPase.

Radicais livres, e em particular, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), tais como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o óxido nítrico (NO), respectivamente, também são moléculas sinalizadoras amplamente reconhecidas em organismos eucarióticos. Em *C. albicans*, por exemplo, a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece ser um pré-requisito no crescimento de hifas e no escape dos fagolisossomos de macrófagos (Patterson et al., 2013). Além disso, as ROS também induzem variabilidade genética, promovem a morte celular e possivelmente regulam o desenvolvimento de biofilmes em microrganismos (Cáp et al., 2012). A interação de NO e ROS também pode gerar outras RNS, capazes de produzir efeitos danosos na célula. A produção de NO também tem sido associada à defesa nos organismos

superiores aos microrganismos patogênicos, apesar de existirem evidências de adaptações contra essa molécula (Collette et al., 2014).

Interessantemente, o tratamento de leveduras com doador de NO (*S-nitroso glutathione*, GSNO) foi suficiente para mimetizar os efeitos da restrição calórica e aumentar a longevidade celular (Li et al., 2011). Em *Y. lipolytica*, pequenas concentrações (25  $\mu\text{M}$ ) de outro doador de NO (*Sodium nitroprusside*, SNP) foi capaz de estimular a morfogênese, enquanto altas concentrações (100  $\mu\text{M}$ ) bloquearam a transição e inibiram o crescimento celular (Dutra, 2010; 2016). A produção de NO também é apontada como uma possível resposta na cascata de sinalização regulada por auxina. Zandonadi e colaboradores (2010) demonstraram que doadores de NO (SNP ou GSNO) ativam, aproximadamente em três vezes, o transporte de  $\text{H}^+$  de P-H<sup>+</sup>-ATPase em raízes de milho durante o alongamento celular mediado por 20 mg L<sup>-1</sup> de ácido húmico ou 100 pmol de AIA.

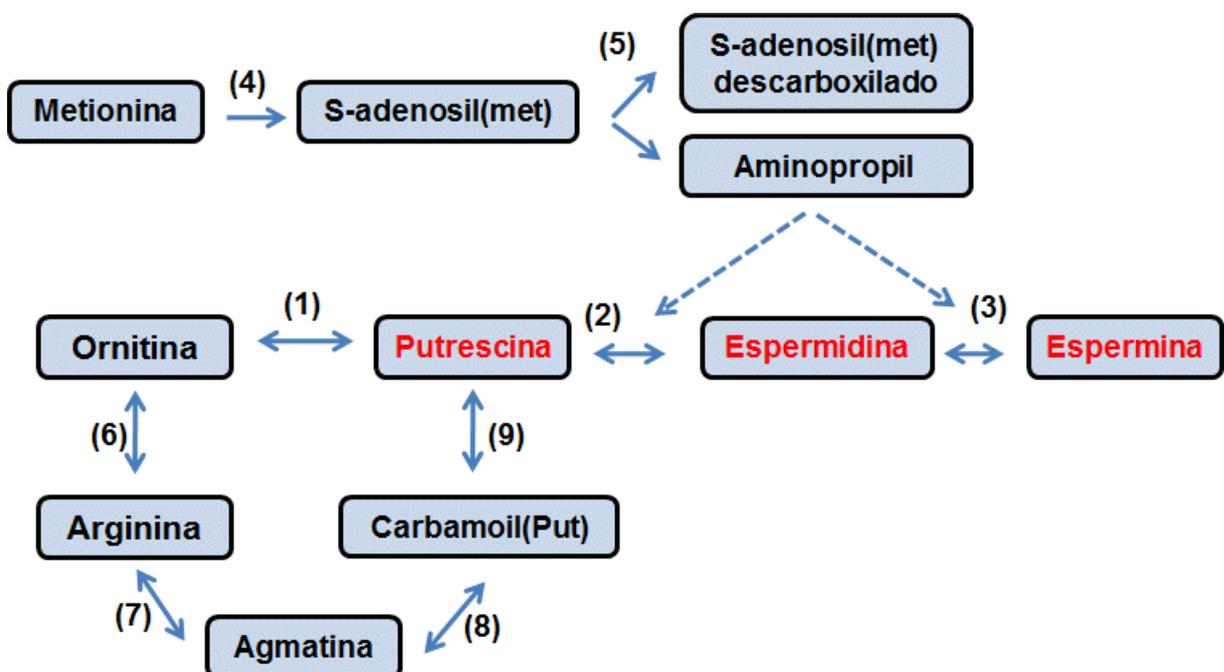
Diferentes fontes de nitrogênio, especificamente amônia ( $\text{NH}_3$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), também são considerados fatores que modulam a morfogênese fúngica, pois a diferenciação celular requer baixas concentrações de amônio, por isso dependem da presença de amônio permeases (Lee et al., 2012). Além disso, durante a formação de colônias de *S. cerevisiae* ocorre a produção de amônia volátil, a qual modula a mudança do pH ambiental e atua como um sinalizador na diferenciação celular (Palková et al., 1997; Vopalenska et al., 2010; Palková et al., 2014; Palková; Váchová, 2016). A alcalinização e a diferenciação celular também são acompanhadas pela produção de amônia em *C. neoformans* (Lee et al., 2012) e *C. albicans* (Vylkova et al., 2011; 2014). Em *C. albicans*, inclusive, a amônia contribui diretamente na patogênese do microrganismo, pois altera o pH ambiental e induz a filamentação, até mesmo do interior de fagolisossomos de macrófagos (Vylkova et al., 2011; 2014).

#### **1.4 Poliaminas como possíveis mediadores na morfogênese fúngica**

As poliaminas são moléculas policatiônicas, alifáticas, de baixo peso molecular, com carga positiva em dois ou mais grupos amino ( $\text{NH}_3^+$ ), presentes em todos os organismos vivos e em praticamente todos os compartimentos celulares (Kaur-Sawhney et al., 2003). Muito do que sabemos hoje sobre as poliaminas, devemos aos pesquisadores Herbert Tabor e Celia White Tabor, os quais iniciaram juntos no *National Institutes of Health* (NIH, EUA) os estudos pioneiros com as poliaminas em 1952 e logo se tornaram autoridades nas rotas e enzimas de biossíntese e nas funções das poliaminas nos microrganismos (Kresge et al., 2007). As funções, como

estabilidade da cromatina, expressão gênica, transcrição e transdução de sinais, regulação do ciclo celular, manutenção da mitocôndria, proliferação celular, sequestro de radicais livres, estabilidade de membranas e de canais iônicos foram descritas por eles (Tabor; Tabor, 1984, 1985; Kuznetsov; Shevyakova, 2007).

A putrescina (Put) é a primeira poliamina a ser sintetizada em qualquer ser vivo e serve de substrato para a síntese de espermidina (Spd) e espermina (Spm). A Put é produzida a partir da ornitina pela enzima ornitina descarboxilase (ODC, EC 4.1.1.17). Outros organismos, principalmente bactérias e plantas, utilizam uma segunda via, a partir da arginina (Figura 1). Nesse caso, a arginina é transformada em agmatina e a conversão da agmatina a Put requer duas enzimas distintas: a agmatina iminohidrolase (AIH, EC 3.5.3.12) e a N-carbamoilputrescina amidohidrolase (NCPAH, EC 3.5.1.53). No entanto, a via da ornitina descarboxilase normalmente é a mais ativa. As poliaminas Spd e Spm, por sua vez, são sintetizadas por sucessivas adições de um grupo aminopropil na Put (Figura 1). A adição do primeiro grupo origina a Spd, pela espermidina sintase (SPDS, EC 2.5.1.16), a adição do segundo grupo é catalisada pela espermina sintase (SPMS, EC 2.5.1.22). O aminopropil é formado pela descarboxilação da S-adenosilmetionina pela enzima S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC, EC 4.1.1.50) (Figura 1) (Kuznetsov; Shevyakova, 2007).



**Figura 1. Via biossintética das poliaminas.** (1) Ornitina descarboxilase; (2) Espermidina sintase; (3) Espermina sintase; (4) S-adenosil metionina sintase; (5) S-adenosil metionina descarboxilase; (6) Arginase; (7) Arginina descarboxilase; (8) Agmatina iminohidrolase; (9) N-carbamoilputrescina amidohidrolase. Adaptado de Tabor & Tabor (1985).

Assim como observado com a auxina endógena AIA, os níveis celulares de poliaminas também são regulados por um controle fino e integrado da biossíntese, do transporte e da degradação dessas moléculas. Em *Escherichia coli*, por exemplo, aproximadamente 0,6% do número total de genes estão relacionados à homeostase das poliaminas (Igarashi; Kashiwagi, 1999). Em microrganismos eucarióticos, como *S. cerevisiae*, existem quatro tipos de proteínas envolvidas na captação específica ou preferencial de poliaminas (Dur3, Sam3, Gap1 e Agp2), sendo os transportadores Sam3 e Dur3 os que mais contribuem (Uemura et al., 2007). Neste microrganismo, existem também cinco proteínas envolvidas no efluxo das poliaminas (Tpo1, Tpo2, Tpo3, Tpo4 e Tpo5), em que Tpo1 e Tpo5 são os transportadores mais ativos (Igarashi; Kashiwagi, 2010), além de um transportador, Uga4, localizado na membrana vacuolar (Kashiwagi; Igarashi, 2011).

A atividade biológica das poliaminas está relacionada à sua natureza catiônica, pois são capazes de interagir com macromoléculas de carga negativa, como ácidos nucléicos, fosfolipídeos e proteínas (Kuznetsov; Shevyakova, 2007) que podem causar alterações em níveis celulares durante o desenvolvimento vegetal. Dessa forma, algumas vezes as poliaminas são descritas como fitohormônios. Todavia, a concentração das poliaminas nos vegetais ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M) é muito superior aos fitohormônios ( $10^{-13}$  a  $10^{-7}$  M), sugerindo a atuação como possíveis mediadores intracelulares (Kaur-Sawhney et al., 2003; Kuznetsov; Shevyakova, 2007). Assim como ocorre nas plantas, as alterações endógenas de poliaminas também são observadas na transição levedura-hifa em *Y. lipolytica* (Guevara-Olvera et al., 1993), *P. brasiliensis* (San-Blas et al., 1997), *C. albicans* (Ueno et al., 2004) e *P. marneffeii* (Kummasook et al., 2013). Alguns estudos ainda sugerem diferenças entre as poliaminas na morfogênese, em que a Put atuaria somente como um intermediário (Valdés-Santiago et al., 2010; Kummasook et al., 2013).

Alguns estudos desenvolvidos em plantas também têm sugerido uma possível ligação entre as poliaminas e a produção de NO (Tun et al., 2006; Yamasaki; Cohen, 2006), além da existência de rotas metabólicas moduladas por ambas as moléculas, como a atividade da enzima nitrato redutase (Rosales et al., 2011). Em células animais também são descritos aumento na produção de NO a partir do decréscimo nos níveis celulares de Spm (Chaturvedi et al., 2014), sugerindo uma possível relação entre ambos os compostos.

## 1.5 As H<sup>+</sup>-ATPases e o crescimento polarizado

Durante a morfogênese fúngica, além da morfologia, as células também passam por mudança metabólica (Han et al., 2011), formação de gradiente de pH e campo elétrico ao longo hifa (Harold, 1990; Chang; Minc, 2014) e mudanças na pressão osmótica para permitir a expansão celular (Lew, 2011; Riquelme, 2013). Em todos esses processos, a modulação da homeostase iônica realizada por transportados primários de H<sup>+</sup>, principalmente pelas P- e V-H<sup>+</sup>-ATPases, parece desenvolver função crucial no desenvolvimento correto das hifas fúngicas.

As P-ATPases representam uma grande família de proteínas de membranas que acoplam a hidrólise de ATP com o transporte de cátions ou outros compostos, como fosfolipídeos, através da membrana. Durante o ciclo catalítico, um intermediário aspartil fosfato é formado, por isso recebe o nome de “P-type” (Morsomme; Boutry, 2000; Palmgren; Nissen, 2011). O grupo das P-H<sup>+</sup>-ATPases são encontradas exclusivamente na membrana plasmática de células fúngicas e vegetais e são reguladas transcricional e pós-transcricionalmente por um grande número de fatores ambientais, apesar da regulação possuir algumas propriedades distintas entre os organismos (revisado por Portillo, 2000; Kühlbrandt, 2004).

Em células fúngicas, a P-H<sup>+</sup>-ATPase (Pma1p) é usualmente considerada como a proteína mais abundante da membrana plasmática. Em hifas de *Neurospora crassa*, estima-se que só as enzimas desta classe de bombas iônicas consumam cerca de 38 a 52% de todo o ATP produzido pela célula (Gradmann et al., 1978). O substrato da P-H<sup>+</sup>-ATPase é MgATP e a hidrólise de cada molécula de ATP é acoplado ao transporte um H<sup>+</sup> (Morsomme; Boutry, 2000). O bombeamento de H<sup>+</sup> produz uma força eletrogênica, por meio da formação do potencial de membrana e do gradiente de pH, capaz de dirigir o transporte de vários solutos e íons através da membrana. O potencial de membrana supre a energia necessária para o co-transporte de solutos H<sup>+</sup>-dependente, como a glicose, ativa canais e transportadores secundários da membrana plasmática, regula o pH citoplasmático e periférico e produz energia necessária para a exsudação de ânions orgânicos produzidos durante a fermentação celular (Goffeau; Slayman, 1981; Pedersen; Carafoli, 1987; Palmgren; Nissen, 2011).

As P-H<sup>+</sup>-ATPases surgem como um alvo no estudo do crescimento de hifas fúngicas por assumirem um papel central na clássica teoria do crescimento ácido, a qual oferece um robusto mecanismo para o crescimento polarizado de células vegetais pela ativação dessa enzima. Esse mecanismo, se baseia na ativação do bombeamento de H<sup>+</sup> pela P-H<sup>+</sup>-ATPase induzido por ação hormonal da auxina

(revisado por Rayle; Cleland, 1992; Hager, 2003). A acidificação do apoplasto leva a um afrouxamento da parede celular, pela ativação de hemicelulases, e a hiperpolarização da membrana plasmática, induzida pela captação de  $K^+$ . Essa entrada de  $K^+$  causa alterações osmóticas seguidas pelo influxo de água a partir das aquaporinas da membrana plasmática, favorecendo o alongamento celular (revisado por Morsomme; Boutry, 2000; Hager, 2003).

Assim como nas células vegetais, existem evidências que sugerem uma importância análoga das P-H<sup>+</sup>-ATPases no crescimento polarizado de hifas fúngicas: 1) a formação de um gradiente de pH e um campo elétrico no estabelecimento da polaridade celular e na regulação da dinâmica dos componentes do citoesqueleto requeridos no crescimento polarizado (Harold, 1990; Minc; Chang, 2010); 2) aumento transiente no pH intracelular antes da transição morfológica em *C. albicans* (Stewart et al., 1988) e *N. crassa* (Robson et al., 1996); 3) aumento na atividade e expressão de Pma1p durante a morfogênese de *C. albicans* (Monk et al., 1993). Além disso, Ramos e colaboradores (2008a) demonstraram a presença de oscilações espaciais e temporais no fluxo de H<sup>+</sup> em hifas de fungos micorrízicos durante os eventos iniciais da simbiose. Em outro trabalho, os autores sugerem uma distribuição assimétrica das P-H<sup>+</sup>-ATPases ao longo da hifa fúngica, produzindo uma sinalização protônica capaz de manter o crescimento polarizado durante a colonização radicular pelas hifas fúngicas (Ramos et al., 2008b). Tomadas em conjunto, tais evidências indicam que células fúngicas e vegetais compartilham similaridades mecânicas no controle da homeostase iônica e da energética celular durante a modulação do crescimento polarizado.

A V-H<sup>+</sup>-ATPase, por sua vez, é outra enzima componente do sistema de transporte primário de H<sup>+</sup>, ATP-dependente, mas esta é encontrada em praticamente todas as células eucarióticas. Ela normalmente está localizada nas membranas de organelas intracelulares, embora também seja relatada em membrana plasmática de alguns tipos celulares (Holliday, 2014). A V-H<sup>+</sup>-ATPase é a proteína predominante na membrana vacuolar e responsável pela regulação do pH dos compartimentos intracelulares. O controle do pH desses compartimentos é crucial no tráfego correto de membranas, na degradação de proteínas e no transporte acoplado a pequenas moléculas. Em lisossomos e nos vacúolos de células fúngicas e vegetais, o pH ácido em torno de 5 é útil na quebra de macromoléculas por hidrolases ácidas como proteases, glicosidases, lipases, nucleases e fosfatases. Além disso, a V-H<sup>+</sup>-ATPase também regula o pH citoplasmático por captar cátions como Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Cd<sup>2+</sup> por um

sistema antiporte  $H^+$ -dependente (revisado por Beyenbach; Wieczorek, 2006; Toei et al., 2010).

A descoberta de ATPases vacuolares em fungos (Kakinuma et al., 1981; Bowman; Bowman, 1982; Okorokov et al., 1982; 1983ab) despertou o interesse por essas bombas protônicas e em pouco tempo, obteve-se a purificação de ATPases vacuolares em células animais, vegetais e fúngicas (revisado por Beyenbach; Wieczorek, 2006). Pelo fato dessas enzimas serem bombas protônicas localizadas em endomembranas, similares em diversos tipos celulares, possuir um perfil de inibição comum e não apresentar um intermediário covalente fosforilado, as ATPases vacuolares foram classificadas como a terceira família de ATPases, ao lado das F- e P-ATPases, denominadas V-ATPases (Pedersen; Carafoli, 1987). Por transportar  $H^+$  em todas as células eucarióticas, elas também são chamadas de V- $H^+$ -ATPases.

A enzima é estrutural e mecanisticamente similar às subunidades  $F_1$  e  $F_0$  das ATP sintases, pois são grandes proteínas, formadas por um complexo de multisubunidades periférico responsável pela hidrólise de ATP ( $V_1$ ) e um domínio integral de membrana responsável por transportar  $H^+$  por um mecanismo de rotação ( $V_0$ ). No entanto, diferente das F-ATPases, as V-ATPases não sintetizam ATP a partir de ADP e fosfato, em condições fisiológicas. O domínio  $V_1$  contém oito subunidades (A-H), com alguns deles apresentando múltiplas cópias, enquanto o domínio  $V_0$  contém seis diferentes subunidades (a,c,c'',d,e e Ac45 em mamíferos e a,c,c',c'',d,e em leveduras) (Kane, 2006; Forgac, 2007; Holliday, 2014).

A regulação da V- $H^+$ -ATPase envolve uma dissociação reversível dos componentes  $V_1$  e  $V_0$ . Esse processo, inicialmente descrito em leveduras (Kane, 1995), é desencadeado por falta de glicose, no entanto diversas vias regulatórias (incluindo RAVE/rabconectina, aldolase, fosfatidilinositol-3-quinase e proteína quinase A) utilizam esse processo para descrever a modulação da enzima (revisado por Holliday, 2014). No entanto, existem outros mecanismos adicionais de regulação, como o controle diferencial do pH nos compartimentos intracelulares modulado pela eficiência no transporte de  $H^+$  e hidrólise de ATP pelas V-ATPases. A eficiência do complexo enzimático contendo a isoforma Vph1p (subunidade a na membrana vacuolar) é 4-5 vezes maior que a enzima contendo a isoforma Stv1p (subunidade a na membrana do complexo de Golgi) (Kawasaki-Nishi et al., 2001). Outro mecanismo propõe que, ao invés de uma dissociação/reassociação dos complexos  $V_1$  e  $V_0$ , as alterações na concentração de glicose extracelular causariam mudanças bioquímicas

nas subunidades A e B da enzima, alterando a atividade da mesma (Ribeiro et al., 2012).

Assim com a P-H<sup>+</sup>-ATPase, a V-H<sup>+</sup>-ATPase desempenha importante papel na manutenção do crescimento polarizado de hifas fúngicas. Bowman e colaboradores (2000) observaram que mutantes *vma-1* (subunidade A) de V-H<sup>+</sup>-ATPase apresentaram inibição do crescimento das hifas e a indução de múltiplas ramificações em *N. crassa*. Outro trabalho demonstrou que a subunidade Vma1p é essencial na acidificação vacuolar, na manutenção do crescimento polarizado de hifas e na virulência de *C. albicans* (Poltermann et al., 2005).

A V-H<sup>+</sup>-ATPase também é responsável pela energização da entrada no vacúolo de íons/solutos, e conseqüentemente de água, com a formação da pressão de turgor, a força motriz da expansão celular. A atividade desta enzima também é responsável pela mobilização de vesículas que carregam substâncias cruciais para a síntese da parede celular. Numa perspectiva mais abrangente, as V-ATPases energizam transportadores secundários de soluto na membrana vacuolar e em outras endomembranas, regulando o *status* nutricional e a homeostase iônica celular, além de exercer uma importante função na rede trans-Golgi, a qual afeta a síntese e o tráfego de componentes da parede celular em células vegetais (Brüx et al., 2008).

### **1.6 A regulação das H<sup>+</sup>-ATPases por poliaminas**

Muitos dos trabalhos que relatam o envolvimento de poliaminas e H<sup>+</sup>-ATPases foram realizados em células vegetais, mas todos as evidências suportam uma modulação nas atividades das H<sup>+</sup>-ATPases que poderiam ser conservadas também em outros organismos. Em células vegetais, a Spm se destacou ao exercer uma ação mais específica sobre a regulação da atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase. A incubação de raízes de milho em 0,2 mM Spm por 1 h aumentou aproximadamente duas vezes a atividade hidrolítica da enzima e induziu a associação da proteína 14-3-3 com o domínio C-terminal não fosforilado da P-H<sup>+</sup>-ATPase, sugerindo um possível mecanismo de regulação da enzima por Spm. Além disso, os inibidores da síntese de poliaminas (DFMO, CHA e MGBG) reduziram significativamente a atividade hidrolítica da bomba protônica (Garufi et al., 2007).

Por outro lado, o uso de micro-eletrodos não-invasivos, sensíveis às variações de H<sup>+</sup> da rizosfera demonstrou que as poliaminas inibiram o efluxo de H<sup>+</sup> nas regiões de maturação e alongamento em raízes de milho pré-tratadas por 1 h com Put, Spd ou Spm (Pandolfi et al., 2010). Adicionalmente, a análise das atividades de P- e V-H<sup>+</sup>-

ATPases na embriogênese de *Araucaria angustifolia* induzidas por poliaminas demonstrou uma regulação diferencial na atividade destas enzimas, enquanto Put estimulou as atividades de P- e V-H<sup>+</sup>-ATPases, Spd e Spm reduziram as atividades em ambas as enzimas (Dutra et al., 2012).

Outro estudo envolvendo os efeitos das poliaminas no fluxo protônico, demonstrou que a adição de 1 mM de qualquer uma das poliaminas (Put, Spd e Spm) causou uma substancial despolarização na membrana plasmática de raízes de ervilha. Dentre as poliaminas analisadas, Spm foi a única que apresentou um efeito dual, pois em baixas concentrações (0,1 mM) induziu um transiente efluxo de H<sup>+</sup> e uma pequena, mas significativa, hiperpolarização da membrana, enquanto altas concentrações (1 mM) causaram a despolarização. A adição das demais poliaminas resultou apenas na despolarização da membrana. Os autores sugeriram que as alterações observadas no potencial de membrana após a adição das poliaminas foi causada por mudanças nas atividades da P-H<sup>+</sup>-ATPase (Pottossin et al., 2014).

A atividade da V-H<sup>+</sup>-ATPase também apresentou envolvimento na homeostase de poliaminas em células fúngicas, pois o potencial de membrana gerado pela enzima permite o transporte e o acúmulo de poliaminas em compartimentos intracelulares. O uso de inibidores de V-H<sup>+</sup>-ATPase impediu o transporte e o acúmulo de Spm em vesículas vacuolares de *S. cerevisiae* (Kakinuma et al., 1992). Esses dados em conjunto, sugerem que as poliaminas podem modular a atividade das bombas de prótons, e em contrapartida, as poliaminas se valem da atividade das bombas no controle de sua homeostase.

A partir dessas evidências e de nossos estudos preliminares do efeito de Spm na morfogênese de *Y. lipolytica*, os quais indicavam a indução da transição levedura-hifa e a ativação da P-H<sup>+</sup>-ATPase (Cogo, 2013), postulamos a existência de uma via reguladora da transição levedura-hifa baseada numa modulação do sistema de transporte iônico transmembrana capaz de gerar oscilações localizadas de íons requeridas na ativação da morfogênese fúngica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Elucidar os mecanismos bioquímicos envolvidos na morfogênese em *Y. lipolytica* modulados por Spm, testando a hipótese da regulação ocorrer por uma via de sinalização auxina-dependente envolvendo uma ativação coordenada dos sistemas primários de transporte de prótons.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar se os efeitos de Spm e AIA exógenos sobre a morfogênese de *Y. lipolytica* são fenômenos independentes ou se possuem alguma interdependência;
- Analisar o efeito de inibidores de vias auxínicas (PCIB e TIBA) e da síntese de espermidina (CHA) sobre a transição dimórfica levedura-hifa e no fenótipo das colônias de *Y. lipolytica*;
- Determinar a atividade e expressão dos sistemas primários de transporte de prótons (P- e V-H<sup>+</sup>-ATPase) durante a morfogênese induzida por Spm;
- Determinar o efeito concomitante de Spm e os inibidores de auxina (PCIB ou TIBA) nas atividades das H<sup>+</sup>-ATPases da membrana plasmática;
- Determinar a fluxo de H<sup>+</sup> *in vivo* nas células crescidas na presença ou ausência de AIA ou Spm;
- Determinar a concentração de AIA endógena e exsudada por células crescidas na presença de Spm;
- Acompanhar a alteração do pH ambiental em células crescidas na presença ou ausência dos indutores e inibidores da morfogênese;
- Determinar a produção de amônia (NH<sub>3</sub>) nas células crescidas na presença ou ausência de Spm, AIA ou PCIB;
- Acompanhar a morfologia e a acidez dos vacúolos durante a morfogênese fúngica de *Y. lipolytica* na presença ou ausência de Spm ou AIA;
- Determinar os efeitos de ConA sobre a morfogênese de *Y. lipolytica*;
- Prover novos *insights* sobre o papel da V-H<sup>+</sup>-ATPase na dinâmica dos vacúolos, por meio dos efeitos da ConA sobre a acidez vacuolar;
- Determinar se há interdependência entre as atividades dos transportadores primários de prótons (P- e V-H<sup>+</sup>-ATPase) durante a morfogênese fúngica;

- Imunolocalizar as P- e V-H<sup>+</sup>-ATPases em células (leveduras e hifas) de *Y. lipolytica*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cepas, meio e condições de cultivos

A cepa *Yarrowia lipolytica* utilizada foi JM-12 (*MatB leu2-35 lys5-12 ura3-18*), cedida gentilmente pelo professor Angel Domínguez (Universidade de Salamanca, Espanha). A cepa foi rotineiramente mantida em meio YED (1% extrato de levedura, 1% glicose e 2% agar), suplementado com leucina, lisina e uracil (50 mg L<sup>-1</sup>) com o pH ajustado para 4,5. A cultura foi armazenada a 4 °C com a renovação (ou repique) realizada a cada três meses. As células em meio líquido foram inoculadas com densidade óptica (OD<sub>600nm</sub>) inicial de 0,01 e incubada a 30 °C a 250 rpm de agitação orbital (Inova 4300 New Brunswick Scientific).

A solução estoque de Spm (50 mM) foi diluída em água ultra-pura e teve o pH ajustado para 5,2. A solução estoque do AIA (10 nM) foi diluído em água ultra-pura com algumas gotas de NaOH. Os inibidores ácido  $\alpha$ -*p*-clorofenoxi isobutírico (PCIB) e ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), enquanto o ciclohexilamino (CHA) foi diluído em água ultra-pura. Todas as soluções foram esterilizadas por filtração (0,22  $\mu$ m). O cultivo de células de leveduras foi suplementado ou não com Spm ou AIA, concomitantemente ou não com o inibidor da sinalização de auxina (PCIB, 100  $\mu$ M), inibidor do efluxo de auxina (TIBA, 100  $\mu$ M) ou com inibidor da síntese de espermidina (CHA, 2 mM).

O crescimento celular foi monitorado a intervalos de 2 h em espectrofotômetro Bel photonics LGS53 ( $\lambda$ = 600 nm) e a morfologia celular foi analisada em câmara de Neubauer em microscópio óptico Zeiss Axio Imager A.2. As células leveduriformes foram contadas e o valor máximo obtido foi considerado como 100% no cultivo controle. O total de células mL<sup>-1</sup> foi considerado como: [(número de células contadas/quadrantes contados) x diluição x 10<sup>-4</sup>].

#### 3.2 Morfologia colonial e tamanho das franjas coloniais

O fenótipo das colônias foi observado em alíquotas diluídas (1:100.000) de células de *Y. lipolytica* distribuídas em placas de Petri utilizando perólas de vidro sob meio YED sólido, pH 4,5, contendo ou não os indutores (Spm e AIA) e/ou inibidores da morfogênese (PCIB, TIBA e CHA). As placas foram incubadas por 4 dias a 30 °C até a formação das colônias e observadas em estereomicroscópio Zeiss Stereo

Discover V8 equipado com uma câmera digital Axioncam MRc5. As franjas coloniais foram observadas em microscópio invertido Zeiss Axio Observer A.1 com aumento de 10x. As imagens foram processadas no software AxionVision versão 4.9.

### **3.3 Ensaio de invasão do ágar**

A habilidade das células de *Y. lipolytica* de formar filamentos e invadir o ágar foi observada conforme descrito por Cullen (2015). Alíquotas diluídas (1:100.000) de células de leveduras foram distribuídas em placas de Petri utilizando pérolas de vidro sob meio YED sólido, pH 4,5, contendo ou não 1 mM Spm ou 2 mM CHA. As placas foram incubadas por 4 dias a 30 °C até a formação das colônias e fotografadas. Posteriormente, as placas foram lavadas com água destilada para a retirada das colônias e as cicatrizes de invasão no ágar foram fotografadas.

### **3.4 Alcalinização extracelular**

As células foram crescidas em meio YED, pH 4,5 a 30 °C em 250 rpm de agitação orbital. Alíquotas foram retiradas e o pH do meio foi aferido em pHmetro digital em intervalos regulares. A densidade óptica (OD<sub>600nm</sub>) inicial do meio de cultivo foi de 0,01. Em meio sólido, o pH ambiental foi verificado em colônias crescidas em placas de Petri incubadas durante 48, 60 ou 72 h a 30 °C. Inicialmente, alíquotas diluídas (1:100.000) de células de leveduras foram distribuídas sob o meio utilizando pérolas de vidro. Após o tempo de incubação, uma fina camada de 0,8% de *low-melting* agarose contendo 0,015% do indicador púrpura de bromocresol foi vertido sobre as colônias. Após 10 a 15 min, as alterações na cor ao redor das colônias foram registradas em câmera digital. Os valores de pH são estimados usando a escala colorimétrica feita em gel indicador e com o pH conhecido. A mudança da cor de amarelo para púrpura reflete aumento do pH ambiental.

### **3.5 Microscopia eletrônica de varredura**

A fim de analisar a morfologia das células e das bordas coloniais de *Y. lipolytica* em microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram preparadas conforme descrito previamente por Oliveira et al. (2010) com algumas modificações. As células de *Y. lipolytica* foram crescidas por 4 dias a 30 °C até a formação de colônias. As colônias foram cortadas com o ágar das placas de Petri e fixadas com 2,5% de glutaraldeído, 4% de formaldeído em 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,2) por 24 h em baixas temperaturas (5-6 °C). A pós-fixação foi realizada durante 2 h à temperatura ambiente com 1% de tetraóxido de ósmio. A desidratação inicial foi realizada

submetendo as colônias em uma série de gradientes de etanol: 50% e 70% (duas vezes por 10 min), 95% (duas vezes por 5 min) e 100% (duas vezes por 1 min), respectivamente. Posteriormente, as amostras foram desidratadas com acetona (duas vezes por 30 s). As amostras foram secas pelo ponto crítico com CO<sub>2</sub> em CPD-030 BAL-TEC (Liechtenstein). Em seguida, as colônias foram cobertas com uma fina camada de ouro (20 nm) em metalizador (SCD 050 BAL-TEC Liechtenstein) e examinadas com o microscópio eletrônico de varredura (DSM 962 e EVO 40 - Zeiss).

### 3.6 Microscopia de fluorescência

A morfologia vacuolar foi acompanhada com o kit de marcação vacuolar (Molecular Probes, Y7531) seguindo as recomendações do fabricante. O kit é composto por duas sondas azul-fluorescente conjugada a cumarina capazes de marcar seletivamente o lúmen vacuolar [CMAC-Arg (*7-amino-4-chloromethylcoumarin, L-arginine amide*) e CMAC-Ala-Pro (*7-amino-4-chloromethylcoumarin, L-alanyl-L-proline amide*)], uma sonda verde-fluorescente marcadora da membrana vacuolar de leveduras (MDY-64) e, finalmente, um marcador vacuolar comumente usado como padrão [*5-(and-6)-carboxy-2',7-dichlorofluorescein diacetate* (carboxi-DCFDA)]. Os compostos CMAC se difundem através das membranas biológicas devido sua natureza hidrofóbica e o grupo clorometil reage com tióis e glutationas, produzindo conjugados fluorescentes que são impermeáveis às membranas e ficam retidos no lúmen vacuolar (Richards et al., 2012). Brevemente, as células (1 mL) foram lavadas e ressuspensas em 10 mM de tampão HEPES, pH 7,4, contendo 5% de glicose, as sondas derivadas de CMAC foram adicionadas até uma concentração final de 100 µM e as células foram incubadas a temperatura ambiente por 15-30 minutos. Posteriormente, a sonda MDY-64 foi adicionada até a concentração final de 10 µM e as células foram incubadas em temperatura ambiente por 3-5 minutos. Em seguida, as células marcadas foram visualizadas por microscopia de fluorescência.

A marcação com a sonda quinacrina (Sigma-Aldrich) foi realizada segundo o método descrito por Hughes e Gottschling (2012). Brevemente, as células (1 mL) foram lavadas uma vez em meio YED contendo 100 mM de HEPES, pH 7,6, e ressuspensas em 1 mL do mesmo tampão contendo 200 µM quinacrina. As células foram incubadas por 10 min a 30 °C e 5 min no gelo. As células foram lavadas duas vezes com tampão 100 mM de HEPES, pH 7,6 gelado mais 1% de glicose, posteriormente foram ressuspensas em 100 mM de HEPES, pH 7,6 e 1% de glicose

para a captura da imagem. Todas as imagens foram obtidas dentro de 30 min de fixação. A sonda calcofluor (Sigma-Aldrich) foi usada para marcar a parede celular e as cicatrizes de brotamento. As células receberam  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de calcofluor na primeira lavagem após a fixação.

As imagens das células foram obtidas em aumento de 60x em microscópio de fluorescência Zeiss Axion Imager A.2 acoplado a câmera digital AxioCam 2.0 e filtros apropriados: UV-DAPI para calcofluor e os derivados de CMAC e o filtro FITC para quinacrina e MDY-64. As imagens foram processadas no software AxionVision versão 4.9.

### 3.7 Imunofluorescência

As proteínas Pma1p e Vma2p foram detectadas indiretamente por imunofluorescência utilizando o método descrito por Pemberton (2014) com algumas modificações. Brevemente, as células foram fixadas em 4,4% de formaldeído e por 20 min no próprio meio de crescimento. Após a fixação, as células foram lavadas e gentilmente ressuspensas em 100 mM de tampão fosfato, pH 6,5. Em seguida, as células (1 mL) foram permeabilizadas em 0,2% de Triton X-100 por 15 min e lavadas novamente em tampão fosfato. O *pellet* foi gentilmente ressuspenso em 1,2 M de sorbitol em tampão fosfato e a parede celular foi digerida em 0,01% de *lyticase* obtida de *Arthrobacter luteus* (10 mg/mL) e 5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol por 10 min a 37 °C com agitação ocasional. As células foram lavadas e gentilmente ressuspensas em tampão fosfato. Posteriormente, as células (10  $\mu\text{L}$ ) foram imobilizadas em lamínulas contendo 0,1% de poli-L-lisina, com a retirada de excesso de líquido após 10 min. As lamínulas foram imediatamente imersas em metanol gelado por 5 min e, em seguida, em acetona gelada por 30 sec. A partir desse momento, as lamínulas contendo as células foram mantidas sempre úmidas. As lamínulas foram incubadas em tampão de bloqueio (3% BSA em PBS) *overnight* em câmara úmida (placa de Petri com papel toalha umedecido com o tampão de bloqueio).

O anticorpo primário foi diluído (1:100) em tampão de bloqueio, adicionado sob as lamínulas e incubado por 2 h sob agitação a 4 °C [anti-Pma1/2 de *S. cerevisiae* (Santa Cruz Biotechnology, EUA, Y-300) ou anti-sub B1/2 de V-H<sup>+</sup>-ATPase de *S. cerevisiae* (Santa Cruz Biotechnology, EUA, sc-271832)]. Após a lavagem com PBS, as lamínulas contendo as células foram incubadas sob agitação em temperatura ambiente por 1 h na presença do anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com FITC (Sigma-Aldrich) diluído em tampão de bloqueio (1:200). As lamínulas contendo as

células foram lavadas em PBS e incubadas por 15 min com DAPI (1:1.000). Após a última lavagem, a lâmina foi montada para a captura das imagens.

As imagens das células foram obtidas em aumento de 60x em microscópio de fluorescência Zeiss Axion Imager A.2 acoplado a câmera digital AxioCam 2.0 e filtros apropriados: UV-DAPI para DAPI e FITC para o anticorpo secundário conjugado com FITC. As imagens foram processadas no software AxionVision versão 4.9.

### **3.8 Obtenção das membranas totais de *Y. lipolytica***

A obtenção das membranas totais das células de *Y. lipolytica* ocorreu a partir de células crescidas em meio YED (pH 4,5) de forma que as células crescessem até a densidade óptica final de 2,0 unidades ( $OD_{600nm}$ ). As células foram crescidas por tempo pré-determinado (14, 18, 20, 22 ou 26 h) à 30 °C e 250 rpm de agitação orbital.

Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a  $4.000 \times g$  por 5 min e o peso úmido determinado. O isolamento dos esferoplastos e a obtenção de membranas celulares foram realizados de acordo com Okorokov e Lehle (1998). Sucintamente, para cada 1 g de peso úmido das células, foram adicionados 5 mL de tampão de esferoplastos (1,2 M sorbitol; 50 mM Tris-HCl, pH 7,2), 4 mg de enzima *lyticase* obtida de *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich,  $\geq 200$  unidades  $mg^{-1}$ ) e 12,5  $\mu L$  de  $\beta$ -mercaptoetanol (concentração final de 30 mM). A suspensão celular foi incubada a 37 °C em banho-maria sob leve agitação com o monitoramento cinético da hidrólise da parede celular realizado a cada 10 min em espectrofotômetro ( $\lambda=600$  nm).

Posteriormente, os frascos contendo a suspensão celular foram transferidos para o gelo e a reação paralisada pela adição do tampão de parada (1,2 M sorbitol; 200 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA, pH 7,4), 0,2 M de benzamidina e 0,2 M de PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*). Em seguida, a solução foi cuidadosamente aplicada sobre a solução *cushion* (1,4 M sorbitol; 50 mM Tris, pH 7,4) e centrifugada a  $3.500 \times g$  por 6 min a 4 °C (Eppendorf - 5430R). O sobrenadante foi descartado e os esferoplastos incubados a 30 °C por 20 min na presença de 10 mL de tampão de glicose (1,2 M sorbitol; 50 mM Tris; 3 mM  $KH_2PO_4$ ; 100 mM glicose; 3 mM  $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ , pH 7,2). Após a incubação, os esferoplastos foram centrifugados a  $5.000 \times g$  por 5 min a 4 °C. O sedimento foi ressuspensionado em 20 mL de tampão de lise (12,5% sacarose; 200 mM MOPS-KOH, pH 7,6); 1 mM de DTT (*1,4-dithiothreitol*), 1  $\mu g mL^{-1}$  de coquetel de inibidores de proteases (quimiostatina, pepstatina, antipaína,

leupeptina e aprotinina na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>), 1 mM de benzamidina, 1 mM de PMSF e 0,3% de albumina sérica bovina (BSA).

A ressuspensão foi homogeneizada em *potter* de vidro com pistilo de teflon e adicionado o glicerol (1,17 g de glicerol para cada 10 mL de solução). A solução foi centrifugada a 5.000 x g por 5 min a 4 °C e o sobrenadante centrifugados a 100.000 x g por 45 min a 4 °C (Hitachi - Himac 80wx, rotor P50A2).

O sedimento da centrifugação foi ressuspensa em tampão de lise (12,5% sacarose, 200 mM MOPS-KOH, pH 7,6) contendo glicerol (1,17 g para 10 mL) coquetel de inibidores (1 µg mL<sup>-1</sup>), benzamidina (0,5 mM), PMSF (0,5 mM) e DTT (0,2 mM). A solução foi adicionada gradativamente ao sedimento de membranas totais e homogeneizada. A solução ressuspensa foi estocada a -70 °C para análise posterior.

### 3.9 Determinação do gradiente de H<sup>+</sup> (ΔpH - transporte de H<sup>+</sup>)

A determinação do gradiente de H<sup>+</sup> seguiu o método descrito por Okorokov e Lichko (1983). A detecção foi realizada em espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301 PC) com abertura de 5/10 nm, excitação em 415 nm e emissão em 485 nm. A formação do ΔpH pelas P- e V-H<sup>+</sup>-ATPases foi observada em solução contendo: 100 µL de 50 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2,5 mM de concentração final); 50 µL de 2 M KCl (50 mM de concentração final); 10 a 100 µL de vesículas de membrana (volume dependente da atividade, de modo que a amplitude máxima ( $F_{max}$ ) não ultrapasse 50% do decaimento da fluorescência); tampão MOPS-KOH (12,5% sacarose, 200 mM MOPS-KOH, pH 7,2) em quantidade necessária para completar 2 mL de volume final. Acrescenta-se 3 µL de 1 mM ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine, sonda fluorescente capaz de ligar-se aos H<sup>+</sup> e atravessar as membranas biológicas) e após três minutos de incubação (ou tempo necessário para estabilização da fluorescência) inicia a reação com a adição de 100 mM de ATP-KOH pH 7,2 (concentração final de 1 mM). A cinética de extinção da fluorescência (*quenching*) foi monitorada até atingir o equilíbrio entre o efluxo e o influxo de prótons *steady-state*, quando é adicionado 2 M de NH<sub>4</sub>Cl (concentração final de 20 mM) a fim de paralisar a reação, desfazendo o gradiente protônico estabelecido.

As atividades de P- e V-H<sup>+</sup>-ATPases foram diferenciadas pela adição dos inibidores específicos: 11,5 nM de ConA para V-H<sup>+</sup>-ATPase ou 200 µM de ortovanadato de sódio para P-H<sup>+</sup>-ATPase. A atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase foi determinada pela diferença entre a atividade total e a atividade vanadato-insensível. A atividade da V-H<sup>+</sup>-ATPase foi determinada pela diferença na atividade total e a atividade ConA-insensível. A velocidade

inicial da reação ( $V_0$ ) e a amplitude máxima de fluorescência ( $F_{max}$ ) na suspensão de vesículas de membranas totais foram determinadas a partir dos gráficos obtidos durante as análises (Figura 2). As seguintes formulas foram utilizadas:

$$V_0 = [F_0 / (F_{max} \times t)] \times 100$$

Onde:

$V_0$ : velocidade inicial de formação de  $\Delta pH$  (%);

$F_0$ : fluorescência dependente de  $V_0$  num dado tempo ( $t$ ), determinado pela extrapolação da maior inclinação inicial para o eixo do tempo;

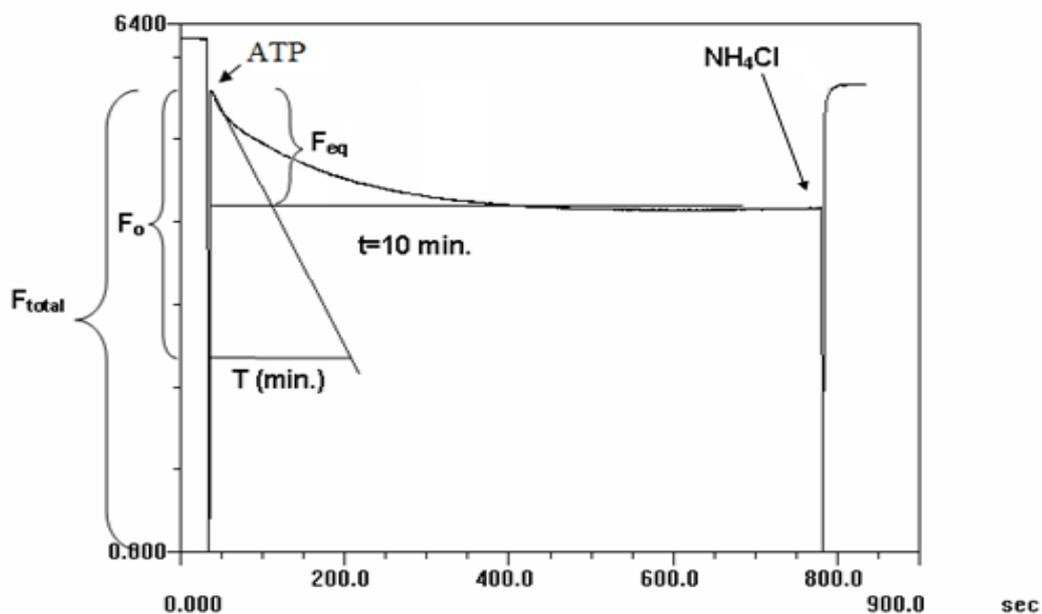
$F_{max}$ : fluorescência máxima (total);

$t$ : tempo em minutos.

$$\Delta F_{max} = (F_{eq} / F_{total}) \times 100$$

Onde:

$F_{eq}$ : fluorescência de equilíbrio determinada como fluorescência do “platô” que reflete o equilíbrio entre o influxo e o efluxo de  $H^+$  nas vesículas.



**Figura 2. Representação esquemática da determinação da velocidade inicial e amplitude máxima do transporte de  $H^+$  em membranas de *Y. lipolytica*.** Velocidade inicial ( $V_0 = [F_0 / (F_{total} \times t)] \times 100$ ); amplitude máxima ( $\Delta F_{max} = (F_{eq} / F_{total}) \times 100$ ).

### 3.10 Atividade hidrolítica das $H^+$ -ATPases

A atividade hidrolítica de ATP foi determinada pelo aumento na quantidade de fosfato inorgânico ( $P_i$ ) a partir do método descrito por Fiske e Subbarow (1925). Os ensaios foram realizados sob refrigeração, em tubos contendo tampão de hidrólise (100 mM de sorbitol; 30 mM de MOPS-KOH; 9,5 mM de  $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ ; 262  $\mu M$  de molibdato de amônio, pH 7,2); 1 M de KCl e água destilada para completar 300  $\mu L$ ; volumes da suspensão de vesículas de membranas (diluídas previamente em tampão de hidrólise). A reação foi iniciada pela adição de 100 mM de ATP-KOH, pH 7,2 (concentração final de 1,5 mM). Nas análises farmacológicas para detecção das atividades específicas das três classes de ATPases (V, P e F) foram utilizados os respectivos inibidores (22 nM de ConA, 200  $\mu M$  de ortovanadato de sódio ou 5 mM de azida sódica). A reação transcorreu a 30 °C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de água destilada gelada (até completar 1 mL de volume de reação) e, logo em seguida, foram adicionados 2 mL da solução de revelação (10% de ácido ascórbico e 0,5% de molibdato de amônio, relação 1:10). A solução foi incubada por 10 min a 30 °C, seguido pela leitura em espectrofotômetro ( $\lambda=750$  nm). O conteúdo de proteínas totais das vesículas de membranas foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976).

### **3.11 Determinação do fluxo protônico extracelular**

O fluxo de  $H^+$  foi mensurado por meio de micro-eletrodos não-invasivos, usando a técnica “*Scanning Ion-selective Electrode Technique*” (SIET) essencialmente como descrito por Ramos et al. (2008a,b, 2009). O ionóforo usado foi o coquetel íon-seletivo para  $H^+$  (Sigma, hydrogen ionophore I, Cocktail B, N° 25293). As células de *Y. lipolytica* foram crescidas em meio YED, pH 4,5, contendo ou não 10 pM de AIA ou 1 mM de Spm a 30 °C durante 16, 20 ou 24 h. As células foram coletadas por centrifugação e imobilizadas em YED-agar. Os micro-eletrodos foram posicionados próximos à superfície das células e o fluxo de  $H^+$  foi aferido por 10-15 min em uma distância de excursão de 15  $\mu m$ . As medidas controle (referência) foram realizadas a 500-700  $\mu m$  de distâncias das células e subtraídos das medidas próximas às superfícies das células. O ensaio foi repetido três vezes independentemente e para cada amostra celular.

### **3.12 Determinação do ácido indol-3-acético**

O AIA foi determinado pelo kit de imunodeteção Phytodetec-IAA (Phytodetek®, Agdia, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As células de *Y. lipolytica* foram crescidas durante 14, 18, 22 ou 26 h em meio YED a 30 °C, pH 4,5 e 250 rpm de agitação orbital em meio suplementado ou não com 1 mM Spm. As células foram centrifugadas e o sobrenadante recolhido. As células tiveram a parede hidrolisada (item 2.2) e maceradas em homegeneizador de vidro com pistilo de teflon. O extrato bruto de células e o sobrenadante foram metilados com (*trimethylsilyl*)*diazomethane* (Sigma-Aldrich, 1:1.000) para posterior análise. O teste foi realizado em três experimentos independentes.

### **3.13 Western blotting**

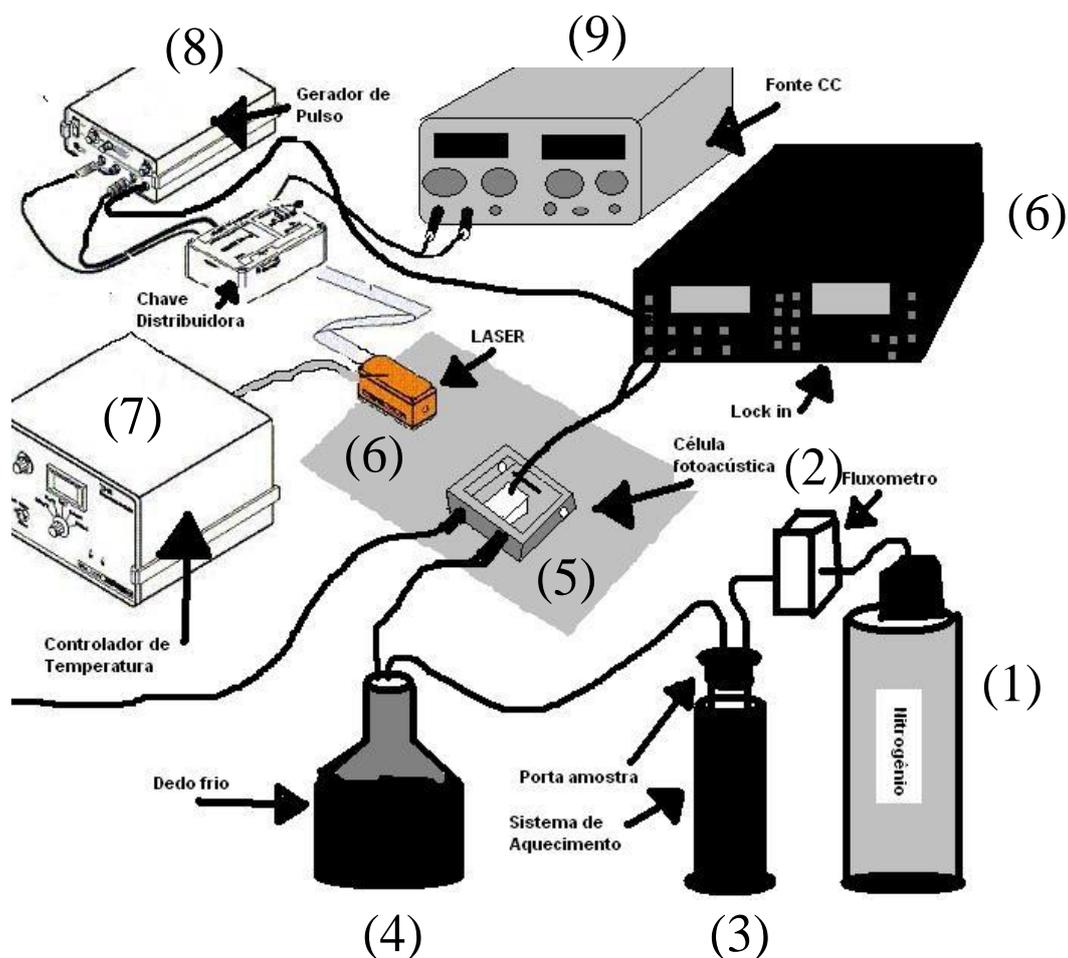
A imunoreatividade das enzimas P- e V-H<sup>+</sup>-ATPases foi detectado sob condições de baixo conteúdo proteico a fim de prevenir a saturação por reação cruzada. Vesículas de membranas totais (10-20 µg) isoladas de células de *Y. lipolytica* foram incubadas a 65 °C por 20 min, posteriormente separadas em gel SDS-PAGE 10% (w/v) e transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, Amesham/GE Healthcare). A P-H<sup>+</sup>-ATPase foi detectada usando anticorpo policlonal anti-PMA1/2 (1:1000) de *S. cerevisiae* (Santa Cruz Biotechnology, EUA, Y-300). A V-H<sup>+</sup>-ATPase foi detectada com anticorpo policlonal anti-sub B1/2 (1:1000) de *S. cerevisiae* (Santa Cruz Biotechnology, EUA, sc-271832). A imunodeteção de ambos foi realizada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com a peroxidase (GE Healthcare Bio-Sciences, EUA) e com kit quimioluminescente de detecção (ECL Western blotting detection system, GE Healthcare). As intensidades das bandas imunorreativas foram quantificadas pelo software ImageJ (NIH, EUA).

### **3.14 Determinação da produção de amônia (NH<sub>3</sub>)**

As células de levedura cresceram durante 18, 24 ou 36 h em meio YED, pH 4,5 a 30 °C e 250 rpm de agitação orbital. A densidade óptica inicial (OD<sub>600nm</sub>) das células foi de 0,01. As células foram crescidas em meio contendo ou não 10 de pM IAA, 1 mM de Spm ou 100 µM de PCB. A produção do gás volátil amônia (NH<sub>3</sub>) foi determinada em espectrômetro fotoacústico acoplado a um laser de cascata quântica (LCQ) (Figura 3), localizado no Laboratório de Ciências Física (LCFIS, UENF).

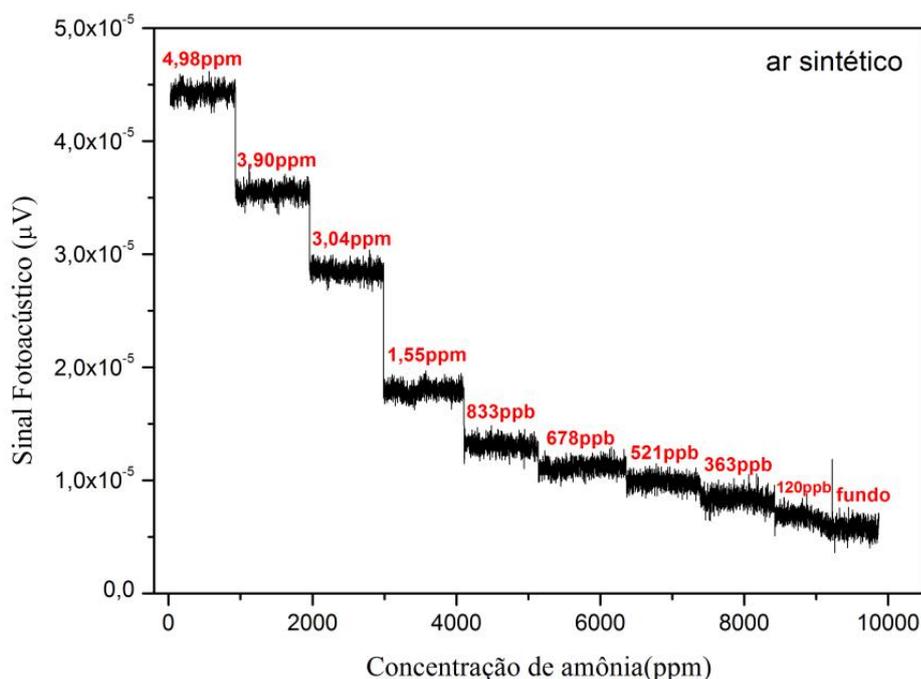
A detecção seguiu o método descrito por Bueno et al. (2015). Brevemente, o sistema funciona da seguinte maneira: um gás de arraste inerte (1), no caso o nitrogênio ou ar sintético (White Martins Co.) passa pela amostra (4) e segue para o

interior do detector da célula fotoacústica (5). Fluxômetros eletrônicos (Brooks Instruments) (2) são usados para garantir a vazão constante da amostra gasosa em todo o sistema. Apesar da água não ser absorvida significativamente pela faixa espectral, ela disputa sítios de adsorção na superfície interna do sistema, estimulando a liberação de amônia das paredes e aumentando assim a concentração de amônia no detector, o que poderia superestimar a concentração do gás. A fim de eliminar esse efeito, utiliza-se uma armadilha em nitrogênio líquido (3) para a retenção de água. O LCQ (Alpes Laser) (6) foi utilizado como fonte de excitação eletromagnética, com o comprimento de onda sintonizado em  $1.050,3 \text{ cm}^{-1}$  a  $1.045,7 \text{ cm}^{-1}$ . Nesse espectro de onda a amônia possui absorção máxima (possui dois pontos de absorção, um em  $1046,4 \text{ cm}^{-1}$  e outro em  $1049,4 \text{ cm}^{-1}$ ) (Bueno et al., 2015). O laser teve a frequência de ressonância eletricamente modulada na célula fotoacústica.



**Figura 3. Representação esquemática da montagem experimental para detecção de amônia.** (1) Gás de arraste inerte (nitrogênio); (2) fluxômetros eletrônicos; (3) armadilha de nitrogênio líquido; (4) amostra; (5) célula fotoacústica (detector); (6) laser de cascata quântica; (7) amplificador "lock-in"; (7-9) eletrônica para o funcionamento do laser.

A calibração do sistema foi realizada com concentrações decrescentes a partir de 10 ppm de gás amônia com 99,9% de pureza (White Martins Co.) como amostra padrão (Figura 4). A curva de calibração revelou a sensibilidade do aparelho na ordem de partes por bilhão (ppb). O gás amônia foi arrastado pelo ar sintético ( $O_2 + N_2$ ) com 99,9% de pureza (White Martins Co.).



**Figura 4. Curva de sensibilidade de detecção de moléculas de amônia ( $NH_3$ ) pelo espectrofotômetro fotoacústico.** Análise utilizando laser de cascata quântica. Os gases utilizados para o teste foram o gás amônia ( $NH_3$ ) 99,9% de pureza e o ar sintético ( $O_2 + N_2$ ) 99,9% de pureza (White Martins Co.).

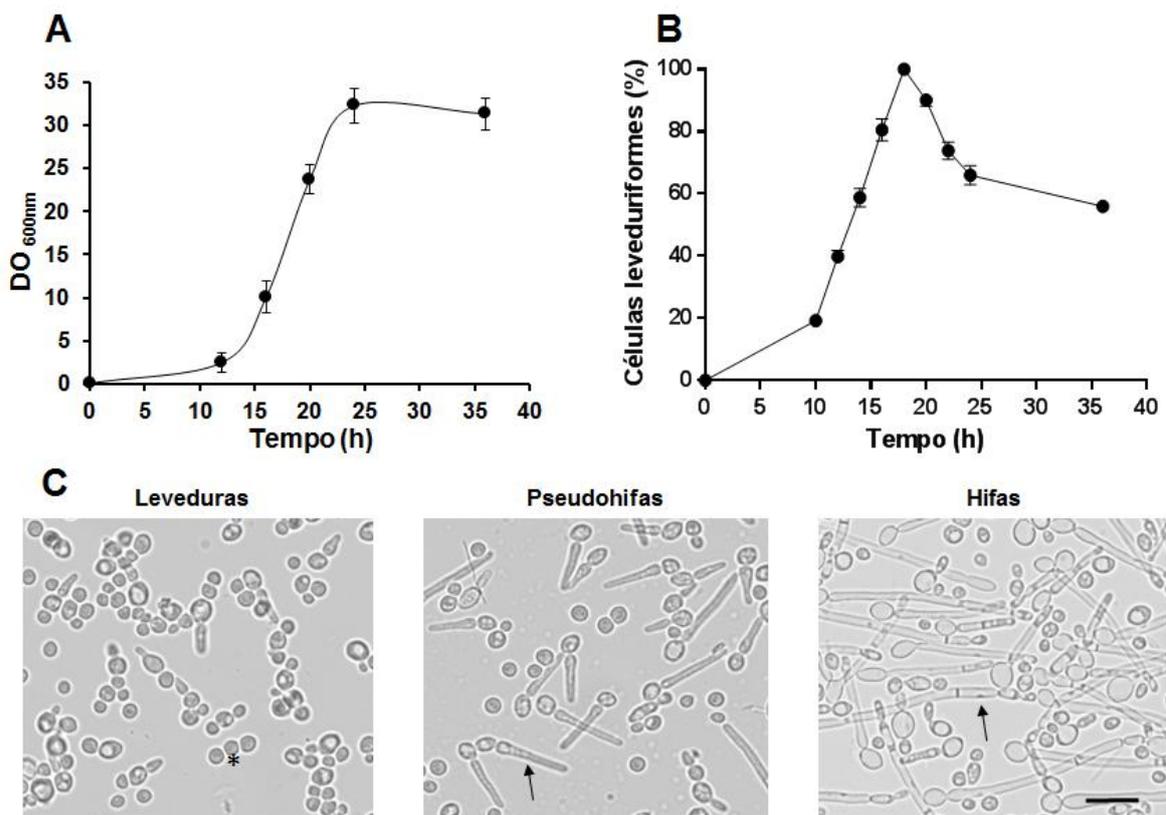
### 3.15 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o GraphPad Prism software versão 6.0 para o Windows (GraphPad Software, San Diego, CA), e expressados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Todas as médias foram obtidas a partir da medida de pelo menos três ( $n = 3$ ) experimentos independentes. A média foi analisada por ANOVA seguida pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para determinar diferenças entre os tratamentos e controle. Diferenças estatísticas significantes ( $p \leq 0,05$ ) foram indicados por diferentes letras ou asteriscos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Spm e AIA induzem a morfogênese de *Y. lipolytica*

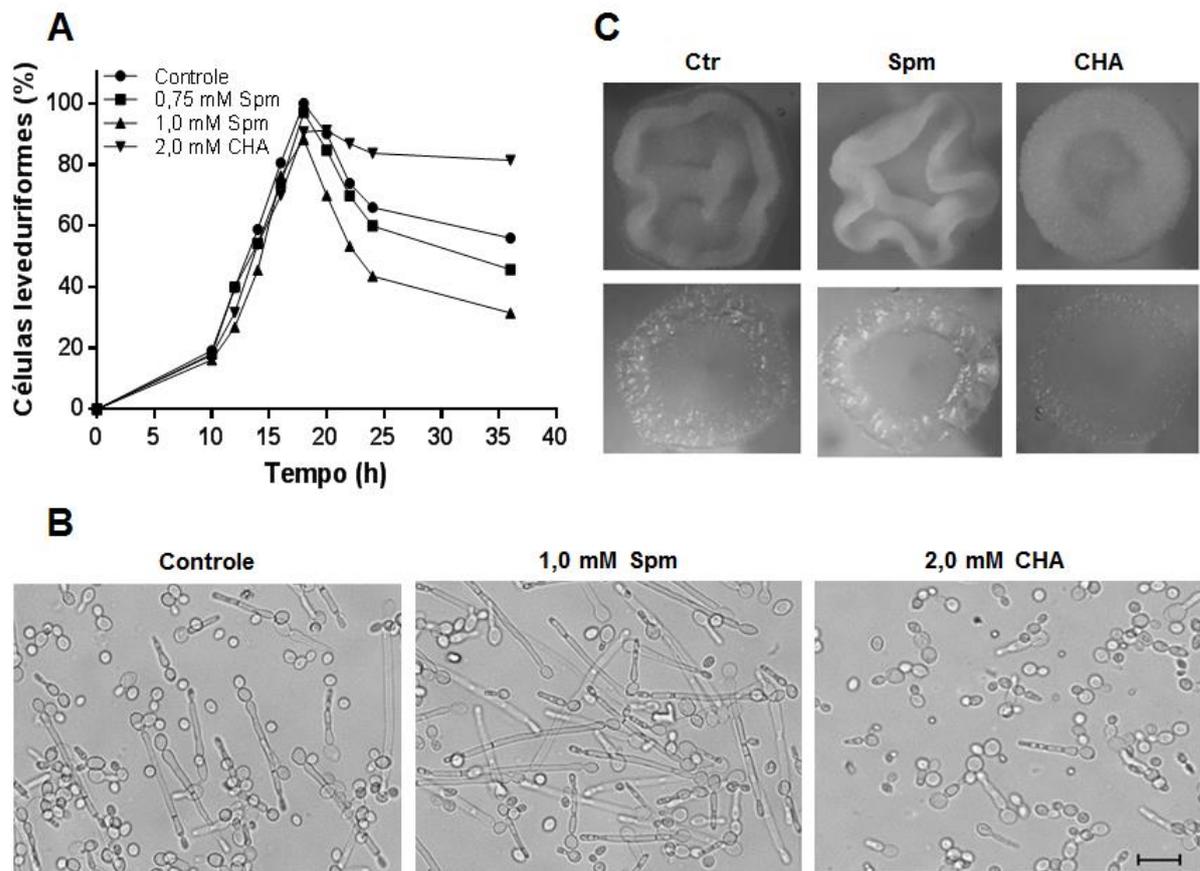
O fungo *Y. lipolytica* apresentou um tempo de adaptação ou fase *lag* de aproximadamente 10 h às condições de crescimento utilizadas nos ensaios (meio YED, pH 4,5, 30 °C e 250 rpm). A partir desse momento, o cultivo iniciou a fase de crescimento (*log*), atingindo a fase estacionária por volta de 22 h de crescimento, a qual se manteve até 36 h, quando iniciou a fase de declínio (Figura 5A). A análise microscópica da morfologia celular revelou que as células iniciaram a transição morfológica de leveduras para pseudohifas ou hifas verdadeiras a partir de 18 h de crescimento, com o surgimento das primeiras pseudohifas. Após 20 h, surgiu as primeiras hifas verdadeiras e após 36 h de crescimento, mais de 50% das células no cultivo estavam na forma filamentosa (Figura 5B,C).



**Figura 5. Crescimento celular e transição morfológica de *Y. lipolytica*.** (A) Crescimento celular de *Y. lipolytica* obtidos a partir da densidade óptica (DO<sub>600nm</sub>). (B) Porcentagem de células leveduriformes crescidas em meio YED líquido. O número de leveduras foi contado durante o crescimento celular e o valor máximo foi considerado como 100% (18 h), seguido pelo surgimento das primeiras pseudohifas. (C) Células de *Y. lipolytica* cultivadas por 14 h (leveduras, asteriscos), 20 h (pseudohifas, seta) e 36 h (hifas, seta) em meio de crescimento. A escala representa 10  $\mu$ m. Valores representativos de três experimentos independentes.

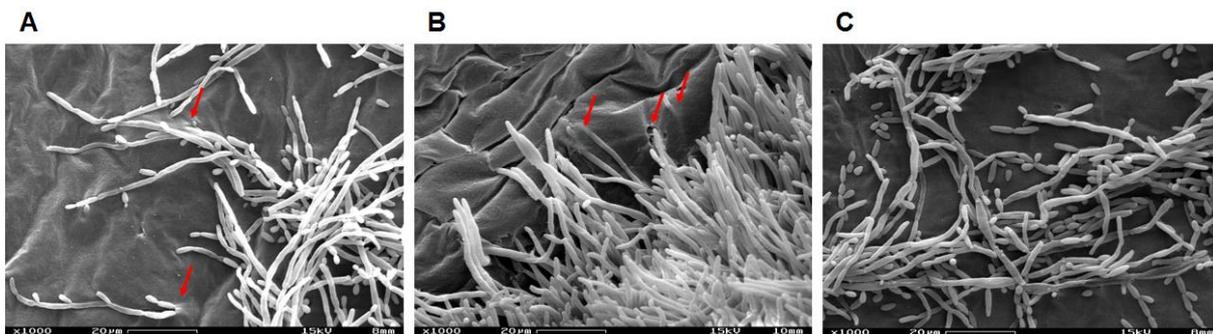
A presença de Spm no meio de cultivo, a partir da concentração de 0,75 mM, induziu significativamente a morfogênese da *Y. lipolytica* quando compara as células do cultivo controle. O crescimento das células na presença de 1 mM de Spm induziu a morfogênese em aproximadamente 70-75% das células do cultivo após 36 h, enquanto células crescidas na ausência de Spm apresentaram aproximadamente 50-55% do cultivo na forma de leveduras. Por outro lado, a presença do inibidor da espermidina sintase (CHA, 2 mM) preveniu a morfogênese em aproximadamente 80% das células (Figura 6A,B). Assim como o CHA, as concentrações de Spm influenciaram a morfogênese fúngica sem inibir a viabilidade e o crescimento celular, embora concentrações superiores a 1,5 mM de Spm tiveram efeitos tóxicos, pois reduziram o crescimento celular e proporcionaram o surgimento de células aberrantes (dados não mostrados).

A análise do fenótipo das colônias crescidas em meio YED, pH 4,5, contendo 2% de ágar também revelou que a presença de 1 mM de Spm no meio de cultivo induziu a formação de colônias mais enrugadas quando comparadas às colônias controle, enquanto a presença de CHA promoveu a formação de colônias com a textura superficial mais lisa (Figura 6C). A análise da capacidade de invasão das colônias em meio sólido, por meio da remoção das colônias com água, indicou a presença de cicatrizes de invasão no ágar contendo Spm. Por outro lado, as colônias crescidas na presença de CHA formaram cicatrizes menos perceptíveis, correspondente à menor quantidade de células filamentosas (Figura 6C).



**Figura 6. Spm induz a morfogênese de *Y. lipolytica*.** (A) Porcentagem de células leveduriformes crescidas na presença ou ausência de Spm (0,75 ou 1 mM) ou CHA (2 mM). O número de leveduras foi contado durante o crescimento celular e o valor máximo no cultivo controle foi considerado como 100%. Valores representativos de três experimentos independentes. (B) Células de *Y. lipolytica* cultivadas por 36 h na presença ou ausência de 1 mM de Spm ou 2 mM de CHA. Escala representa 10  $\mu$ m. (C) Cicatrizes de invasão do ágar causadas por colônias de *Y. lipolytica* crescidas por 4 dias na presença ou ausência de 1 mM de Spm ou 2 mM de CHA.

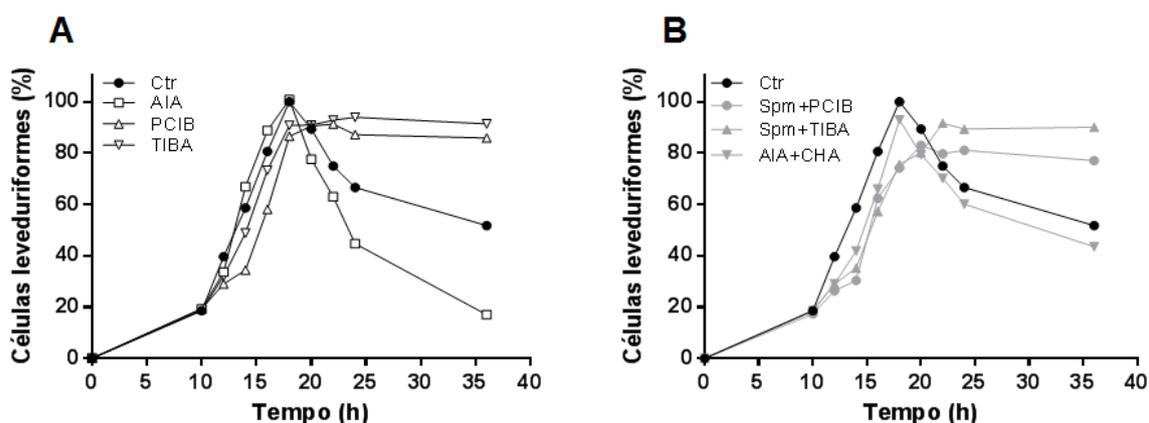
A fim de visualizar os detalhes da invasão em meio sólido, a análise por microscopia eletrônica de varredura das colônias revelou a penetração do ágar pelas bordas coloniais de células filamentosas crescidas em meio contendo Spm (Figura 7, setas). Por outro lado, as bordas coloniais crescidas na presença de CHA apresentaram menores frequências de invasão e maior quantidade de células na forma de leveduras e pseudohifas (Figura 7).



**Figura 7. Bordas coloniais de *Y. lipolytica*.** As colônias foram crescidas por 4 dias na ausência (A) ou na presença de 1 mM de Spm (B) ou 2 mM de CHA (C). Escala representa 20  $\mu$ m.

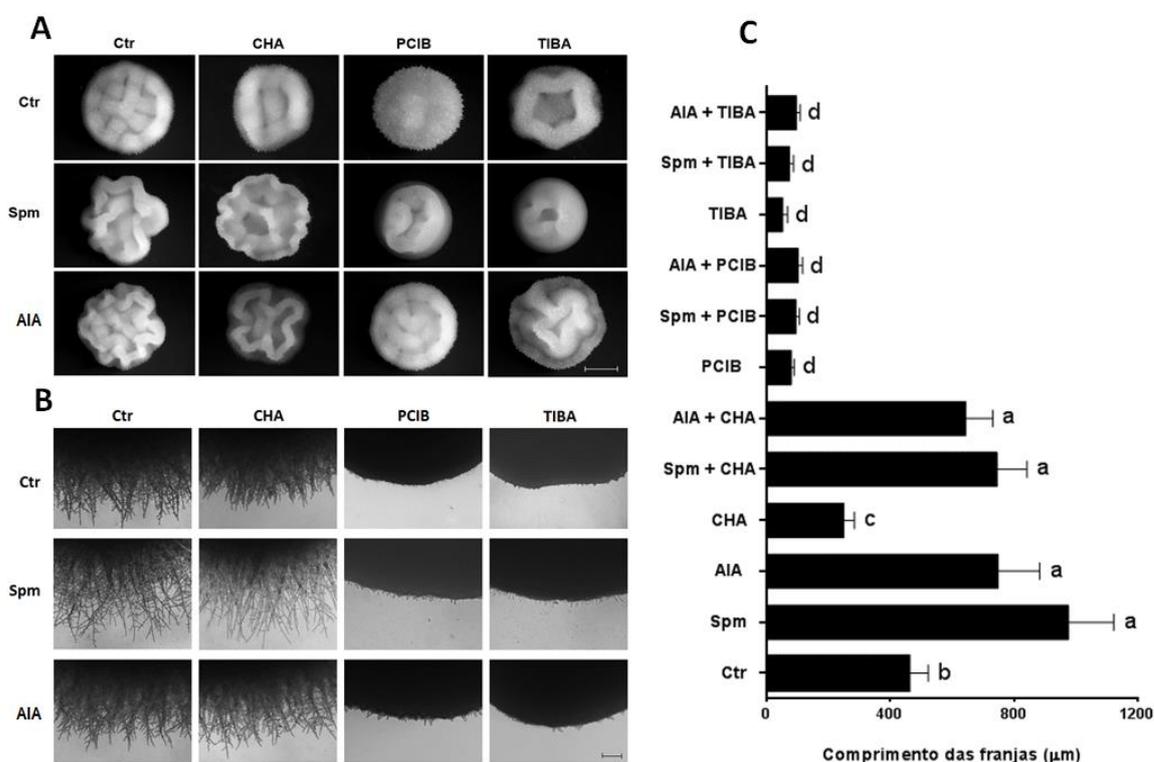
A fim de investigar uma possível associação entre a ação indutora na filamentação por Spm e AIA, utilizamos os inibidores da sinalização (PCIB) ou do transporte (TIBA) de auxina. Os inibidores foram adicionados concomitantemente a Spm ao meio de cultivo. Observamos que os inibidores PCIB e TIBA, assim como o CHA, bloquearam a transição morfológica em aproximadamente 90% das células do cultivo (Figura 8A). Além disso, o efeito bloqueador na morfogênese causado pelas concentrações de 100  $\mu$ M de PCIB ou TIBA não foi revertido por Spm, mesmo na concentração de 1 mM (Figura 8B).

Por outro lado, o AIA induziu a morfogênese em 75-80% das células e promoveu a reversão do efeito inibitório causado pelo CHA. A adição simultânea de AIA e CHA ao meio de cultivo restaurou a morfogênese para níveis próximos ao cultivo controle, com a morfogênese em mais de 50% das células (Figura 8B).



**Figura 8. Sinalização de Spm via AIA-dependente durante a morfogênese de *Y. lipolytica*.** (A) Porcentagem de células leveduriformes de *Y. lipolytica* crescidas na presença ou ausência de AIA, PCIB ou TIBA. (B) Porcentagem de células leveduriformes de *Y. lipolytica* crescidas na presença de Spm concomitante com os inibidores de auxina (PCIB ou TIBA) e de AIA concomitante como CHA. O número de leveduras foi contado durante o crescimento celular e o valor máximo no cultivo controle foi considerado como 100%. Ctr, controle; AIA (10 pM); PCIB (100  $\mu$ M); TIBA (100  $\mu$ M); Spm (1 mM); CHA (2 mM). Valores representativos de três experimentos independentes.

A análise fenotípica das colônias revelou que os indutores da filamentação (Spm e AIA) formaram colônias mais enrugadas e circundadas por longas franjas coloniais ( $976 \pm 147$  e  $749 \pm 133 \mu\text{m}$ , respectivamente) quando comparadas ao cultivo no tratamento controle ( $460 \pm 64 \mu\text{m}$ ). Por outro lado, a presença dos inibidores (CHA, PCIB ou TIBA) resultou na formação de colônias mais lisas e circundadas por franjas coloniais mais curtas. A adição simultânea de Spm ou AIA reverteu o efeito inibitório do CHA, enquanto esses indutores não foram capazes de reverter o efeito causado por PCIB ou TIBA (Figura 9).

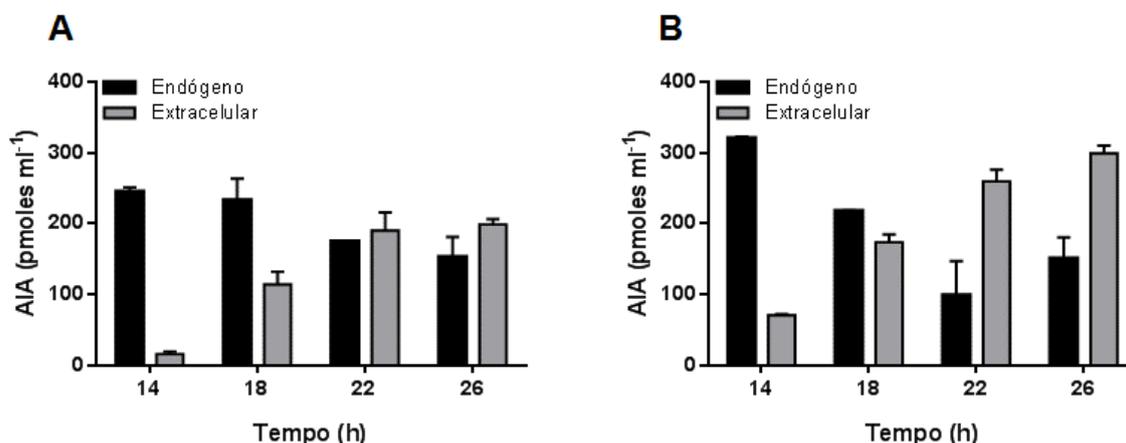


**Figura 9. Morfologia das colônias de *Y. lipolytica*.** (A) Aspecto da superfície colonial de *Y. lipolytica*. Escala representa  $2000 \mu\text{m}$  (B) Micrografias das franjas coloniais. Escala representa  $200 \mu\text{m}$ . (C) Comprimento das franjas coloniais. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). As colônias foram cultivadas por quatro dias na presença ou ausência de AIA ( $10 \mu\text{M}$ ), Spm ( $1 \text{ mM}$ ), CHA ( $2 \text{ mM}$ ), TIBA ( $100 \mu\text{M}$ ) ou PCIB ( $100 \mu\text{M}$ ). Imagens representativas de três experimentos independentes.

#### 4.2 Produção de ácido indol-3-acético (AIA) por *Y. lipolytica*

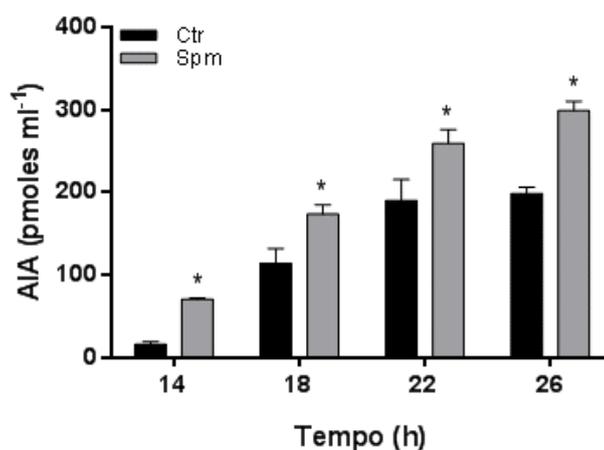
A produção do hormônio auxina pelas células de *Y. lipolytica* foi investigado por meio do kit de imunodeteção específica para quantificação de ácido indol-3-acético (AIA). Os testes revelaram que as células de *Y. lipolytica* foram capazes de produzir o AIA em concentrações picomolares (pmol) (Figura 10). As células crescidas na ausência de Spm apresentaram um decréscimo nas concentrações endógenas de AIA a partir de 18 h de crescimento (Figura 10A), enquanto nas células crescidas na

presença de Spm, o decréscimo ocorreu a partir de 14 h de crescimento (Figura 10B). As concentrações endógenas de AIA apresentaram diferenças significativas entre as células controle e cultivadas com Spm apenas em 14 h de crescimento, quando as células cultivadas na presença de Spm apresentaram maior quantidade de AIA (Figura 10).



**Figura 10. Produção de AIA pelas células de *Y. lipolytica*.** A concentração de AIA foi detectada em meio extracelular (exógeno) e no extrato bruto (endógeno) de células cultivadas por 14, 18, 22 ou 26 h em condições controle (A) ou na presença de 1 mM Spm (B). Valores representativos de três experimentos independentes.

Por outro lado, a presença de Spm no meio de cultivo aumentou significativamente a exsudação de AIA nas células de *Y. lipolytica* em todos os tempos de cultivo analisados quando comparado às células do cultivo controle (Figura 11).



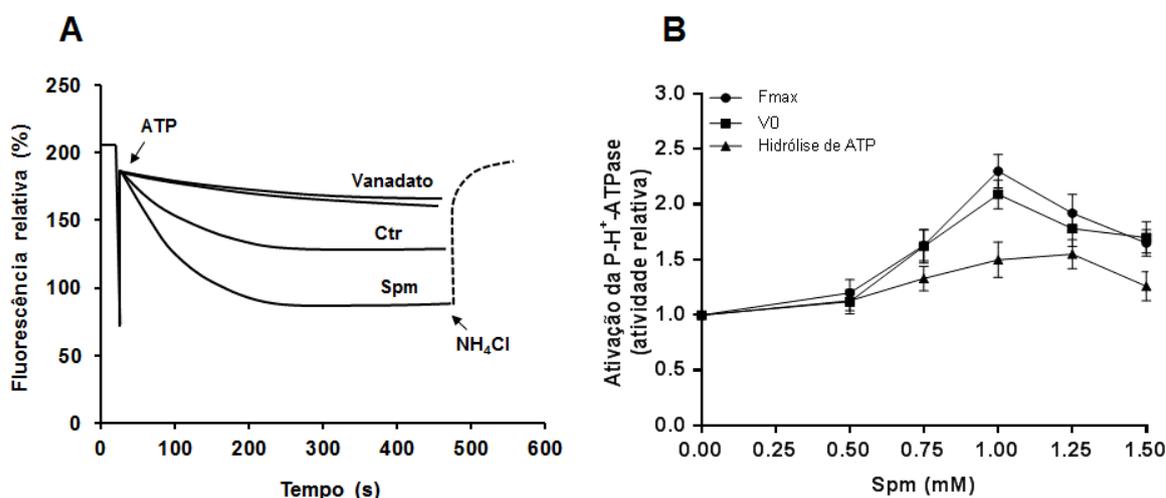
**Figura 11. Exsudação de AIA no meio de cultura pelas células de *Y. lipolytica*.** As células foram cultivadas durante 14, 18, 22 ou 26 h na ausência ou presença de 1 mM de Spm. Valores representativos de três experimentos independentes. Asteriscos representam diferenças significativas em relação às células do cultivo controle pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 4.3 Ativação da P-H<sup>+</sup>-ATPase durante a morfogênese da *Y. lipolytica*

Após a demonstração do efeito indutor de Spm e AIA na filamentação da *Y. lipolytica*, procuramos entender quais seriam os mecanismos responsáveis por modular a transição levedura-hifa. Para isso, a atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase foi determinada devido sua importância crucial na manutenção do crescimento das hifas fúngicas e suas relações pré-estabelecidas com tais indutores em sistemas vegetais.

O bombeamento de H<sup>+</sup> e hidrólise de ATP de P-H<sup>+</sup>-ATPase foi realizado usando vesículas de membranas totais isoladas durante a morfogênese das células de *Y. lipolytica* crescidas na presença ou ausência de Spm. O bombeamento de H<sup>+</sup> pela P-H<sup>+</sup>-ATPase foi determinado pela atividade sensível a presença de 200 μM de vanadato, um inibidor específico das P-ATPases (Figura 12A).

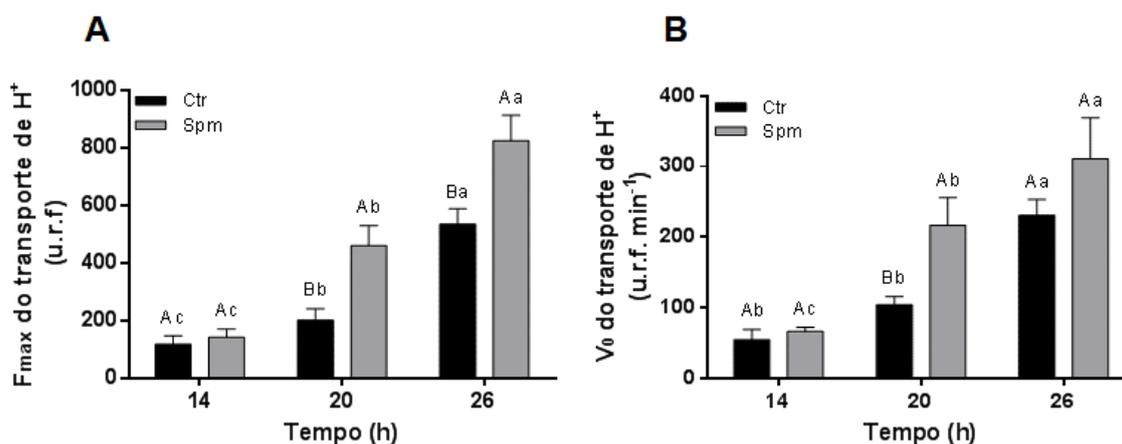
A presença de concentrações crescentes de Spm ao meio de cultivo resultou na estimulação no transporte de H<sup>+</sup> ( $F_{max}$ ), na velocidade inicial de bombeamento de H<sup>+</sup> ( $V_0$ ) e na atividade hidrolítica das P-H<sup>+</sup>-ATPases (Figura 12), seguindo a mesma dinâmica observada na morfogênese fúngica. A estimulação máxima foi observada na concentração de 1 mM de Spm, a qual aumentou ~2,3 vezes a  $F_{max}$ , ~2,0 vezes o  $V_0$  e ~1,5 vezes a hidrólise do ATP (Figura 12B).



**Figura 12. Modulação da atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase pela Spm.** (A) A amplitude máxima ( $F_{max}$ ) e a velocidade inicial ( $V_0$ ) do bombeamento de H<sup>+</sup> obtidos a partir do decaimento da sonda fluorescente ACMA em vesículas de membranas totais de *Y. lipolytica* cultivadas por 20 h na presença ou ausência de 1 mM de Spm. O transporte de H<sup>+</sup> foi iniciado pela adição de 1 mM de ATP e a amplitude máxima foi dissipada com 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl. Dados representativos do efeito do vanadato. (B) Efeito de diferentes concentrações de Spm na amplitude máxima ( $F_{max}$ ), velocidade inicial de transporte de H<sup>+</sup> ( $V_0$ ) e na hidrólise de ATP em vesículas de membranas totais isoladas de células crescidas por 20 h na presença ou ausência de Spm (0,5; 0,75, 1,0, 1,25 e 1,5 mM). Valores representativos de três experimentos independentes.

A atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase também foi analisada em diferentes tempos de crescimento durante a morfogênese da *Y. lipolytica*. O transporte de H<sup>+</sup> nas vesículas de membranas totais apresentou menor atividade nas células leveduriformes (14 h), seguido pelo aumento de ~1,6 vezes após o ponto de transição morfogênética (20 h), e ~4,7 vezes em 26 h de crescimento. Tanto a amplitude máxima do gradiente eletroquímico ( $F_{max}$ ), como a velocidade inicial ( $V_0$ ) de transporte de H<sup>+</sup> aumentaram aproximadamente 2 e 4 vezes, após 20 e 26 h de crescimento, respectivamente (Figura 13A,B, Tabela 1).

A análise do efeito de 1 mM de Spm na atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase durante a morfogênese da *Y. lipolytica* demonstrou não haver diferenças significativas nas células leveduriformes crescidas por 14 h entre o controle e o tratamento. No entanto, após iniciada a transição dimórfica, as células crescidas na presença de Spm apresentaram um estímulo maior no bombeamento de H<sup>+</sup> da P-H<sup>+</sup>-ATPase quando comparadas às células controle. O aumento foi de aproximadamente 3,3 e 5,9 vezes no transporte de H<sup>+</sup> após 20 e 26 h de crescimento, respectivamente, quando comparado às células com 14 h de cultivo. A velocidade inicial de bombeamento de H<sup>+</sup> também aumentou cerca de 3,3 e 4,7 vezes após 20 e 26 h de crescimento, respectivamente, quando comparado com os níveis obtidos em 14 horas de crescimento (Figura 13A,B, Tabela 1).



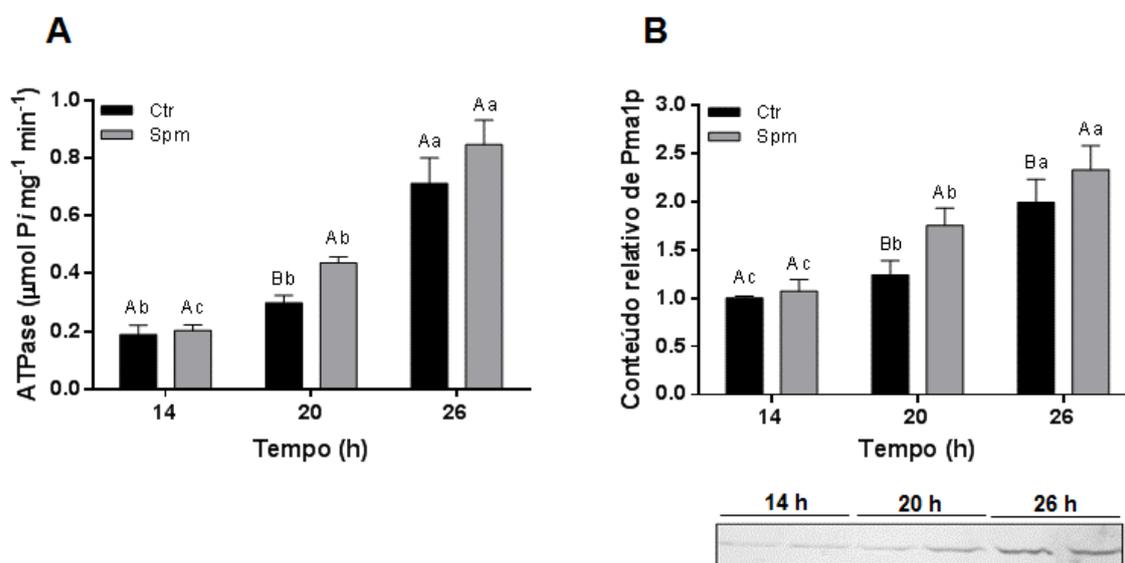
**Figura 13. Spm estimula o transporte de H<sup>+</sup> da P-H<sup>+</sup>-ATPase durante a morfogênese de *Y. lipolytica*.** A amplitude máxima (A) e a velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> (B) da P-H<sup>+</sup>-ATPase foram obtidos de vesículas de membranas totais isoladas de células de *Y. lipolytica* cultivadas durante 14, 20 ou 26 h na presença ou ausência de 1 mM de Spm. Valores representativos da unidade relativa de fluorescência (u.r.f) de pelo menos quatro experimentos independentes. Para cada ponto temporal, as colunas contendo a mesma letra maiúscula, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para cada tratamento, as colunas contendo as mesmas letras minúsculas em diferentes pontos temporais, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A análise da atividade de hidrólise de ATP vanadato-sensível revelou um aumento significativo nas células controle durante a morfogênese de ~1,6 e ~3,8 vezes após 20 e 26 h de crescimento, respectivamente, quando comparado à atividade detectada nas células crescidas por 14 h. As células cultivadas na presença de Spm apresentaram um aumento de ~2,2 e ~4,2 vezes após 20 e 26 h de crescimento, respectivamente, quando comparado à atividade obtida em 14 h (Figura 14A, Tabela 1).

**Tabela 1.** Ativação relativa da amplitude máxima ( $F_{max}$ ), velocidade inicial ( $V_0$ ) do transporte de  $H^+$ , hidrólise de ATP e imuno-resposta da Pma1p em vesículas de membranas totais isoladas de células de *Y. lipolytica* cultivadas por 14, 20 ou 26 h na presença ou ausência de 1 mM de Spm.

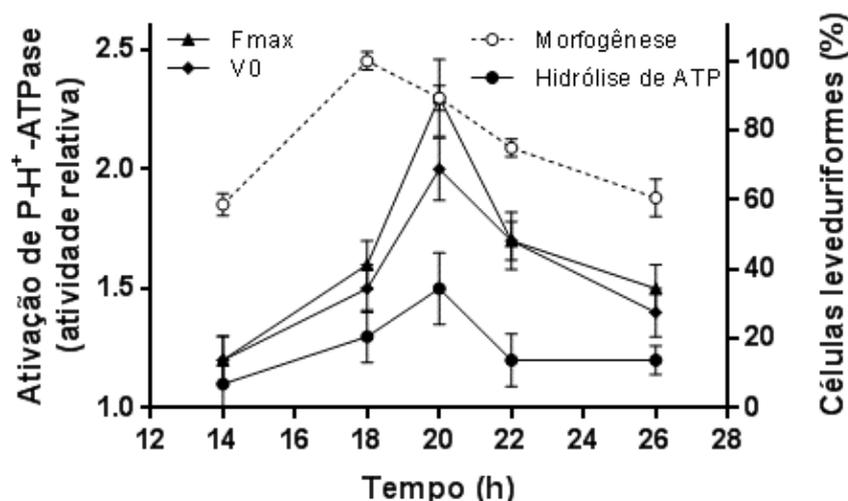
<b>Tempo (h)</b>	<b>14</b>	<b>20</b>	<b>26</b>
$F_{max}$ do transporte de $H^+$			
Controle	1,0	1,6	4,6
1 mM Spm	1,0	3,3	5,9
$V_0$ do transporte de $H^+$			
Controle	1,0	1,9	4,2
1 mM Spm	1,0	3,3	4,7
Hidrólise de ATP			
Controle	1,0	1,6	3,8
1 mM Spm	1,0	2,2	4,2
Conteúdo relativo de Pma1p			
Controle	1,0	1,2	2,0
1 mM Spm	1,0	1,6	2,2

A detecção do conteúdo de Pma1p por meio de testes de imunoreatividade com anticorpos contra a P-H<sup>+</sup>-ATPases de *S. cerevisiae* (anti-PMA1/2) revelou que os níveis de expressão da enzima em membranas totais de *Y. lipolytica* também aumentaram quando comparado aos níveis pré-transição (14 h). A imuno-resposta de Pma1p demonstrou um acréscimo de ~1,2 e ~2 vezes em 20 e 26 h de crescimento nas células controle, respectivamente. A expressão nas células cultivadas na presença de Spm foi ligeiramente superior aos níveis do controle: 1,6 e 2,2 vezes em 20 e 26 h de crescimento, respectivamente, quando comparado ao nível obtido em 14 h (Figura 14B, Tabela 1). Assim como o transporte de  $H^+$ , praticamente não houve diferenças na imuno-resposta entre as membranas isoladas das células controle e cultivadas com Spm em 14 h de crescimento. Por outro lado, a presença de Spm induziu em ~1,5 vezes o conteúdo da Pma1p em comparação às células controle em 20 h de crescimento. Os dados sugerem que a morfogênese da *Y. lipolytica* ocorre paralelamente com a ativação das P-H<sup>+</sup>-ATPase e o aumento da expressão da Pma1p, ambos modulados positivamente pela Spm.



**Figura 14. Spm estimula a atividade hidrolítica e a imuno-resposta da P-H<sup>+</sup>-ATPase durante a morfogênese de *Y. lipolytica*.** Atividade hidrolítica ATP-dependente e vanadato-sensível (A) e resposta imunorreativa (B) da P-H<sup>+</sup>-ATPase obtidas de vesículas de membranas totais isoladas de células de *Y. lipolytica* cultivadas durante 14, 20 ou 26 h na presença ou ausência de 1 mM de Spm. Valores representativos de pelo menos quatro experimentos independentes. Para cada ponto temporal, as colunas contendo a mesma letra maiúscula, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para cada tratamento, as colunas contendo as mesmas letras minúsculas em diferentes pontos temporais, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

De maneira geral, a presença de Spm estimulou as atividades das P-H<sup>+</sup>-ATPases durante a morfogênese fúngica da *Y. lipolytica*. Em 14 h de crescimento não foi possível observar diferenças entre os tratamentos. No entanto, em 18 h de crescimento, a presença de Spm no meio de cultivo estimulou em ~1,6 vezes o transporte de H<sup>+</sup>, ~1,5 vezes a velocidade inicial de bombeamento de H<sup>+</sup> e ~1,3 vezes a atividade hidrolítica em relação às células controle. Mas foi em 20 h de cultivo que a enzima atingiu seu maior nível de estimulação pela Spm, com valores de ~2,3 vezes no transporte de H<sup>+</sup>, ~2,0 vezes na velocidade inicial de bombeamento de H<sup>+</sup> e ~1,5 vezes na atividade hidrolítica. Após 20 h de crescimento, o efeito estimulatório causado pela Spm permaneceu, apesar da diferença entre as células controle e tratadas com Spm diminuir (Figura 15, Tabela 2). Assim, os dados indicam que a presença de Spm no meio de cultivo potencializa as atividades da P-H<sup>+</sup>-ATPase, principalmente nos momentos iniciais do crescimento das hifas fúngicas.



**Figura 15.** Ativação da P-H<sup>+</sup>-ATPase pela Spm durante a morfogênese de *Y. lipolytica*. Razão da atividade de transporte de H<sup>+</sup> (▲), velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> (◆) e hidrólise de ATP (●) da P-H<sup>+</sup>-ATPase obtidas das vesículas de membranas totais isoladas de células de *Y. lipolytica* cultivadas por 14, 18, 20, 22 ou 26 h na presença e na ausência de Spm. A morfogênese (○) representa a porcentagem de células leveduriformes no cultivo celular em condições controle. As células de levedura foram contadas e o valor máximo obtido foi considerado 100% (18 h). Valores representativos de pelo menos quatro experimentos independentes.

**Tabela 2.** Razão da amplitude máxima ( $F_{max}$ ), velocidade inicial ( $V_0$ ) do transporte de H<sup>+</sup>, hidrólise de ATP e imuno-resposta da Pma1p em vesículas de membranas totais isoladas de células de *Y. lipolytica* cultivadas por 14, 18, 20, 22 ou 26 h na presença ou ausência de 1 mM de Spm.

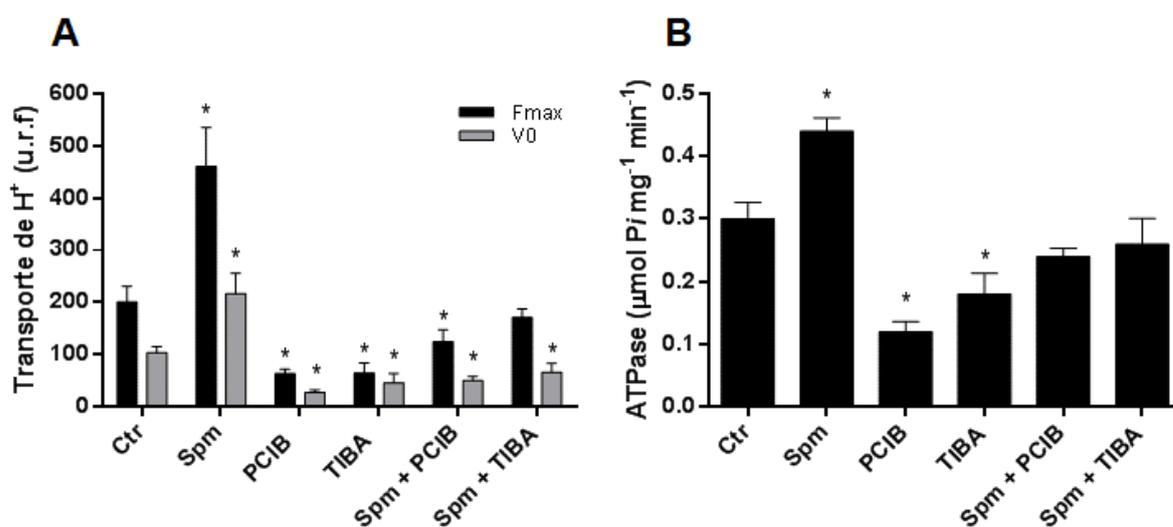
Razão (Spm/Ctr)	14 h	18 h	20 h	22 h	26 h
Transporte de H <sup>+</sup> ( $F_{max}$ )	1,2	1,6	2,3	1,7	1,5
Velocidade Inicial de transporte de H <sup>+</sup> ( $V_0$ )	1,2	1,5	2,0	1,7	1,4
Hidrólise de ATP	1,1	1,3	1,5	1,2	1,2
Quantidade de Pma1p	1,1		1,5		1,2

As atividades da P-H<sup>+</sup>-ATPase também foram investigadas em células cultivadas na presença dos inibidores do transporte (TIBA) e da sinalização (PCIB) de auxina, previamente descritos como efetivos para sistemas vegetais. O bombeamento de H<sup>+</sup> ATP-dependente e vanadato-sensível em membranas totais isoladas das células de *Y. lipolytica* crescidas por 20 h na presença de PCIB ou TIBA foi reduzido em ~70% e ~60%, respectivamente. Mesmo na presença de Spm, o bombeamento de H<sup>+</sup> das células cultivadas na presença de PCIB permaneceu ~40% reduzido em relação ao controle, enquanto as células cultivadas na presença de TIBA e Spm apresentou inibição de ~10% quando comparado às células controle (Figura 16A).

A velocidade inicial de transporte de H<sup>+</sup> também foi significativamente reduzida por PCIB e TIBA (~75% e ~55%, respectivamente). A atividade permaneceu inibida

mesmo em células de *Y. lipolytica* crescidas na presença concomitante de Spm e PCIB ou TIBA, com inibição de 50% e 25%, respectivamente (Figura 16A).

A atividade de hidrólise de ATP vanadato-sensível nas vesículas de membranas totais isoladas das células de *Y. lipolytica* cultivadas na presença de PCIB ou TIBA também apresentou redução de ~30 e ~40%, respectivamente (Fig. 16B). Por outro lado, as vesículas de células crescidas na presença concomitante de Spm e TIBA ou PCIB tiveram a atividade restaurada para valores próximos aos obtidos pelas células do controle (Fig. 16B).

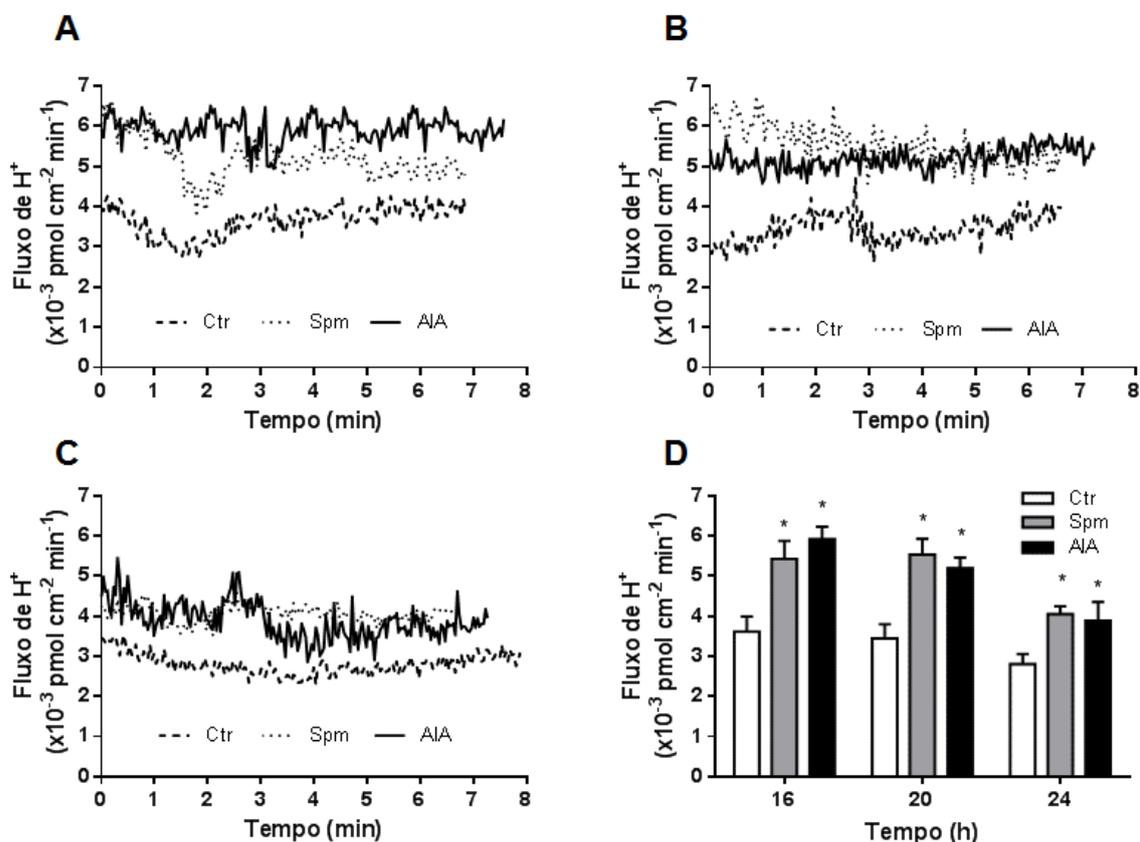


**Figura 16. Spm reverte parcialmente a ação dos inibidores PCIB e TIBA na atividade de P-H<sup>+</sup>-ATPase de *Y. lipolytica*.** A a amplitude máxima ( $F_{max}$ ), velocidade inicial de transporte de H<sup>+</sup> ( $V_0$ ) (A) e a hidrólise de ATP (B) da P-H<sup>+</sup>-ATPase obtida de vesículas de membranas totais isoladas de células de *Y. lipolytica* cultivadas durante 20 h na presença ou ausência de Spm, PCIB ou TIBA. Ctr, controle; Spm (1 mM); PCIB, (100 µM); TIBA, (100 µM). Valores representativos de pelo menos três experimentos independentes. Asteriscos representam diferenças significativas em relação às células não-tratadas (controle) pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4 Spm e AIA induzem o fluxo de H<sup>+</sup> em células de *Y. lipolytica*

O fluxo de H<sup>+</sup> também foi aferido *in vivo* nas células de *Y. lipolytica* por meio do sistema “*Scanning Ion-selective Electrode Technique*” (SIET), que consiste em um microelétrodo vibrátil robotizado contendo um ionóforo seletivo ao íon H<sup>+</sup>. Os testes demonstraram a ocorrência do predomínio de efluxo de H<sup>+</sup> durante as condições analisadas. No entanto, o efluxo de H<sup>+</sup> nas células crescidas na presença de AIA ou Spm foi significativamente superior às células controle nos tempos aferidos (Figura 17). Em 16 h de crescimento, o efluxo de H<sup>+</sup> nas células controle foi de  $3,6 \times 10^{-3}$  pmol cm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup>, enquanto nas células crescidas na presença de Spm ou AIA, a média foi de  $5,4 \times 10^{-3}$  e  $5,9 \times 10^{-3}$  pmol cm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup>, respectivamente. O efluxo de H<sup>+</sup> das células

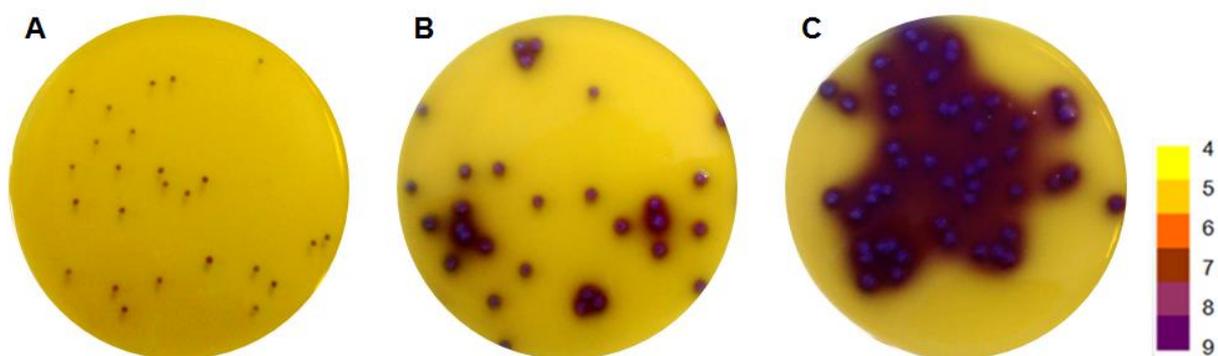
cultivadas com Spm e AIA manteve-se superior ao observado nas células controle em 20 h (~1,6 vezes) e 24 h de crescimento (~1,4 vezes) (Figura 17).



**Figura 17. Spm e AIA estimulam o efluxo de H<sup>+</sup> *in vivo* durante a morfogênese de *Y. lipolytica*.** Efluxo de H<sup>+</sup> representativo aferido *in vivo* em células de *Y. lipolytica* cultivadas durante 16 h (A), 20 h (B) ou 24 h (C) na presença ou ausência de Spm ou AIA. As microsondas foram posicionadas próximas ao concentrado de células e o gradiente de H<sup>+</sup> foi aferido por excursões de 15 μm de distância. (D) Valores médios do fluxo de H<sup>+</sup> de pelo menos três experimentos independentes. Ctr, controle; Spm, (1 mM); AIA, (10 pM). Asteriscos representam diferenças significativas em relação às células não-tratadas (controle) pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

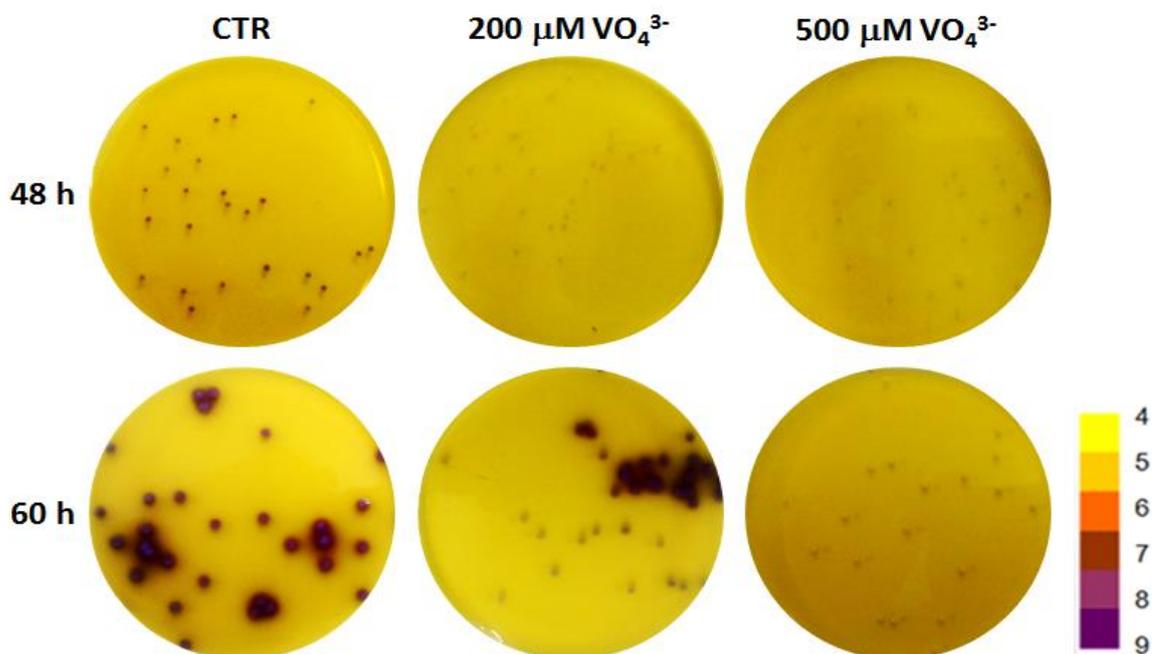
#### 4.5 Alterações no pH ambiental durante a morfogênese da *Y. lipolytica*

O monitoramento do pH ambiental durante o crescimento da *Y. lipolytica* em meio sólido foi realizado usando o indicador de pH púrpura de bromocresol (pKa 6,3), uma sonda capaz de alterar de cor amarela em pH ácido para cor púrpura em pH alcalino. O indicador foi adicionado em três momentos distintos durante o crescimento das colônias: 48, 60 e 72 h de crescimento, a fim de acompanhar a alteração do pH ambiental. Os resultados revelaram que as colônias de *Y. lipolytica* são capazes de alcalinizar o meio extracelular. As colônias com 72 h de crescimento apresentaram a alteração mais intensa na coloração (Figura 18).



**Figura 18. O pH ambiental é alcalinizado durante o desenvolvimento das colônias de *Y. lipolytica*.** Colônias não-tratadas (controle), cultivadas por 48 h (A), 60 h (B) ou 72 h (C), foram cobertas por uma fina camada de ágar *low-melting* contendo o indicador púrpura de bromocresol (0,015%).

A importância da P-H<sup>+</sup>-ATPase na alcalinização ambiental também ficou evidente por meio do crescimento das colônias em meio contendo vanadato (VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), um inibidor específico das P-ATPases. A presença de 200 μM de VO<sub>4</sub><sup>3-</sup> foi suficiente para diminuir a alcalinização ambiental, enquanto a concentração de 500 μM bloqueou completamente a alteração do pH ambiental (Figura 19).

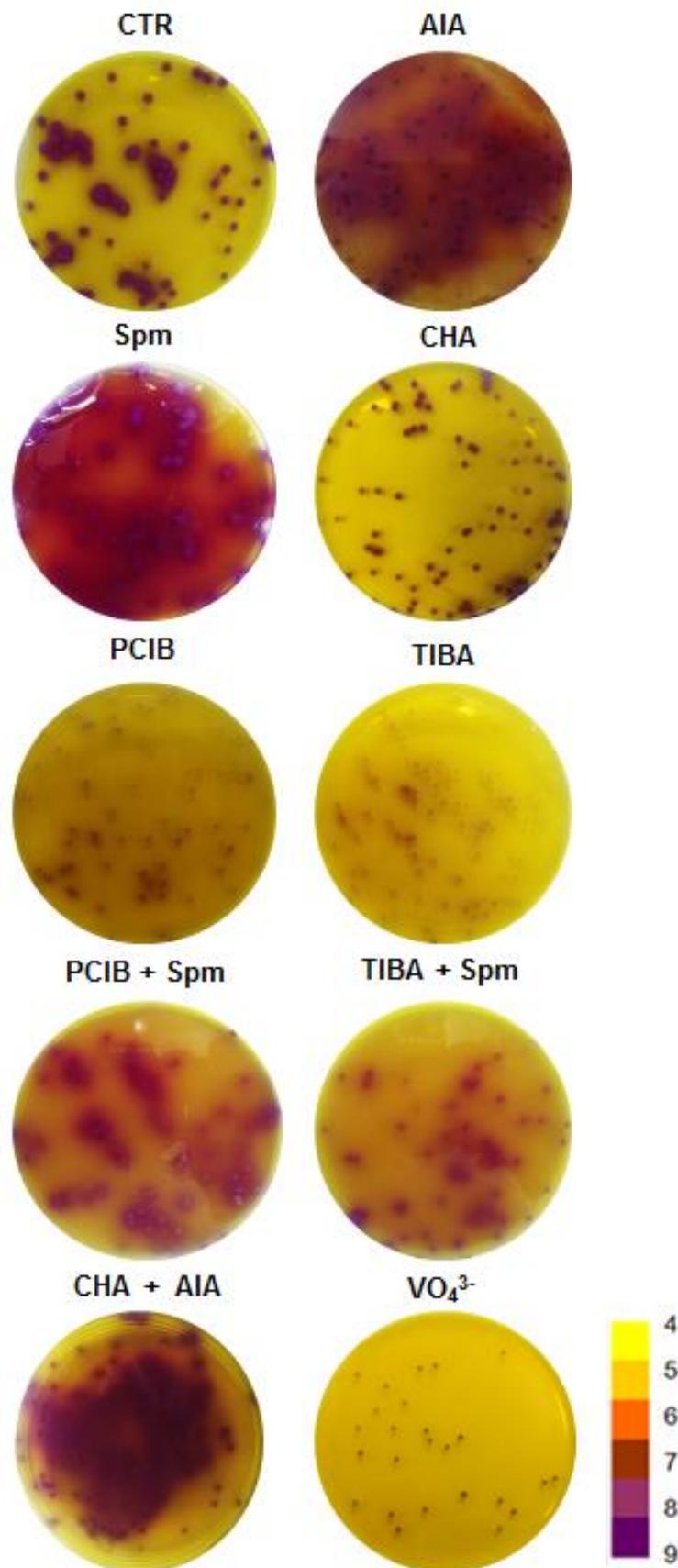


**Figura 19. O vanadato (VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) previne a alcalinização ambiental durante o desenvolvimento das colônias de *Y. lipolytica*.** As colônias foram cultivadas por 48 ou 60 h na presença ou ausência de vanadato (200 ou 500 μM). Uma fina camada de ágar *low-melting* contendo o indicador púrpura de bromocresol (0,015%) foi adicionado sobre a cultura.

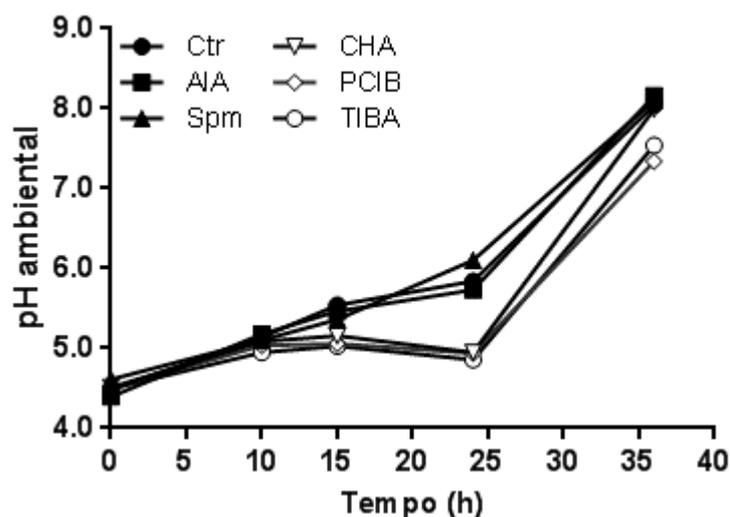
A importância da mudança do pH ambiental para a morfogênese também foi confirmada por meio do crescimento das colônias em meio contendo os indutores (Spm e AIA) e os inibidores (CHA, PCIB e TIBA) da morfogênese fúngica. A presença

de Spm ou AIA intensificou a alcalinização extracelular, enquanto a presença dos inibidores reduziu a mudança de pH (Figura 20). Colônias crescidas na presença concomitante de Spm e PCIB ou TIBA não restabeleceram o padrão de alcalização observado nas colônias do controle, enquanto a adição concomitante de auxina e CHA promoveu parcialmente a alcalinização extracelular (Figura 20). Esses dados corroboram a importância do pH ambiental como modulador da morfogênese fúngica.

A análise do pH de culturas de *Y. lipolytica* crescidas em meio líquido confirmou a alcalinização do meio extracelular. O meio de cultivo das células crescidas na ausência ou presença dos indutores da morfogênese (Spm ou AIA) apresentou um aumento no pH ambiental mais acentuado, enquanto a presença dos inibidores da morfogênese (CHA, PCIB ou TIBA) atrasou a alteração do pH ambiental. Em menos de 24 h foi possível observar uma variação de aproximadamente 1,5 unidades de pH (4,5 para 6,0) nas células cultivadas em condições controle ou na presença de Spm ou AIA (Figura 21), enquanto o meio de crescimento das células cultivadas na presença de CHA, PCIB ou TIBA variou do pH 4,5 para aproximadamente 5,0 (Figura 21).



**Figura 20. Avaliação do pH ambiental durante o desenvolvimento das colônias de *Y. lipolytica* cultivadas em diferentes indutores e/ou inibidores da morfogênese.** As colônias foram cultivadas por 60 h na presença ou ausência de AIA (10 pM); Spm (1 mM); TIBA (100 μM); PCIB (100 μM); CHA (2 mM) ou VO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (200 μM). Uma fina camada de ágar *low-melting* contendo o indicador púrpura de bromocresol (0,015%) foi adicionada sobre a cultura.

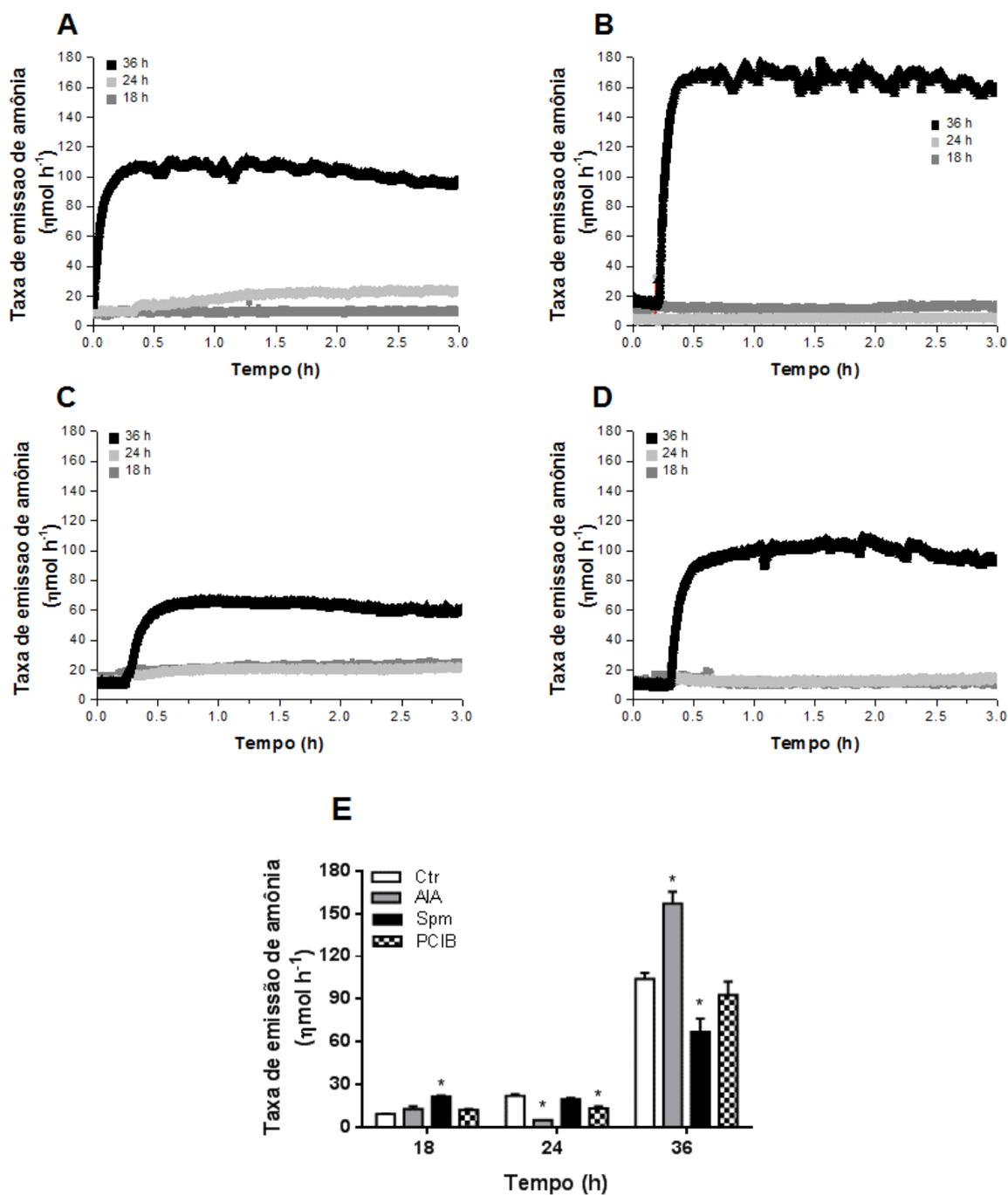


**Figura 21. Avaliação do pH ambiental em meio líquido durante a morfogênese de *Y. lipolytica*.** As células foram cultivadas por 36 h na presença ou ausência de AIA (10 pM); Spm (1 mM); TIBA (100  $\mu$ M); PCIB (100  $\mu$ M) ou CHA (2 mM). O pH ambiental foi aferido com potenciômetro em diferentes momentos de crescimento. Dados representativos de três experimentos independentes.

#### 4.6 Produção de amônia (NH<sub>3</sub>) pelas células de *Y. lipolytica*

A análise da produção de amônia foi realizada usando células de *Y. lipolytica* cultivadas por 18, 24 e 36 h em meio YED líquido suplementado ou não com AIA, Spm e PCIB por meio de espectrometria fotoacústica. Os resultados demonstraram que as células de *Y. lipolytica* foram capazes de produzir e exsudar amônia em concentrações nanomolares (nM). As células cultivadas na condição controle foram capazes de exudar 9,4 nM de NH<sub>3</sub> em 18 h de crescimento (Figura 22A,E), enquanto as células cultivadas na presença de AIA ou Spm exsudaram em torno de 12,9 e 21,6 nM de NH<sub>3</sub>, respectivamente (Figura 22B,C,E). Por outro lado, as células cultivadas na presença de PCIB exsudaram cerca de 12,1 nM de NH<sub>3</sub> em 18 h de crescimento (Figura 22D,E).

Interessantemente, a concentração de NH<sub>3</sub> detectada aumentou com o crescimento celular nas condições analisadas, com as maiores concentrações obtidas após 36 h de cultivo (Figura 22). As células da condição controle exsudaram aproximadamente 104 nM de NH<sub>3</sub> após 36 h de crescimento, enquanto as células crescidas na presença de AIA exsudaram 156 nM NH<sub>3</sub>. Por outro lado, as células crescidas na presença de PCIB (~93 nM) ou Spm (~67 nM) apresentaram quantidades menores de NH<sub>3</sub> quando comparada às células controle após 36 h de crescimento (Figura 22E).



**Figura 22. As células de *Y. lipolytica* produzem e exsudam amônia.** Produção de amônia (NH<sub>3</sub>) representativa detectada em células de *Y. lipolytica* crescidas por 18, 24 ou 36 h em condições controle (A), na presença de 10 pM de AIA (B), 1 mM de Spm (C) ou 100 μM de PCIB (D). A amônia volátil produzida pelas células foi detectada por espectroscopia fotoacústica. (E) Valores médios da produção de amônia de três experimentos independentes. Asteriscos representam diferenças significativas em relação às células não-tratadas (controle) pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.7 Morfologia vacuolar durante a morfogênese de *Y. lipolytica*

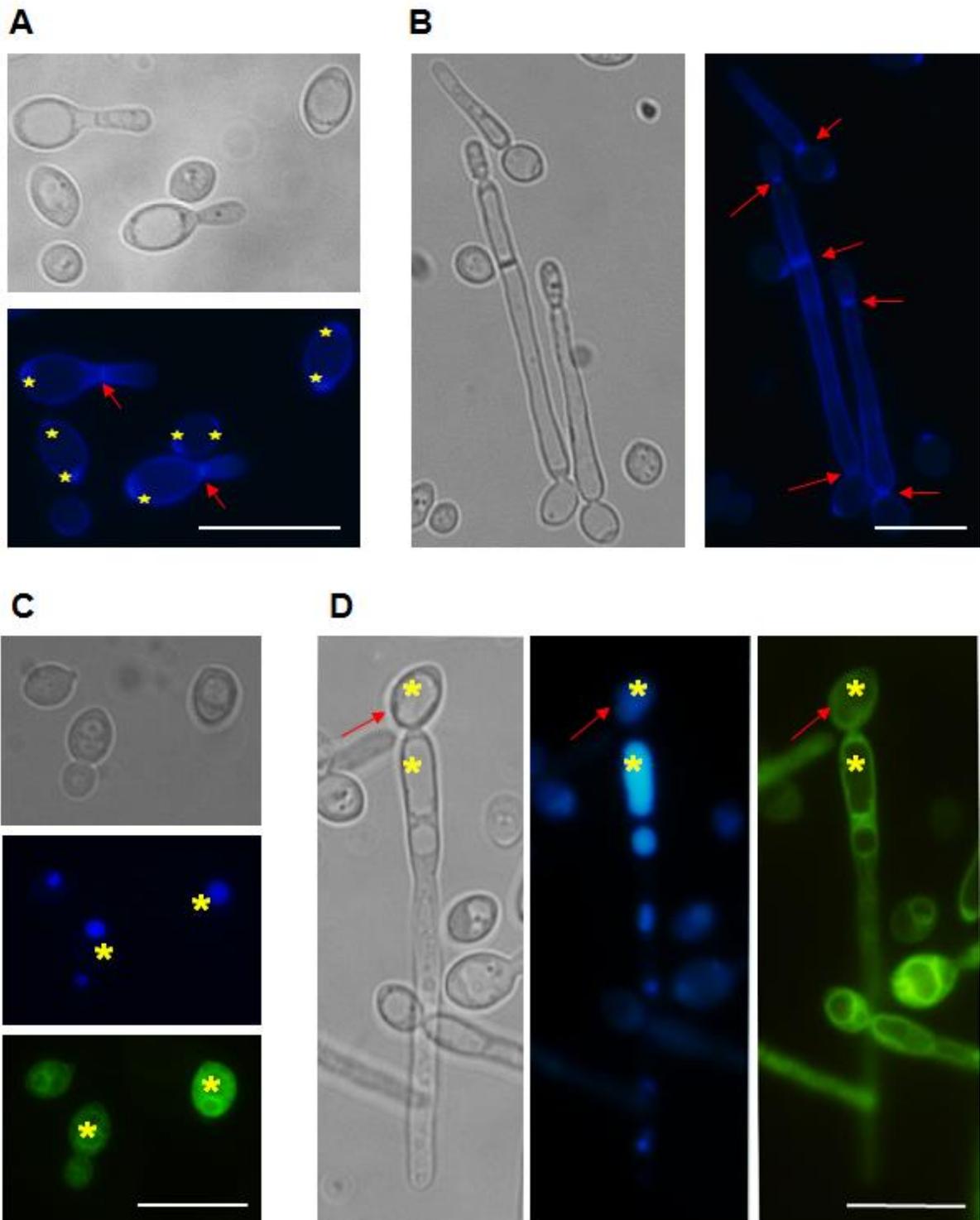
A morfogênese fúngica é caracterizada por alterações morfológicas, tanto no formato celular como em ultra-estruturas. Dessa forma, procuramos acompanhar as mudanças na morfologia do vacúolo durante o crescimento polarizado das hifas

fúngicas. Inicialmente, observamos por meio da sonda *Calcofluor White*, que as células leveduriformes de *Y. lipolytica* possuíam um padrão de divisão celular bipolar, caracterizado pela presença de cicatrizes de brotamento em lados opostos da célula (Figura 23A, estrelas). A morfogênese fúngica foi observada a partir do crescimento polarizado das células-filha ainda aderidas à célula-mãe, formando as pseudohifas. Essas células também foram caracterizadas pela presença de um septo entre a célula-filha e célula-mãe (Figura 23A, setas). A formação das hifas verdadeiras decorreu pelo alongamento da célula-filha, formando um longo filamento. No caso da *Y. lipolytica*, as hifas foram caracterizadas pela presença de septos ao longo do filamento fúngico (Figura 23B, setas).

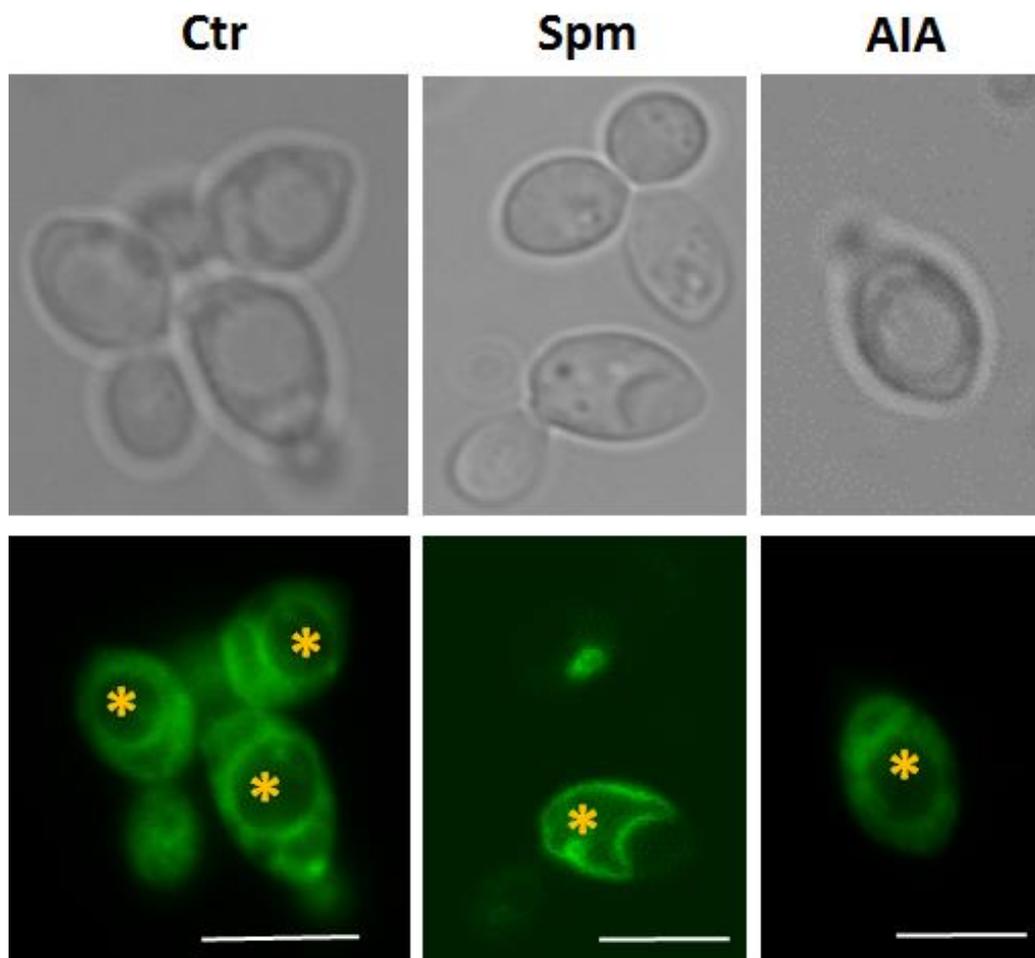
A morfologia dos vacúolos durante a formação das hifas foi acompanhada por meio dos marcadores seletivos MDY-64 e CMAC em células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio líquido na presença ou não dos indutores da filamentação (Spm e AIA). Inicialmente, observamos que as células leveduriformes apresentavam tipicamente um vacúolo arredondado (Figura 23C, asteriscos). Após a filamentação, os vacúolos adquiriam um formato mais alongado no interior das hifas, com pequenos vacúolos e vesículas na região apical, possivelmente responsáveis pelo transporte de constituintes essenciais para a manutenção do alongamento celular (Figura 23D, asteriscos). Ainda assim, a célula-mãe das hifas fúngicas possuía um grande vacúolo arredondado preenchendo o espaço intracelular (Figura 23D, setas).

A análise da morfologia dos vacúolos de leveduras de *Y. lipolytica*, cultivadas por 14 h, revelou que as células crescidas em condições controle ou na presença de AIA apresentaram um grande vacúolo arredondado (Figura 24, asteriscos), enquanto as células crescidas na presença de Spm apresentavam vacúolos mais irregulares preenchendo o espaço intracelular (Figura 24, Spm).

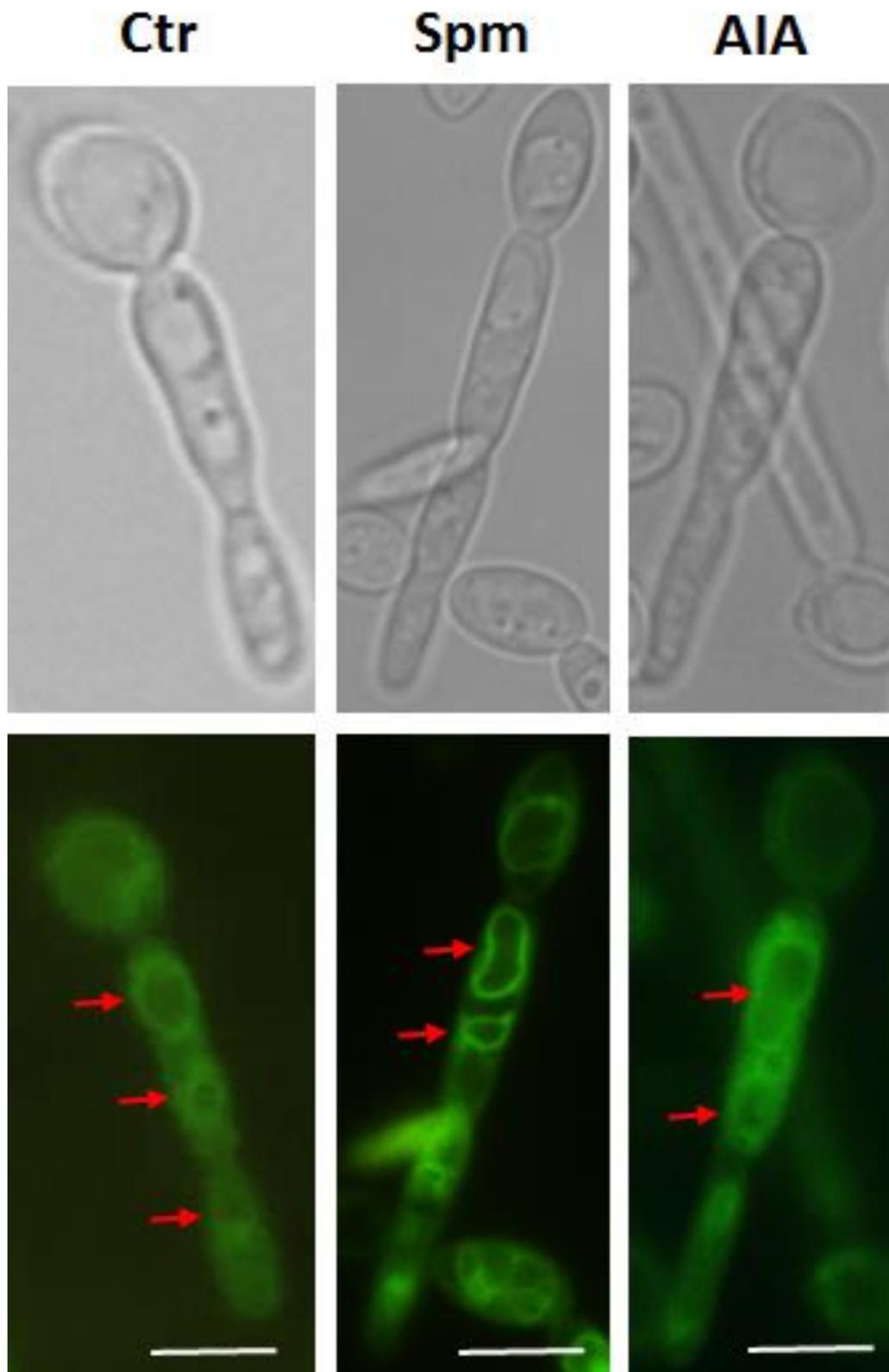
O surgimento das primeiras pseudohifas, após 20 h de cultivo, foi caracterizado pela formação de vários vacúolos e vesículas ao longo de toda a célula-filha que iniciava o crescimento polarizado (Figura 25, setas). Os vacúolos formados na região posterior das pseudohifas cultivadas em condições controle ou na presença de AIA apresentavam morfologia mais arredondada ou elíptica (Figura 25, Ctr e AIA). Por outro lado, os vacúolos das pseudohifas crescidas em Spm apresentavam um formato mais irregular, com distorções significativas, algo não observado nas pseudohifas crescidas nas condições controle ou na presença de AIA (Figura 25, Spm).



**Figura 23. Morfologia celular e vacuolar nas células de *Y. lipolytica*.** (A) Presença de cicatrizes de brotamento bipolares (estrelas) em células leveduriformes e a formação de septos (setas) durante o crescimento das pseudohifas. (B) Presença de vários septos (setas) ao longo das hifas de *Y. lipolytica*. (C) Detalhe dos vacúolos arredondados (asteriscos) em células leveduriformes. (D) Vacúolos (asteriscos) observados na célula-mãe (setas) e na hifa de *Y. lipolytica*. O lúmen (azul) e a membrana vacuolar (verde) foram marcados seletivamente com sondas específicas. Barras representam 10 μm.



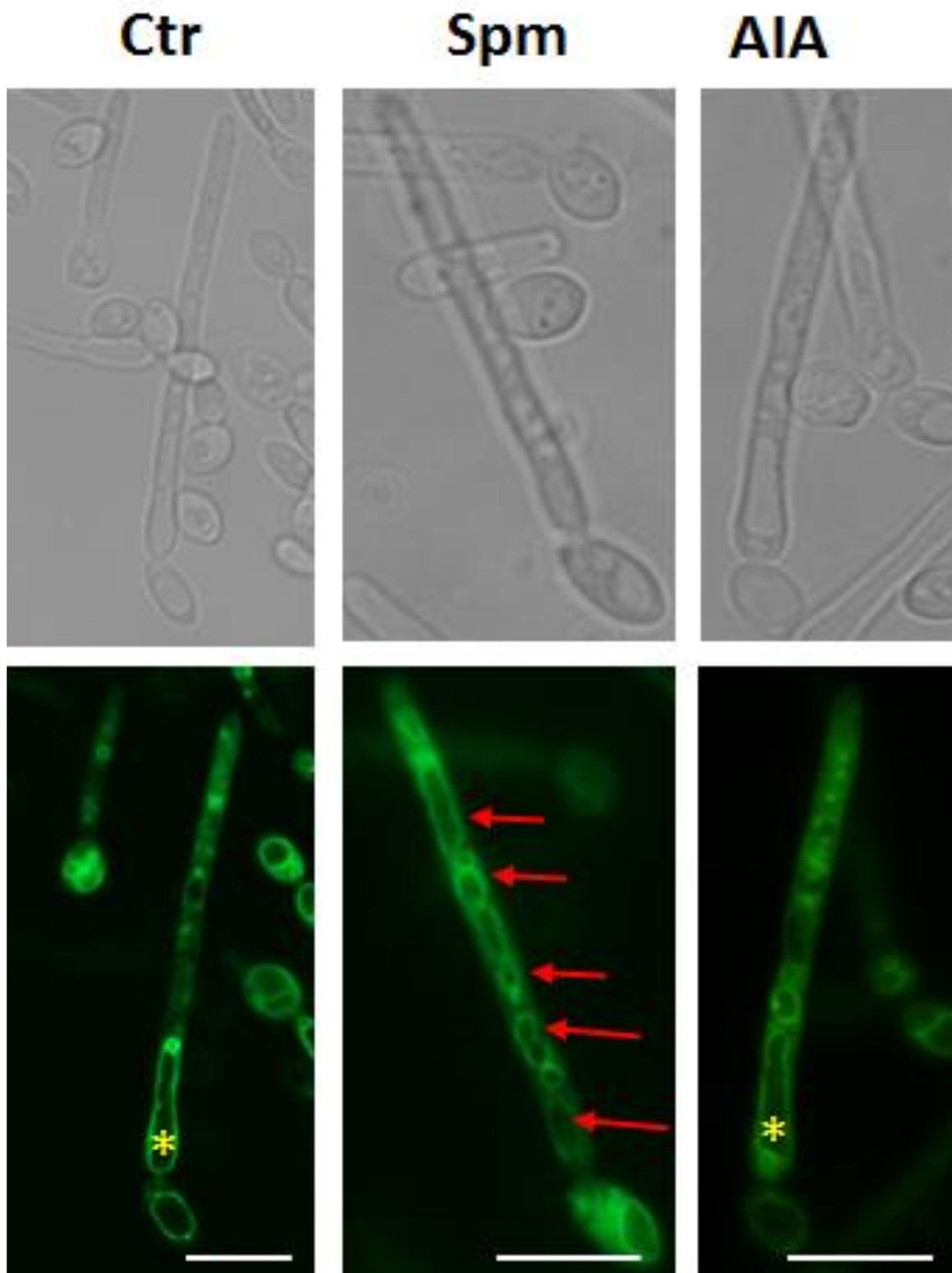
**Figura 24. Morfologia vacuolar das células de *Y. lipolytica* após 14 h de cultivo.** Leveduras observadas após 14 h de cultivo na presença ou ausência de Spm (1 mM) ou AIA (10 pM). Os vacúolos (asteriscos) foram marcados seletivamente com sonda específica. Barras representam 5  $\mu\text{m}$ .



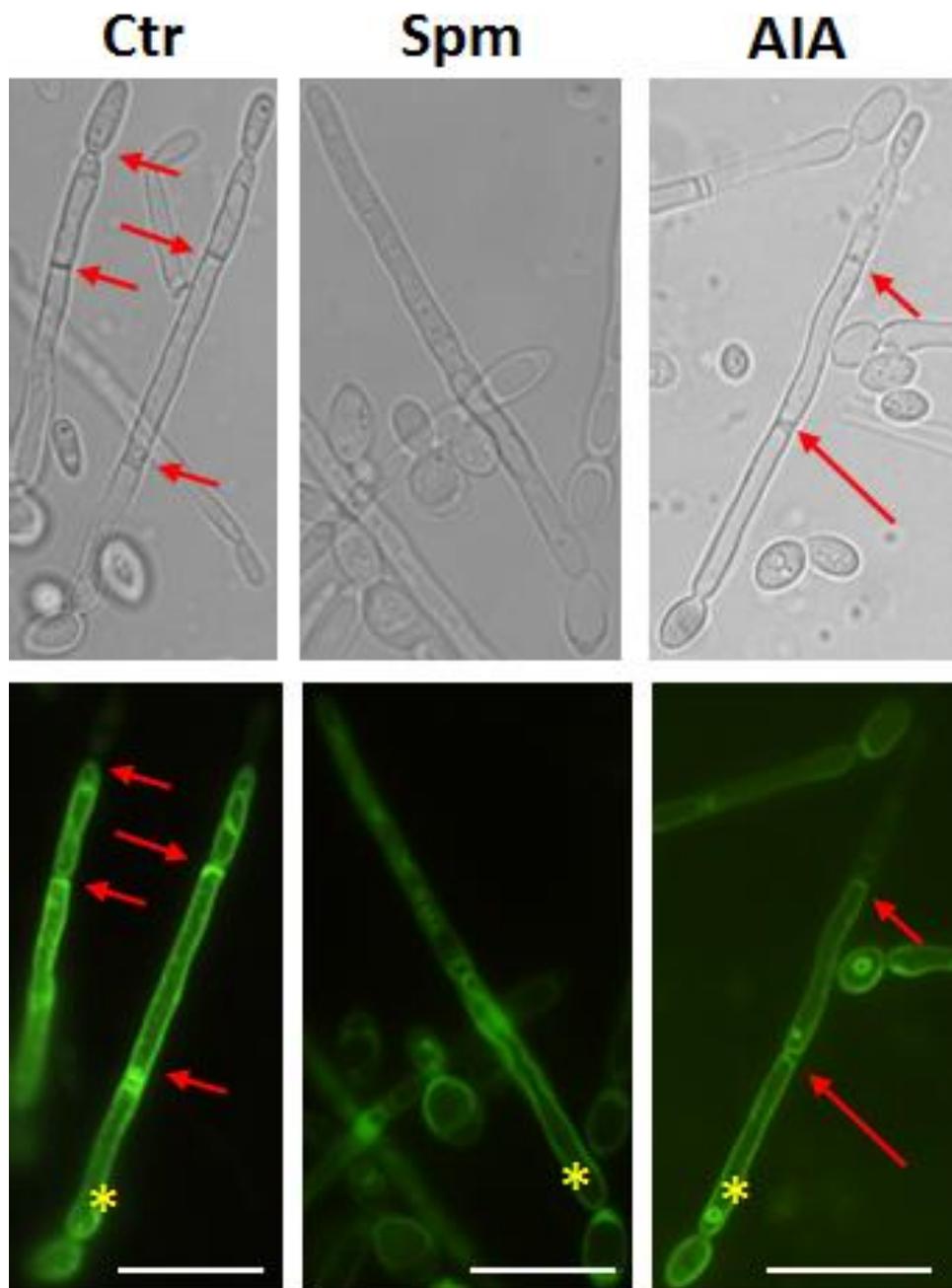
**Figura 25. Morfologia vacuolar das células de *Y. lipolytica* após 20 h de cultivo.** Células observadas após 20 h de cultivo na presença ou ausência de Spm (1 mM) ou AIA (10 pM). As pseudohifas observadas apresentavam vários pequenos vacúolos (setas) ao longo da célula marcados seletivamente com sonda específica. Barras representam 5  $\mu$ m.

As hifas, observadas após 26 h de crescimento, apresentavam o início da formação de vacúolos tubulares na região mais posterior das células cultivadas nas condições controle ou na presença de AIA (Figura 26, asteriscos), enquanto as hifas crescidas na presença de Spm apresentavam vacúolos menores e irregulares ao longo de todo o filamento (Figura 26, setas). Os vacúolos tubulares observados nas hifas foram, possivelmente, originados pela fusão dos pequenos vacúolos observados nos estádios iniciais do crescimento polarizado. A fusão vacuolar sempre ocorreu na região mais posterior das hifas e se dirigiu para a porção anterior, a qual ainda possuía várias pequenas vesículas, principalmente nas hifas formadas na presença de Spm ou AIA.

As hifas observadas na cultura após 36 h de cultivo na ausência ou presença de Spm ou AIA apresentavam um vacúolo tubular que preenchia praticamente toda a extensão das hifas (Figura 27, asteriscos), interrompido apenas pela presença dos septos (Figura 27, setas). Esses vacúolos tubulares foram, possivelmente, o resultado da fusão dos pequenos vacúolos e vesículas que compunham a célula ao longo da hifa fúngica. A formação desses vacúolos tubulares aparentava indicar a chegada na fase estacionária do crescimento polarizado, pois, ao que tudo indica, as hifas que possuíam esses longos vacúolos não cresciam mais, ou possuíam um crescimento muito lento.

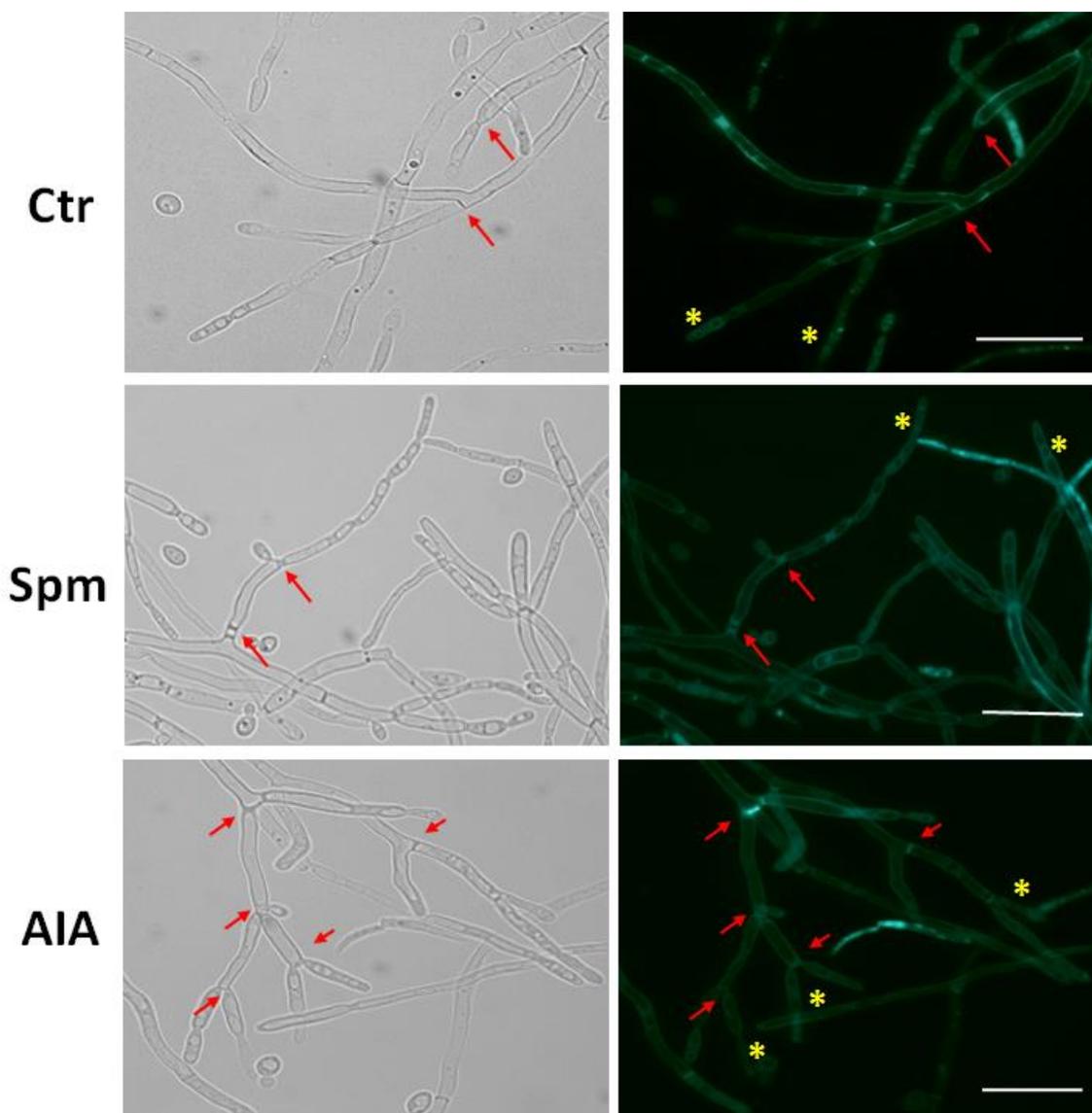


**Figura 26. Morfologia vacuolar das hifas de *Y. lipolytica* após 26 h de cultivo.** Hifas observadas após 26 h de cultivo na presença ou ausência de Spm (1 mM) ou AIA (10 pM). As hifas crescidas em condições controle ou na presença de AIA apresentavam a formação de vacúolos tubulares na região distal (asteriscos), enquanto as hifas crescidas na presença de Spm apresentavam vários pequenos vacúolos (setas) ao longo do filamento. Os vacúolos foram marcados seletivamente com sonda específica. Barras representam 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 27. Morfologia vacuolar das hifas de *Y. lipolytica* após 36 h de cultivo.** Hifas observadas após 36 h de cultivo na presença ou ausência de Spm (1 mM) ou AIA (10 pM). As hifas apresentavam longos vacúolos tubulares (asteriscos) ao longo do filamento interrompido por septos (setas). Os vacúolos foram marcados seletivamente com sondas específicas. Barras representam 20  $\mu\text{m}$ .

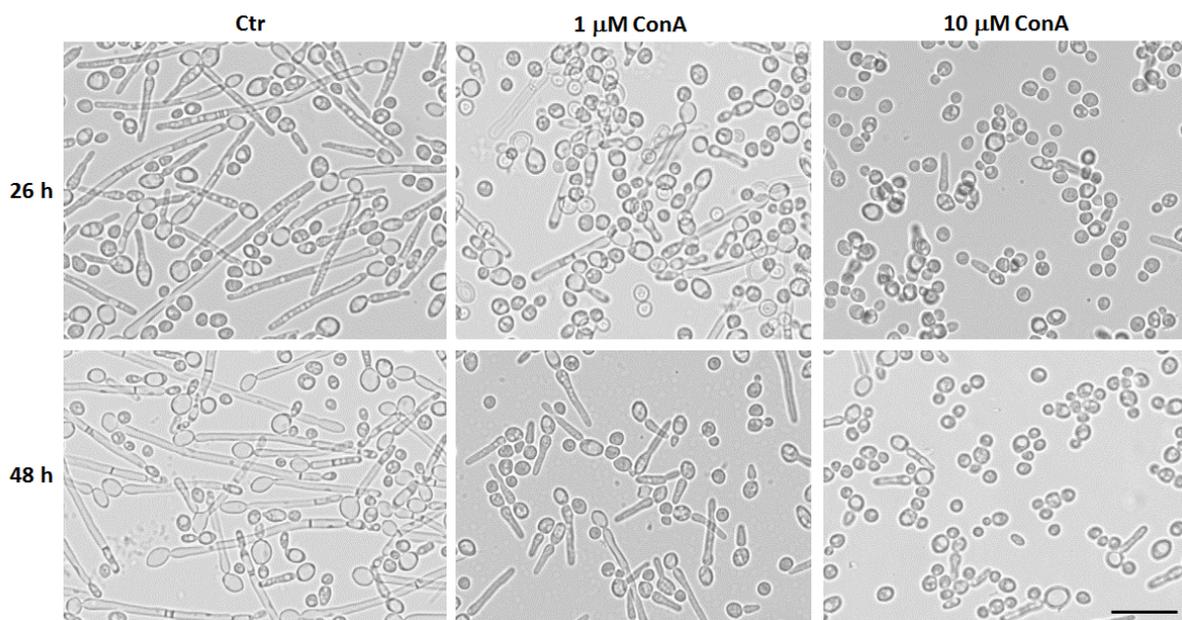
A morfologia vacuolar também foi verificada em células de *Y. lipolytica* crescidas em meio sólido. A análise revelou que as hifas foram preenchidas por longos vacúolos tubulares interrompidos por septos (Figura 28, setas) e pequenos vacúolos e vesículas citoplasmáticas na região apical (Figura 28, asteriscos). As células crescidas na presença de AIA ou Spm apresentavam maiores quantidades de pequenos vacúolos e vesículas na região apical (Figura 28, Spm e AIA). Esses resultados sugerem a importância da presença dos pequenos vacúolos e vesículas citoplasmáticas para a manutenção do crescimento polarizado na região apical das hifas.



**Figura 28. Morfologia vacuolar das células de *Y. lipolytica* cultivadas em meio sólido.** Células observadas após 4 dias de cultivo na presença ou ausência de Spm (1 mM) ou AIA (10 pM). As hifas apresentavam pequenos vacúolos e vesículas na região apical (asteriscos) e longos vacúolos tubulares interrompidos por septos (setas) ao longo dos filamentos. Os vacúolos foram marcados seletivamente com sonda específica. Barras representam 20  $\mu$ m.

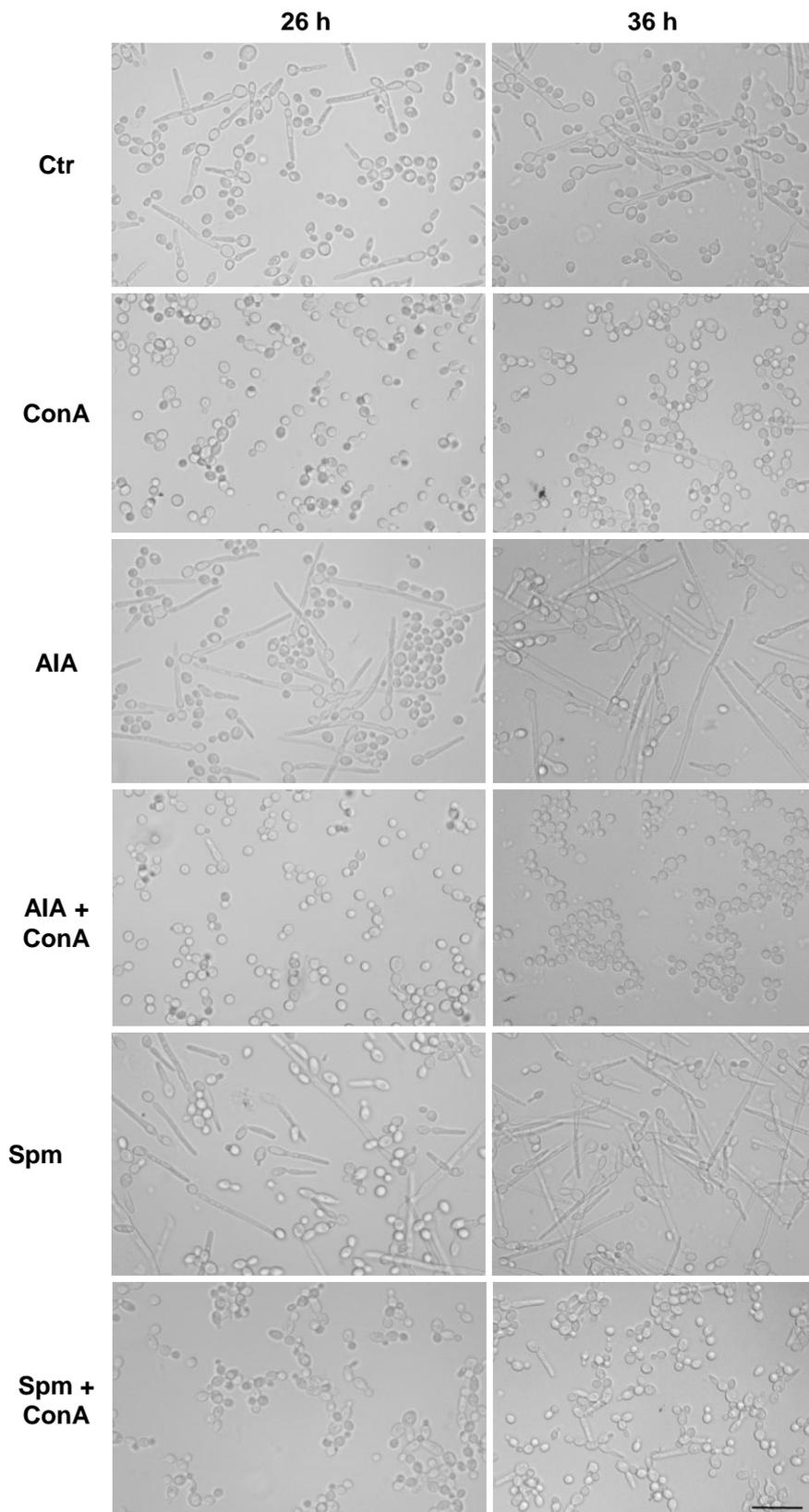
#### 4.8 ConA previne a morfogênese de *Y. lipolytica*

A importância da V-H<sup>+</sup>-ATPase também foi investigada durante a morfogênese da *Y. lipolytica*. Dessa forma, inicialmente as células foram crescidas em diferentes concentrações de ConA, um inibidor específico da V-H<sup>+</sup>-ATPase. As células crescidas na presença de 1  $\mu$ M de ConA apresentaram inibições significativas na morfogênese, enquanto a maior concentração (10  $\mu$ M) preveniu completamente a transição levedura-hifa (Figura 29).



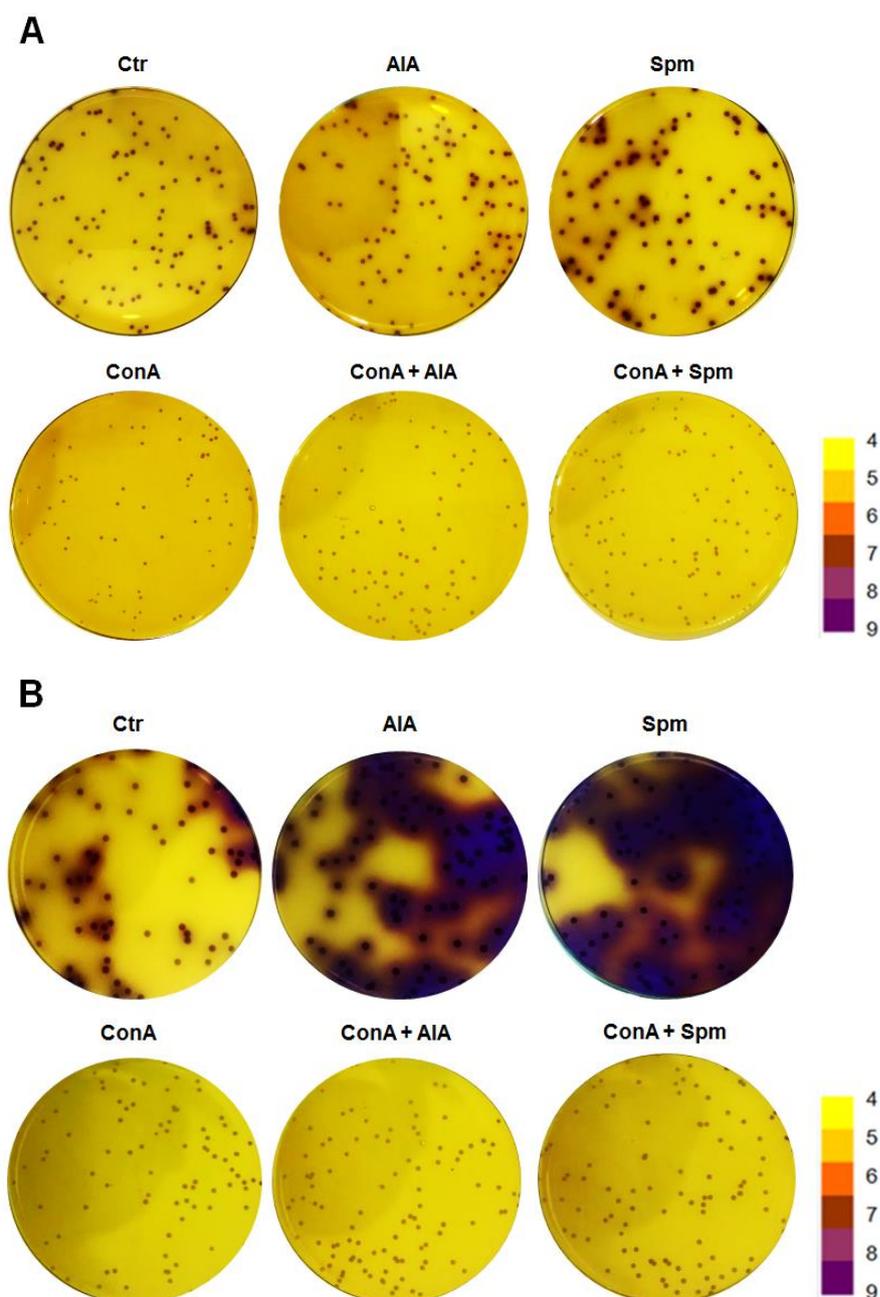
**Figura 29. ConA previne a morfogênese da *Y. lipolytica*.** As células foram cultivadas por 26 ou 48 h na presença ou ausência de ConA (1 ou 10  $\mu$ M). Barra representa 20  $\mu$ m.

O efeito inibitório da ConA também ficou evidente em células cultivadas na presença concomitante dos indutores da morfogênese (Spm e AIA), pois a presença de 1  $\mu$ M de ConA preveniu significativamente a filamentação da *Y. lipolytica*, mesmo na presença de AIA ou Spm (Figura 30). Esses resultados sugerem a importância da atividade da V-H<sup>+</sup>-ATPase na manutenção do crescimento polarizado das células hifais promovidas por Spm ou AIA.



**Figura 30. ConA previne a morfogênese de *Y. lipolytica* cultivada na presença de Spm ou AIA.** As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 26 ou 48 h na presença ou ausência de ConA (1  $\mu$ M), AIA (10 pM) e/ou Spm (1 mM). Barra representa 20  $\mu$ m.

A presença de ConA também preveniu a alcalinização ambiental causada pelas células de *Y. lipolytica*. O crescimento das células em meio sólido contendo apenas 500 nM de ConA reduziu significativamente a alcalinização ambiental quando comparada às células controle (não mostrado). Além disso, as colônias de *Y. lipolytica* crescidas em meio sólido na presença concomitante de ConA e um dos indutores da morfogênese (Spm ou AIA) também não alcalinizaram o pH ambiental (Figura 31). O efeito inibitório da ConA na mudança do pH pôde ser observado tanto em 48 h de cultivo (Figura 31, painel A), como após 60 h de cultivo (Figura 31, painel B).



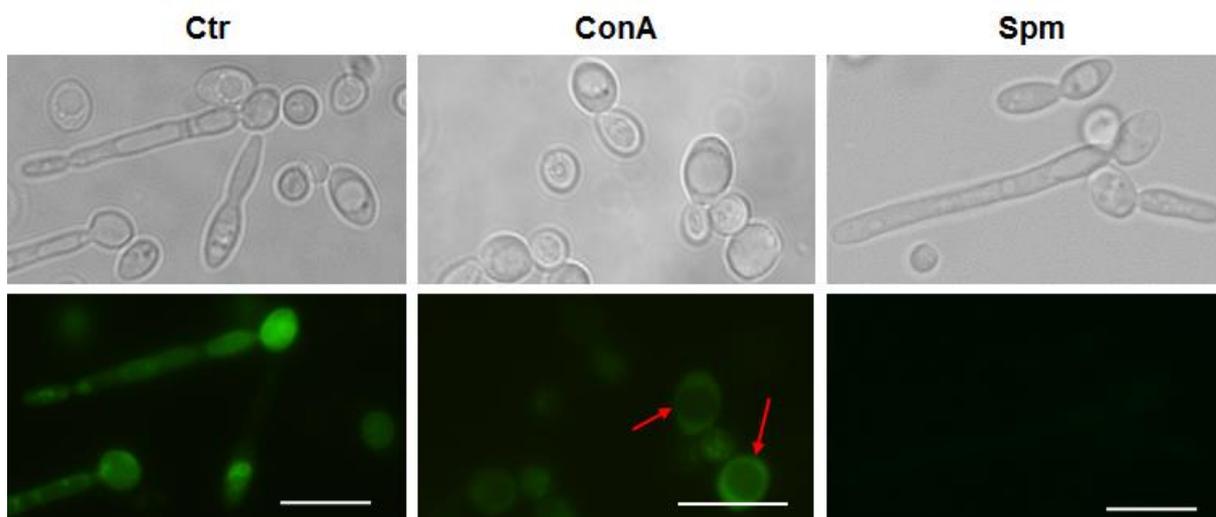
**Figura 31. ConA previne a alcalinização ambiental durante o desenvolvimento das colônias de *Y. lipolytica* cultivadas na presença de Spm ou AIA.** As colônias foram cultivadas por 48 h (A) ou 60 h (B) na presença ou ausência de ConA (1  $\mu$ M), AIA (10 pM) e/ou Spm (1 mM). Uma fina camada de ágar *low-melting* contendo o indicador púrpura de bromocresol (0,015%) foi adicionado sobre a cultura.

Também monitoramos as alterações no pH vacuolar durante a morfogênese da *Y. lipolytica* por meio da sonda fluorescente quinacrina, sensível a pHs ácidos. Os ensaios revelaram que a sonda marcou os vacúolos de *Y. lipolytica* somente após 24 h de cultivo, principalmente nas células que haviam iniciado a transição levedura-hifa. A sonda não foi capaz de marcar os vacúolos de células leveduriformes crescidas por 20 h na presença ou não de Spm ou ConA (dados não mostrados).

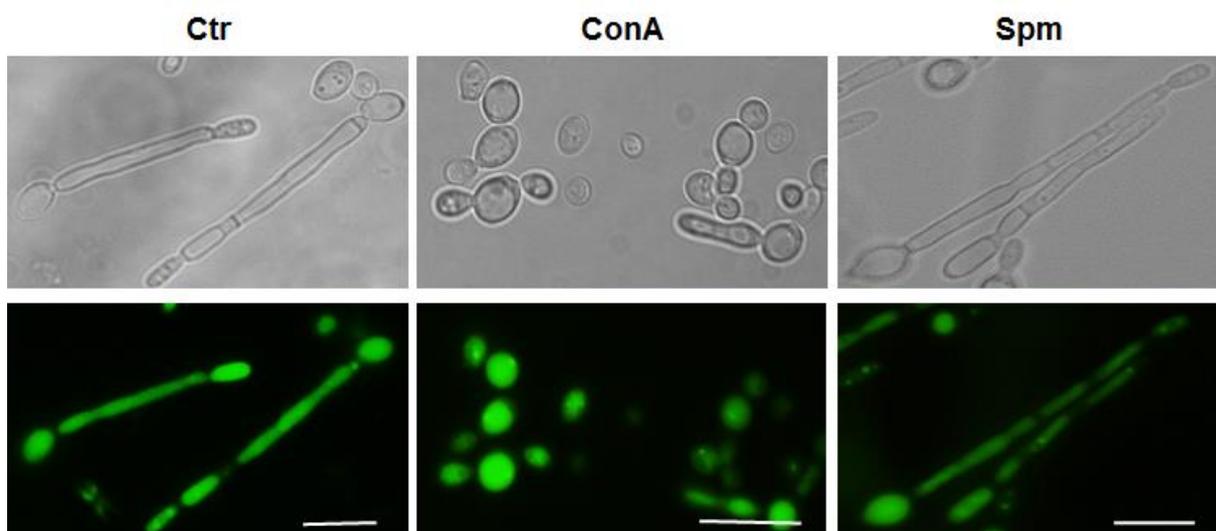
Os vacúolos de pseudohifas ou hifas verdadeiras das células cultivadas por 26 h na condição controle foram marcados seletivamente pela quinacrina, enquanto os vacúolos das hifas observadas no cultivo contendo Spm não apresentaram a marcação, possivelmente devido a basicidade da Spm estocada nos vacúolos (Figura 32, Ctr e Spm). Interessantemente, as leveduras cultivadas na presença de 1  $\mu$ M de ConA por 26 h, que tiveram a morfogênese bloqueada, também não apresentaram a marcação vacuolar, no entanto, ocorreu a acidificação da região citoplasmática, ao redor dos vacúolos (Figura 32, setas).

Após 36 h de cultivo, os vacúolos das células na forma de hifas ou pseudohifas crescidas na presença ou ausência de 1 mM de Spm foram marcados seletivamente pela quinacrina, indicando a acidez vacuolar (Figura 33, Ctr e Spm). Além disso, os vacúolos das leveduras que tiveram a morfogênese bloqueada quando cultivadas na presença de ConA também foram marcados pela sonda quinacrina após 36 h de cultivo (Figura 33, ConA).

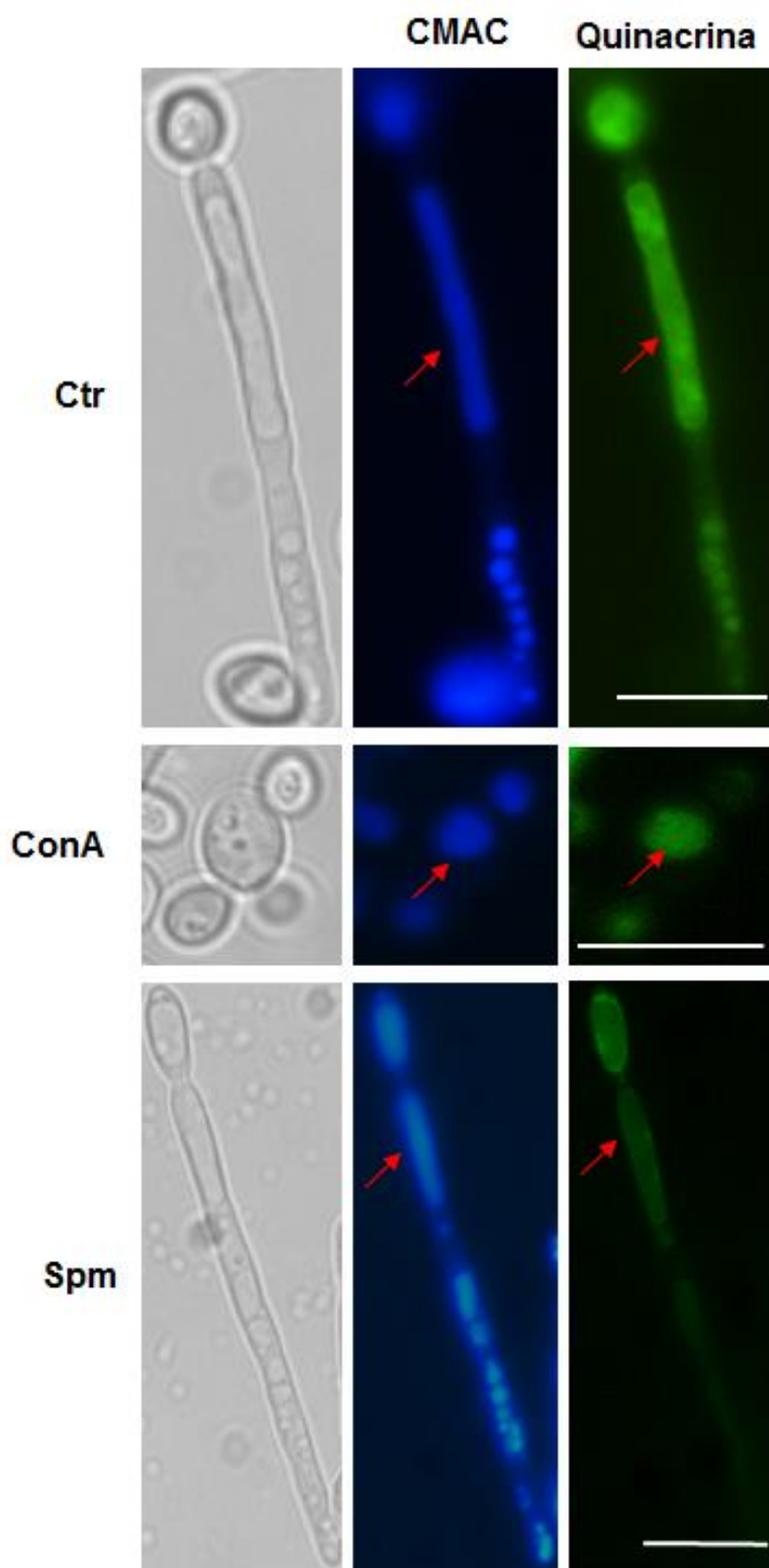
Os ensaios de acidez vacuolar também foram realizados na presença das sondas seletivas para o lúmen vacuolar, a fim de indicar a correspondência na marcação. Os resultados indicaram a sobreposição da sonda marcadora do lúmen vacuolar (derivados de CMAC) e da quinacrina nas células cultivadas por 36 h, confirmando a acidez do compartimento vacuolar (Figura 34, setas).



**Figura 32. ConA e Spm previnem a acidificação vacuolar em células de *Y. lipolytica* cultivadas por 26 h.** Células observadas após 26 h de cultivo na presença ou ausência de ConA (1  $\mu$ M) ou Spm (1 mM). A presença de ConA ou Spm preveniu a detecção da acidez vacuolar pela sonda quinacrina, no entanto, a presença de ConA causou a acidez citoplasmática (setas). Barras representam 10  $\mu$ m.



**Figura 33. Os vacúolos de células de *Y. lipolytica* cultivadas na presença ou na ausência de ConA ou Spm acidificam após 36 h.** As células observadas após 36 h de cultivo na presença ou ausência de ConA (1  $\mu$ M) ou Spm (1 mM) tiveram a acidez vacuolar detectada pela sonda quinacrina. Barras representam 10  $\mu$ m.



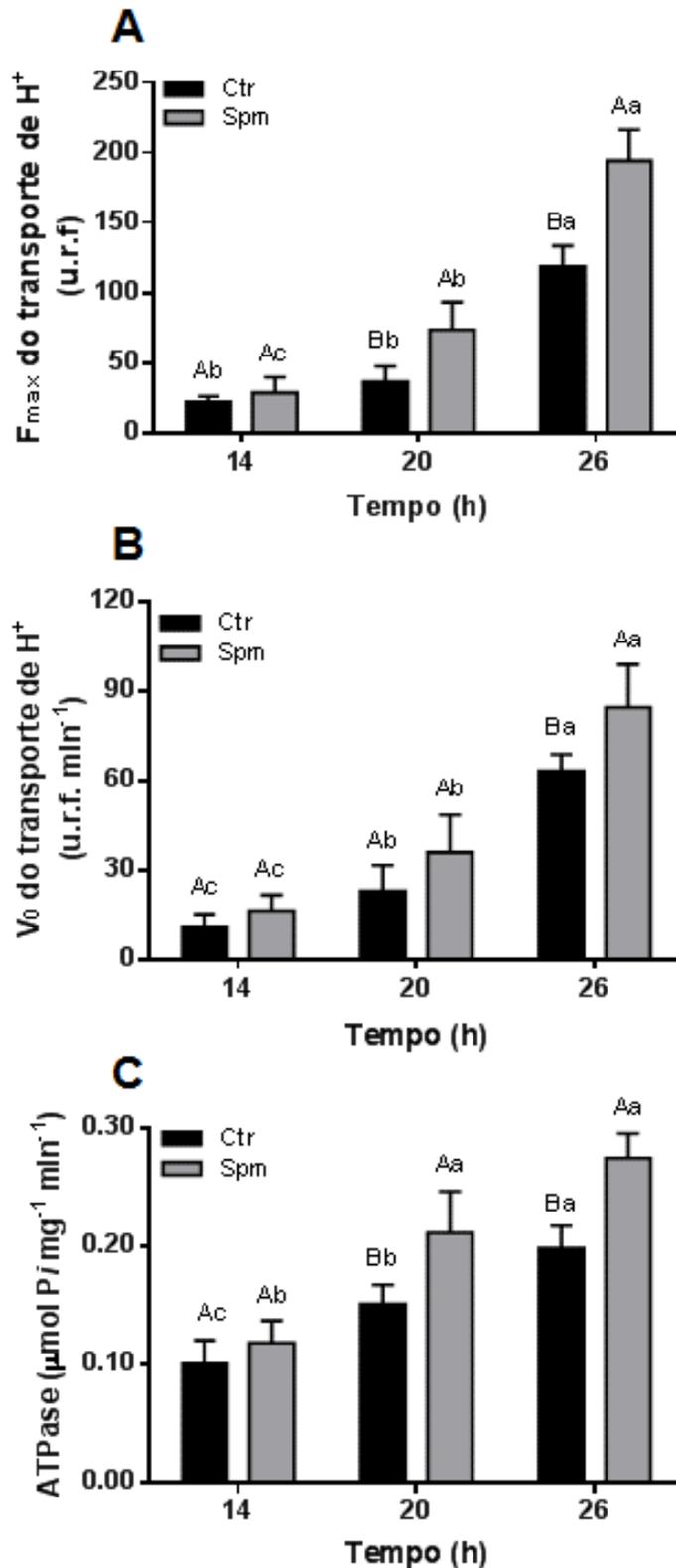
**Figura 34. Acidificação vacuolar das células de *Y. lipolytica* cultivadas por 36 h.** Células observadas após 36 h de cultivo na presença ou ausência de ConA (1  $\mu$ M) ou Spm (1 mM). As setas indicam a correspondência entre a marcação vacuolar pelas sondas derivadas de CMAC e os compartimentos ácidos marcados com a sonda quinacrina. Barras representam 10  $\mu$ m.

#### 4.9 Ativação da V-H<sup>+</sup>-ATPase durante a morfogênese de *Y. lipolytica*

Assim como a P-H<sup>+</sup>-ATPase, as atividades de transporte de H<sup>+</sup> e hidrólise de ATP da V-H<sup>+</sup>-ATPase também foram determinadas em vesículas de membranas totais isoladas durante a morfogênese da *Y. lipolytica* cultivadas na presença ou ausência de 1 mM de Spm. O transporte ( $F_{max}$ ) e a velocidade inicial de bombeamento de H<sup>+</sup> ( $V_0$ ) da V-H<sup>+</sup>-ATPase foram determinados pelo decaimento da fluorescência do ACMA e sensíveis a 110 nM de ConA.

A atividade da V-H<sup>+</sup>-ATPase apresentou os menores valores nas células controle, predominantemente na forma de leveduras (14 h). O gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup> aumentou ~1,7 e ~5,3 vezes após 20 e 26 h de crescimento, respectivamente. A velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> também aumentou após 20 (~2 vezes) e 26 h (~5,6 vezes) de crescimento (Figura 35A, Tabela 3). A presença de Spm no meio de cultivo não influenciou significativamente as atividades da V-H<sup>+</sup>-ATPase nas células cultivadas por 14 h quando comparadas às células controle. No entanto, as células cultivadas por 20 ou 26 h na presença Spm apresentaram um estímulo significativo no transporte e na velocidade inicial. O aumento foi de ~2,5 e ~6,7 vezes no transporte de H<sup>+</sup> após 20 e 26 h de crescimento, respectivamente, quando comparado às células de 14 h. A velocidade inicial também foi estimulada em ~2,1 e ~5,1 vezes após 20 e 26 h de crescimento, respectivamente (Figura 35B, Tabela 3).

A análise da atividade hidrolítica ConA-sensível e ATP-dependente também demonstrou aumento significativo após 20 (~1,5 vezes) e 26 h (~2 vezes) de crescimento nas células controle. A V-H<sup>+</sup>-ATPase foi estimulada na presença de Spm em ~1,8 e ~2,3 vezes após 20 e 26 h respectivamente, quando comparado à atividade detectada em 14 h de crescimento (Figura 35C, Tabela 3).



**Figura 35. Spm estimula a atividade da V-H<sup>+</sup>-ATPase durante a morfogênese de *Y. lipolytica*.** A amplitude máxima (A), a velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> (B) e a atividade hidrolítica (C) da V-H<sup>+</sup>-ATPase foram obtidos de vesículas de membranas totais isoladas de células de *Y. lipolytica* cultivadas durante 14, 20 ou 26 h na presença ou ausência de 1 mM Spm. Valores representativos de pelo menos quatro experimentos independentes. Para cada ponto temporal, as colunas contendo a mesma letra maiúscula, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para cada tratamento, as colunas contendo as mesmas letras minúsculas em diferentes pontos temporais, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

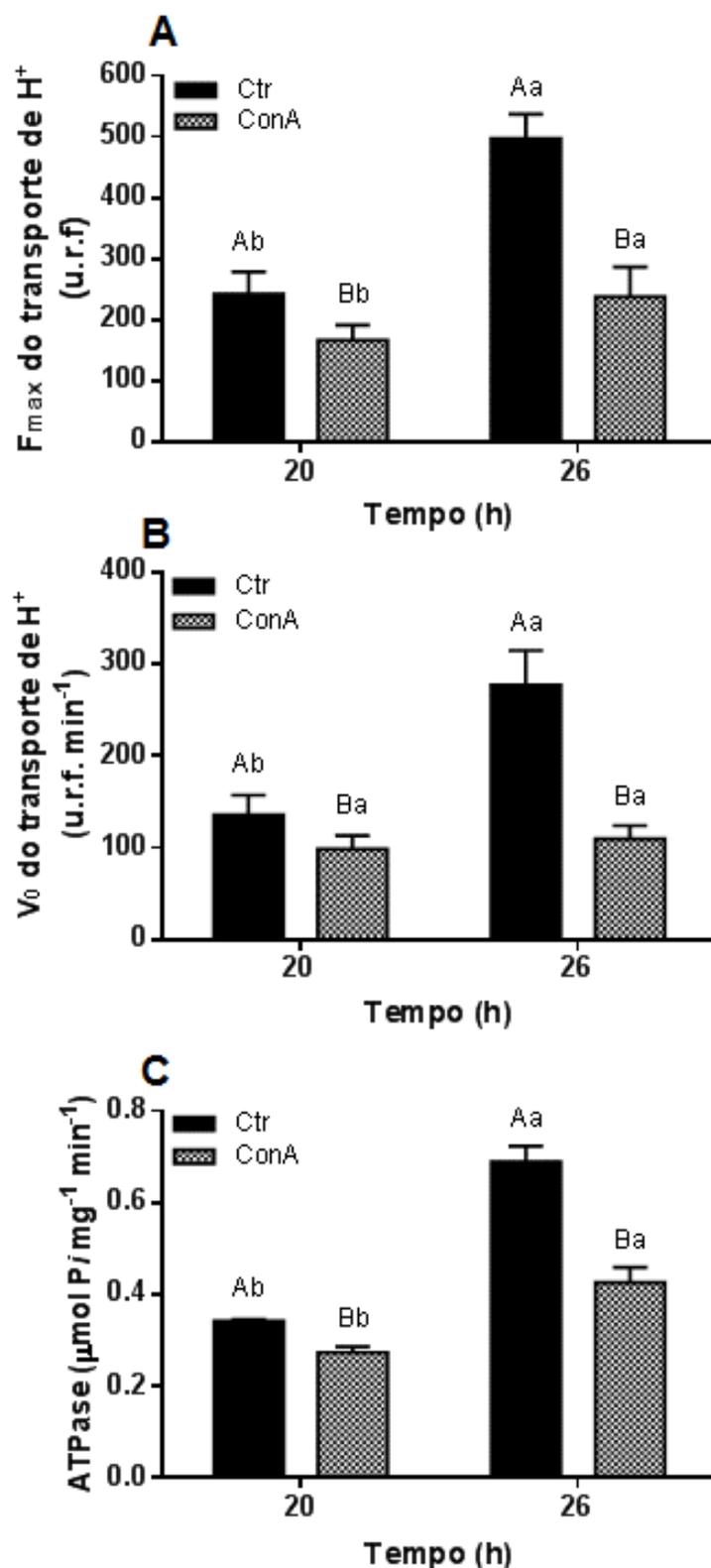
**Tabela 3.** Ativação relativa da amplitude máxima ( $F_{max}$ ), velocidade inicial ( $V_0$ ) do transporte de  $H^+$  e hidrólise de ATP da V- $H^+$ -ATPase em vesículas de membranas totais isoladas de células de *Y. lipolytica* cultivadas por 14, 20 ou 26 h na presença ou ausência de 1 mM de Spm.

Tempo (h)	14	20	26
$F_{max}$ do transporte de $H^+$			
Controle	1,0	1,7	5,3
1 mM Spm	1,0	2,5	6,7
$V_0$ do transporte de $H^+$			
Controle	1,0	1,9	5,6
1 mM Spm	1,0	2,1	5,1
Hidrólise de ATP			
Controle	1,0	1,5	2,0
1 mM Spm	1,0	1,8	2,3

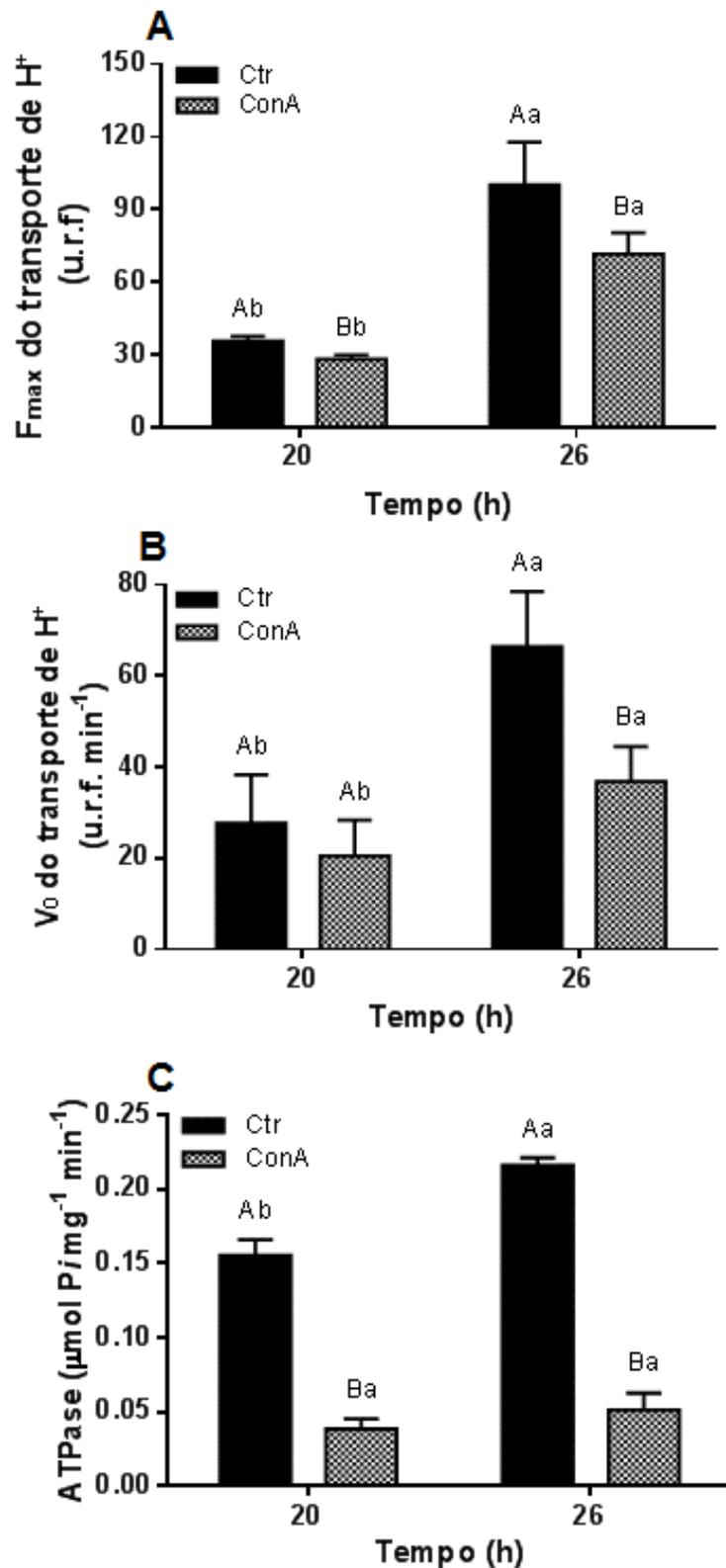
As atividades das duas bombas protônicas, P- e V- $H^+$ -ATPases, também foram investigadas em células cultivadas na presença de ConA. As vesículas de membranas totais foram isoladas de células cultivadas por 20 ou 26 h na presença ou ausência de 1  $\mu$ M de ConA. Os resultados mostraram um efeito inibitório da ConA em ambas as bombas protônicas. O transporte ( $F_{max}$ ) e a velocidade inicial ( $V_0$ ) da P- $H^+$ -ATPase foram inibidos (~2 e ~2,5 vezes, respectivamente) mesmo após 26 h de cultivo na presença de ConA (Figura 36A,B). A atividade hidrolítica da P- $H^+$ -ATPase também foi reduzida em ~1,3 e ~1,6 vezes após 20 e 26 h de cultivo, respectivamente (Figura 36C).

A atividade da V- $H^+$ -ATPase também foi significativamente menor nas células crescidas na presença de 1  $\mu$ M ConA. O transporte de  $H^+$  foi inibido em ~1,4 vezes em 20 e 26 h de crescimento, quando comparado com as células controle (Figura 37A). A velocidade inicial de transporte de  $H^+$  foi reduzido significativamente em ~1,8 vezes apenas nas células crescidas por 26 h (Figura 37B). A atividade hidrolítica da V- $H^+$ -ATPase também foi inibida em até 4,1 vezes nas células crescidas por 26 h na presença de ConA (Figura 37C).

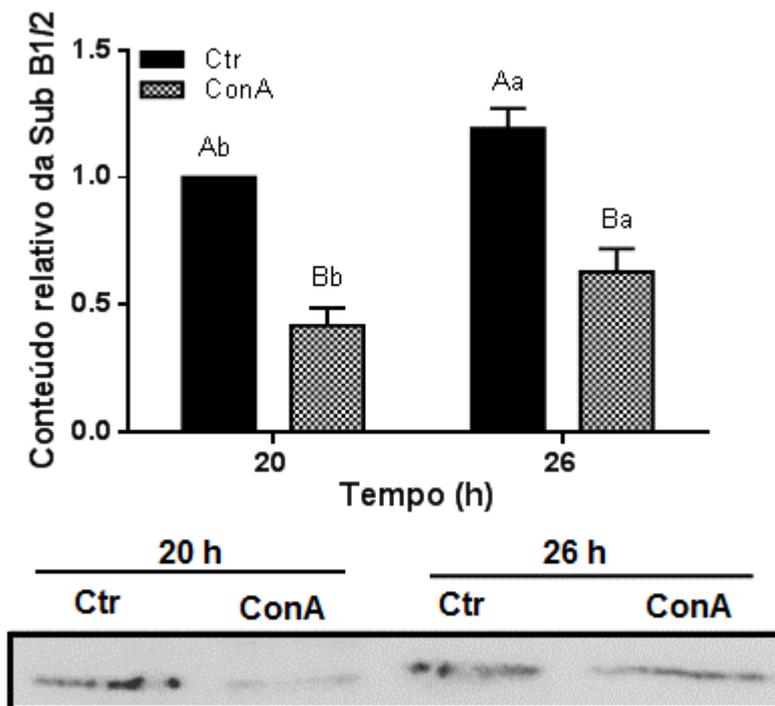
A análise de *western blotting* da subunidade B1/2 do domínio catalítico da V- $H^+$ -ATPase revelou que as células cultivadas na presença de 1  $\mu$ M de ConA apresentaram menores níveis de expressão da subunidade B1/2 quando comparado às células controle (Figura 37). Em 20 h de cultivo, os níveis de B1/2 estavam ~2,2 vezes inferiores aos níveis observados nas células controle. Apesar de ter aumentado após 26 h de cultivo, os níveis ainda se mantiveram ~1,5 vezes inferiores aos do controle (Figura 38).



**Figura 36. ConA inibe a atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase durante a morfogênese de *Y. lipolytica*.** A amplitude máxima (A), a velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> (B) e a atividade hidrolítica (C) da P-H<sup>+</sup>-ATPase foram obtidos de vesículas de membranas totais isoladas de células de *Y. lipolytica* cultivadas durante 20 ou 26 h na presença ou ausência de 1  $\mu$ M ConA. Valores representativos de três experimentos independentes. Para cada ponto temporal, as colunas contendo a mesma letra maiúscula, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para cada tratamento, as colunas contendo as mesmas letras minúsculas em diferentes pontos temporais, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

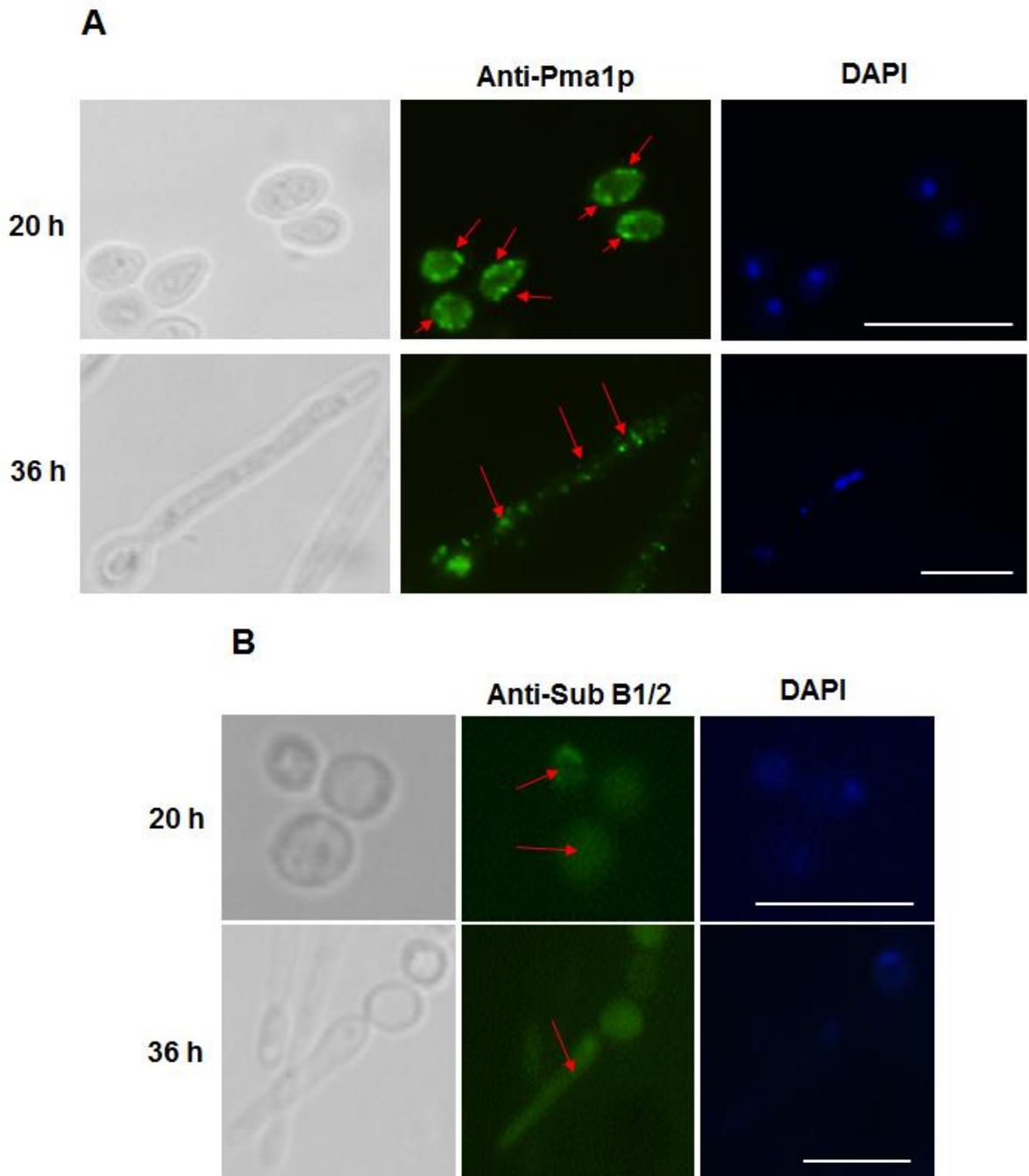


**Figura 37. ConA inibe a atividade da V-H<sup>+</sup>-ATPase durante a morfogênese de *Y. lipolytica*.** A amplitude máxima (A), a velocidade inicial do transporte de H<sup>+</sup> (B) e a atividade hidrolítica (C) da V-H<sup>+</sup>-ATPase foram obtidos de vesículas de membranas totais isoladas de células de *Y. lipolytica* cultivadas durante 20 ou 26 h na presença ou ausência de 1 μM ConA. Valores representativos de três experimentos independentes. Para cada ponto temporal, as colunas contendo a mesma letra maiúscula, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para cada tratamento, as colunas contendo as mesmas letras minúsculas em diferentes pontos temporais, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 38. ConA inibe a imuno-resposta da subunidade B1/2 da V-H<sup>+</sup>-ATPase durante a morfogênese de *Y. lipolytica*.** Resposta imunorreativa da subunidade B1/2 da V-H<sup>+</sup>-ATPase obtida de vesículas de membranas totais isoladas de células de *Y. lipolytica* cultivadas durante 20 ou 26 h na presença ou ausência de 1  $\mu$ M ConA. Valores representativos de três experimentos independentes. Para cada ponto temporal, as colunas contendo a mesma letra maiúscula, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para cada tratamento, as colunas contendo as mesmas letras minúsculas em diferentes pontos temporais, não apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Em vista da importância das P- e V-H<sup>+</sup>-ATPase na manutenção do crescimento polarizado das hifas fúngicas, analisamos a distribuição espacial de ambas as bombas protônicas durante a morfogênese por meio de ensaios de imunofluorescência. Para isso, utilizamos anticorpos específicos contra as H<sup>+</sup>-ATPases de membrana plasmática (anti-PMA1/2) e contra uma subunidade da H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar (anti-sub B1/2). Nas células leveduriformes, detectamos que a P-H<sup>+</sup>-ATPase está distribuída na porção mais marginal das células (Figura 39A, 20 h setas), enquanto as hifas apresentaram uma distribuição em forma de pequenas pontuações ao longo de todo o filamento (Figura 39A, 36 h setas). Por outro lado, a distribuição da V-H<sup>+</sup>-ATPase foi observada de maneira mais difusa no interior das células leveduriformes (Figura 39B, 20 h setas) e ao longo da hifa (Figura 39B, 20 h setas).



**Figura 39. Distribuição espacial das P- e V-H<sup>+</sup>-ATPases em células de *Y. lipolytica*.** (A) Imunomarcagem da P-H<sup>+</sup>-ATPase em células leveduriformes e hifais de *Y. lipolytica*. Setas indicam as pontuações observadas após a imunomarcagem da enzima (B) Imunomarcagem da V-H<sup>+</sup>-ATPase em células leveduriformes e hifais de *Y. lipolytica*. As setas indicam as marcações difusas observadas após a imunomarcagem da enzima. Barras representam 10 μm.

## 6 DISCUSSÃO

O crescimento de hifas fúngicas é um processo essencial no estabelecimento de diversas relações entre os microrganismos e os animais ou plantas hospedeiras. Por exemplo, a maioria das leveduras patogênicas tornam-se virulentas após a transição levedura-hifa, como é o caso da *C. albicans*, principal fungo oportunista patogênico humano (Brand, 2012; Mayer et al., 2013) e do fungo fitopatogênico *Ustilago maydis* (Flor-Parra et al., 2007).

A capacidade das poliaminas de modular a morfogênese fúngica tem sido estudada intensamente em nível molecular, mas o mecanismo preciso pelo qual ocorre a modulação ainda permanece obscuro. Aqui, investigamos esse mecanismo a partir de algumas evidências previamente estabelecidas sobre as similaridades entre células fúngicas e vegetais no processo de crescimento polarizado. Assim como as plantas, os fungos possuem a P-H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática, envolvida na bioenergética celular, na homeostase iônica e na regulação do pH ambiental, revelando similaridades entre ambas as células (Goffeau; Slayman, 1981; Falhof et al., 2016). A modulação do crescimento polarizado em células vegetais envolve a ativação das P-H<sup>+</sup>-ATPases e V-H<sup>+</sup>-ATPases por meio de uma via de sinalização auxina-dependente (Hager et al., 1991; Rayle; Cleland, 1992; Hager, 2003) e o crescimento das hifas também é caracterizado pela presença de correntes iônicas, campos elétricos e um gradiente de pH ao longo de toda a hifa, os quais promovem a captação de íons e a pressão de turgor vacuolar, necessários para a expansão celular (Harold, 1990; Lew, 2011). Dessa forma, hipotetizamos que, assim como ocorre em células vegetais, as bombas protônicas poderiam modular o crescimento polarizado de hifas fúngicas.

No presente estudo, investigamos os efeitos de tetra-amina exógena Spm na morfogênese da *Y. lipolytica* a fim de obter evidências sobre os mecanismos envolvido na modulação do fenômeno. Dentre as poliaminas, a Spm representa o último produto da via biossintética (Figura 1), caracterizada por ser a mais carregada e, conseqüentemente, a mais efetiva em promover interações com outras moléculas ou proteínas. De fato, em análises preliminares em células vegetais, a Spm demonstrou um efeito mais significativo sobre as atividades da P-H<sup>+</sup>-ATPases e no fluxo protônico, quando comparada com as outras poliaminas (Garufi et al., 2007; Pandolfi et al., 2010; Pottosin et al., 2014).

Observamos que Spm induziu a transição morfogênica nas células de *Y. lipolytica* em meio líquido ou sólido (Figuras 6 e 9). Além disso, a molécula estimulou

significativamente o bombeamento de  $H^+$  e atividade hidrolítica das bombas protônicas, tanto das  $H^+$ -ATPases do tipo P como as V (Figuras 13, 14 e 35). A presença de Spm exógena induziu a formação de maiores quantidades e de longas franjas coloniais (hifas filamentosas) ao redor das colônias de *Y. lipolytica*, o que se correlacionou com a maior capacidade de invasão do substrato sólido (Figura 7 e 9). A concentração de 1 mM de Spm foi a mais efetiva, embora concentrações menores também tenham estimulado a morfogênese e as atividades da P- $H^+$ -ATPase (Figura 12). No entanto, concentrações superiores a 1,5 mM de Spm resultaram no surgimento de células anormais, conforme relatado previamente, sobre o efeito tóxico de altas concentrações de Spm nos microrganismos (Tabor; Tabor, 1985).

O efeito do ciclohexilamino (CHA), um inibidor competitivo da enzima espermidina sintase, confirmou a importância da Spm no crescimento polarizado das hifas de *Y. lipolytica* em meio líquido e sólido. A adição do CHA bloqueia a síntese intracelular de Spd e força a célula a suprir essa deficiência a partir do meio extracelular (Kumar et al., 2011). Em meio líquido, CHA preveniu a morfogênese em aproximadamente 80% das células, enquanto em meio sólido, as colônias apresentaram menor enrugamento e franjas coloniais mais curtas (Figura 6 e 9). A importância das poliaminas nas células de *Y. lipolytica* também foi revelado previamente em experimento de microarranjos, no qual foi observado um aumento de 2,6 vezes na expressão da enzima espermidina sintase durante a transição morfogênica (Morales-Vargas et al., 2012). Além disso, o crescimento de hifas de *Y. lipolytica* também foi acompanhado pelo aumento intracelular de poliaminas, incluindo Spm (Guevara-Olvera et al., 1993). No entanto, os mecanismos morfogênicos envolvidos em tais efeitos não foram elucidados nestes estudos.

A enzima P- $H^+$ -ATPase da membrana plasmática, encontrada exclusivamente em células vegetais e fúngicas (Goffeau; Slayman, 1981; Palmgren; Nissen, 2011; Falhof et al., 2016), apresentou uma significativa ativação durante a morfogênese da *Y. lipolytica*. Além disso, a presença de Spm estimulou significativamente as atividades da P- $H^+$ -ATPase, pois o bombeamento de  $H^+$ , a atividade hidrolítica e o conteúdo de Pma1p aumentaram em células crescidas na presença de Spm (Figura 13 e 14). As maiores ativações na P- $H^+$ -ATPase foram observadas nos momentos iniciais da morfogênese, após 20 h de cultivo, possivelmente como resposta ao efeito estimulante da molécula na transição levedura-hifa. Posteriormente, o efeito permaneceu, mas a diferença com as células controle diminuiu, possivelmente pelo aumento na quantidade de células filamentosas na cultura controle (Figura 15). Esses

resultados estão consistentes com a descrição de que as hifas são eletricamente polarizadas (Harold, 1990), e que o crescimento hifal ocorre após um aumento transiente do pH intracelular (Steward et al., 1988; Robson et al., 1996). A atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase é capaz de estabelecer um campo elétrico e um potencial de membrana necessários para orientar o citoesqueleto e a polarização celular, como descrito em *Sch. pombe* e outras células eucarióticas (Minc; Chang, 2010; Campetelli et al., 2012; Chang; Minc, 2014). Dessa forma, passamos a explorar um modelo de mecanismo análogo ao descrito em plantas, que estaria em grande parte conservado no crescimento das hifas fúngicas induzido por Spm e intimamente relacionado com a ativação da P-H<sup>+</sup>-ATPase.

O efeito de Spm exógena sobre o fluxo de H<sup>+</sup> foi descrito em células vegetais (Pandolfi et al., 2010; Dutra et al., 2012; Pottosin et al., 2014), incluindo seu efeito dual no potencial de membranas: a hiperpolarização em baixas concentrações e a despolarização em altas concentrações, ocorre possivelmente pela atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase (Pottosin et al., 2014). Ainda em células vegetais, a Spm foi a única poliamina capaz de aumentar significativamente a atividade hidrolítica da P-H<sup>+</sup>-ATPase e a imunoreatividade dessa enzima em raízes de milho expostas durante 1 h a Spm (Garufi et al., 2007). Os resultados obtidos em células fúngicas revelam a possível influência de Spm no acoplamento da P-H<sup>+</sup>-ATPase, devido ao forte aumento no bombeamento de H<sup>+</sup> quando comparado com a atividade hidrolítica e o conteúdo proteico. Além disso, os efeitos de Spm sobre a P-H<sup>+</sup>-ATPase foram sincronizados com a morfogênese da *Y. lipolytica*, revelando a importância dessa enzima no crescimento polarizado de células fúngicas.

Um possível mecanismo de modulação da P-H<sup>+</sup>-ATPase em células vegetais por Spm envolve a interação da proteína 14-3-3 com o R-domínio fosforilado na região carboxi-terminal da enzima (Garufi et al., 2007). Contudo, o R-domínio na bomba protônica de células fúngicas é mais curto que em células vegetais, com os sítios de fosforilação diferentes e uma regulação que não envolve a proteína 14-3-3 (Kühlbrandt, 2004). Apesar da proteína 14-3-3 em leveduras desempenha várias funções, pois são capazes de se ligar a uma ampla variedade de proteínas, atuando como reguladoras de atividades enzimáticas, âncoras de localização, adaptadores ou carreadores em vários processos celulares (van Heusden; Steensma, 2006). No entanto, não há uma descrição dessa proteína com a regulação da P-H<sup>+</sup>-ATPase fúngica. Apesar disso, as células de *Y. lipolytica* codificam duas proteínas 14-3-3 (Y1BMH1 e Y1BMH2) e a transição levedura-hifa está envolvida no aumento da

expressão da Y1BMH1 (Hurtado; Rachubinski, 2002). Dessa forma, Spm poderia promover a estabilidade de proteínas e das membranas de fosfolípidos, modulando a expressão de genes e atividades enzimáticas que auxiliam a P-H<sup>+</sup>-ATPase em células fúngicas, assim como ocorre em células vegetais. Além disso, esses dados abrem uma nova janela para se explorar um possível papel da isoforma Y1BMH1 da proteína 14-3-3 na indução do crescimento filamentosos em células fúngicas, na qual uma interação inédita de 14-3-3 com a H<sup>+</sup>-ATPase exclusivamente na presença de Spm, precisa ser investigada.

A expansão celular também está por trás do crescimento polarizado de células vegetais descrito pela teoria do crescimento ácido, a qual postula que o hormônio de crescimento auxina promove a acidificação da parede celular por meio da ativação e aumento no conteúdo de P-H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática. O pH ácido formado pela extrusão de H<sup>+</sup> seria necessário para estimular a atividade de enzimas hidrolíticas que afrouxam a parede celular e facilitam o alongamento (Rayle; Cleland, 1970, 1992; Hager, 2003). A simples expressão de uma P-H<sup>+</sup>-ATPase ativada constitutivamente foi suficiente para ratificar a importância dessa proteína no crescimento polarizado vegetal, pois acidificou o meio externo e promoveu a expansão celular em células de *Nicotiana tabacum* (Niczyj et al., 2016). Em conformidade, algumas enzimas hidrolíticas da parede celular fúngica também demonstram uma faixa ideal de pH em torno de 5,0-5,5 (Notario, 1982; Hartland et al., 1996; Fontaine et al., 1997). Além disso, demonstramos pela primeira vez no presente estudo que as células de *Y. lipolytica* produzem e exsudam quantidades significantes de uma auxina específica, o AIA (Figuras 10 e 11).

Em células vegetais, vários mecanismos de ação da auxina na ativação da P-H<sup>+</sup>-ATPase foram propostos, tanto em nível transcricional como pós-transcricional. Dentre eles, a auxina apresentou a capacidade de aumentar a atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase por meio da regulação da expressão gênica da enzima em *Zea mays* (Frías et al., 1996). O hormônio também demonstrou a capacidade de inibir a endocitose das P-H<sup>+</sup>-ATPases da membrana plasmática (Robert et al., 2010). Além disso, Takahashi e colaboradores (2012) demonstraram que o AIA exógeno foi capaz de induzir rapidamente a fosforilação do resíduo Thr<sub>947</sub> da P-H<sup>+</sup>-ATPase de *Arabidopsis thaliana* (AHA) e aumentar a atividade da enzima sem alterar sua quantidade. Essa fosforilação ocorreu em 10 min de tratamento com AIA e não foi prevenida com tratamentos anti-auxina [ $\alpha$ -(*phenylethyl-2-one*)-IAA, antagonista específico do receptor nuclear de auxina TIR1/AFBs] ou por mutação dos genes receptores de

auxina (TIR1 e AFB2), levando os autores a sugerirem que AIA promove a fosforilação de AHA independentemente da expressão gênica.

Mais recentemente, Spartz e colaboradores (2014) propuseram um mecanismo de ativação da P-H<sup>+</sup>-ATPase vegetal mediado por auxina envolvendo as proteínas SAUR (*Small Auxin Up-RNA*) e a família do tipo 2C de proteínas fosfatases (PP2Cs). A super-expressão de SAUR resultou no aumento da atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase e da fosforilação do resíduo Thr<sub>947</sub>. Além disso, a proteína SAUR19 e outras isoformas foram capazes de interagir e inibir a atividade das fosfatases PP2C-D, que desfosforilam o resíduo Thr<sub>947</sub> da P-H<sup>+</sup>-ATPase, sugerindo que SAURs e as fosfatases PP2C-D atuam de maneira antagonista *in vivo*. Consistentemente, as plantas mutantes *pp2c-d* exibiram fenótipos similares com as linhagens que super-expressavam SAUR19. Dessa forma, os autores sugeriram um mecanismo pelo qual os genes SAUR induzidos por auxina ativam a P-H<sup>+</sup>-ATPase vegetal por promover a fosforilação do resíduo Thr<sub>947</sub> e que mudanças na transcrição de SAUR podem ser rápidas o suficiente para explicar os efeitos iniciais da auxina na ativação da P-H<sup>+</sup>-ATPase (Spartz et al., 2014; Haruta et al., 2015).

Apesar de ser um fitohormônio, o AIA, a auxina mais estudada, também é sintetizado por microrganismos, inclusive outras espécies de leveduras. O AIA foi capaz de induzir a morfogênese em *S. cerevisiae* (Prusty et al., 2004) e *C. albicans* (Rao et al., 2010). Estudos prévios de nosso grupo já haviam demonstrado que baixas concentrações (10 pM) dessa auxina são suficientes na promoção da transição levedura-hifa em *Y. lipolytica* (Dutra, 2010; Lobão, 2012; Dutra, 2016). Dessa forma, investigamos uma possível relação entre Spm e AIA na morfogênese da *Y. lipolytica*. Os resultados demonstraram que Spm exógena aumentou significativamente o conteúdo extracelular de AIA, sugerindo um possível efeito de AIA na modulação da morfogênese causada por Spm (Figura 11).

Em células vegetais existe uma ação integrada entre poliaminas e auxinas no desenvolvimento das raízes primária e laterais (Hausman et al., 1995; Tonon et al., 2001; Saini et al., 2013). Além disso, alterações nos níveis celulares de Spm em células vegetais resultam em variações globais na expressão gênica, pois o decréscimo na quantidade de Spm em plantas mutantes (*spms-2*) regulou negativamente a expressão de transportadores de auxina, enquanto o aumento de Spm em plantas mutantes (35S::SPMS-9) aumentou significativamente os níveis de expressão de múltiplas proteínas responsivas a auxina (Gonzalez et al., 2011). Altos níveis intracelulares de Spd e Spm também aumentaram a expressão de alguns genes

regulados por auxinas em tomate (Kolotilin et al., 2011). Embora existam algumas evidências demonstrando a interação entre poliaminas e auxinas em células vegetais, mais estudos são necessários para caracterizar o papel das poliaminas na regulação dos efeitos de auxina (Saini et al., 2013; Anwar et al., 2015). Neste contexto, o presente trabalho estabelece as bases para o uso da levedura *Y. lipolytica* como um modelo viável na exploração dos detalhes moleculares conservados em diferentes células eucarióticas, principalmente no que tange a ação integrada de Spm e AIA no controle da morfogênese.

A interação de vias de sinalização entre AIA e Spm na modulação do crescimento hifal de *Y. lipolytica* foi investigado usando dois inibidores de auxina com diferentes modos de ação: ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) e o ácido  $\alpha$ -*p*-(clorofenoxi) isobutírico (PCIB). Em plantas, o TIBA impede o tráfego de vesículas contendo PIN1 e P-H<sup>+</sup>-ATPase, bloqueando o transporte do hormônio (Geldner et al., 2001; Soeno et al., 2010), enquanto o PCIB impede a via de sinalização auxina dependente, por regular a estabilidade da proteína Aux/IAA (Oono et al., 2003; Biswas et al., 2007). Nossos dados demonstram que ambos os inibidores bloqueiam o crescimento polarizado das células de *Y. lipolytica* assim como a atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase, mesmo quando as células são tratadas com Spm exógena (Figuras 8 e 16). Os resultados podem sugerir que poliaminas e AIA atuam por uma via similar na modulação do crescimento polarizado de hifas fúngicas. Além disso, o CHA, um inibidor competitivo da espermidina sintase, não preveniu a estimulação na morfogênese induzida por AIA exógeno, o que também sugere que a Spm pode estar *upstream* ao AIA numa via em que poliaminas e auxinas interagem no controle da transição levedura-hifa em *Y. lipolytica* (Figura 8).

As células tratadas com TIBA ou PCIB apresentaram uma inibição mais forte no bombeamento de H<sup>+</sup> do que na atividade hidrolítica (Figura 16). Esses resultados sugerem um desacoplamento entre a hidrólise de ATP e o bombeamento de H<sup>+</sup> dependente de ATP em resposta a esses inibidores. Efeitos similares do TIBA e PCIB na atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase também foram relatados no crescimento de raízes de milho exposta a AIA e ácidos húmicos (Zandonadi et al., 2010).

A análise do fluxo de H<sup>+</sup> *in vivo* também relevou o aumento no efluxo de H<sup>+</sup> nas células crescidas na presença de Spm ou AIA, confirmando a existência de um possível efeito dessas moléculas no controle do fluxo de H<sup>+</sup> na membrana plasmática durante o crescimento polarizado das hifas de *Y. lipolytica* (Figura 17). Esses resultados estão em conformidade com o estabelecimento de um campo elétrico e a

geração de um potencial de membrana na orientação do crescimento de hifas fúngicas (Harold, 1990; Chang; Minc, 2014). Em conjunto, tais evidências são consistentes com o mecanismo proposto na hipótese original do presente trabalho, pelo qual o crescimento polarizado modulado por Spm em *Y. lipolytica* ocorre por meio da estimulação da P-H<sup>+</sup>-ATPase para o controle do pH hifosférico via sinalização auxina-dependente. Destacamos aqui a existência de uma característica de desenvolvimento inexplorada em células fúngicas similares ao crescimento polarizado de células vegetais.

Assim como a formação de um gradiente eletroquímico ao longo da hifa, a regulação do pH ambiental também se mostrou um potente sinal morfogenético em células de *Y. lipolytica*. A capacidade dos microrganismos de perceber e adaptar-se às variações ambientais é essencial para sua sobrevivência. Assim a habilidade da *Y. lipolytica* realizar a transição morfológica a partir de uma alteração gradual do pH extracelular possui uma grande importância adaptativa para a célula. Demonstramos que as células de *Y. lipolytica* foram capazes de modular a mudança do pH ambiental pela alcalinização de um meio inicialmente ácido, com variações em mais de 3 unidades de pH (4,5 para 8) em menos de 36 h de crescimento. Esse fenômeno ocorreu tanto em meio líquido como em meio sólido (Figuras 18 e 21). A alcalinização do pH ambiental também foi observada em *C. albicans* e representa um importante sinal no crescimento de células filamentosas, um evento de diferenciação essencial para a virulência dessa espécie. A alcalinização ambiental em *C. albicans* foi associada com a exsudação de amônia a partir do catabolismo de aminoácidos, pois vários componentes requeridos para a alcalinização são envolvidos na regulação da absorção (Stp2p e Csh3p) e no catabolismo de aminoácidos (Dur1,2p e Ach1p) (Vylkova et al., 2011).

O fenômeno da alcalinização extracelular em *C. albicans* representa uma forma de resistência da célula contra a fagocitose do sistema imunológico do hospedeiro. No interior do macrófago, a *C. albicans* é capaz de neutralizar o pH do fagolisossomo, promover a morfogênese e, assim, sobreviver à fagocitose (Vylkova; Lorenz, 2014). A exsudação de amônia parece ocorrer a partir das proteínas da família Ato (“ammonia transport outward”), pois a quantidade dessas proteínas aumentou consideravelmente nas células de *S. cerevisiae* (Váchová et al., 2009) e *C. albicans* (Vylkova; Lorenz, 2014; Danhof; Lorenz, 2015) associada a alcalinização extracelular por amônia. Dessa forma, assim como *C. albicans*, a *Y. lipolytica* também possui a capacidade de regular/alterar o pH ambiental e autoinduzir a morfogênese.

Em consonância com essa capacidade, os indutores da morfogênese (Spm e AIA) potencializaram a alcalinização extracelular, enquanto os inibidores (PCIB, TIBA, CHA, ConA) preveniram ou retardaram o fenômeno (Figuras 20 e 31). Além disso, a presença de baixas concentrações (200  $\mu\text{M}$ ) do inibidor da P-H<sup>+</sup>-ATPase, o ortovanadato (Figura 19), foi suficiente para prevenir a alcalinização extracelular, sugerindo a importância dessa bomba protônica na regulação adequada do pH extracelular não só por influência direta da extrusão de íons H<sup>+</sup>, mas também pela energização do transporte de outros íons com capacidade de alcalinizar o meio, como é o caso do íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). O gradiente de H<sup>+</sup> gerado pela atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase é uma exigência no sequestro de espécies carregadas, como NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, além de atuar como substrato no co-transporte de inúmeros nutrientes essenciais para a célula. A própria família de proteínas Ato (Ato1p, Ato2p e Ato3p), envolvidos na produção de amônia, atuam como possíveis antiporter amônio/H<sup>+</sup> (Palková et al., 2002). Além disso, o gradiente eletroquímico fornece a energia necessária na ativação de outros transportadores, incluindo os de aminoácidos, também importantes na alcalinização extracelular, conforme demonstrado em *C. albicans* (Vylkova et al., 2011).

A alcalinização do meio de cultivo observada em *Y. lipolytica* também foi causada pelo aumento de amônia no meio extracelular, principalmente nas células em fase estacionária de crescimento (Figura 22). A produção do gás volátil amônia (NH<sub>3</sub>) foi descrita como um potente sinalizador celular em *S. cerevisiae*, pois as colônias celulares tornavam-se altamente estruturadas após a produção da molécula de amônia (Palková et al., 1997). As diferenças nas fontes de nitrogênio, especialmente amônia/amônio, também são consideradas reguladores da transição morfológica em *S. cerevisiae* (Vopálenská et al., 2010), *C. albicans* (Vylkova et al., 2011) e *Cryptococcus neoformans* (Lee et al., 2012). Essas três espécies apresentaram a capacidade de alcalizar o meio de cultura, assim como a *Y. lipolytica*, pela produção de amônia volátil, a qual pode funcionar como um sinalizador envolvido no desenvolvimento colonial, na reprogramação do metabolismo e na diferenciação celular (Palková et al., 2002; Váchová et al., 2009; Cáp et al., 2012; Palková; Váchová, 2016). A importância do íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) como sinalizador da morfogênese também foi demonstrado a partir do estudo de seus transportadores (Mep1p e Mep2p). O transportador Mep2p atuou como um regulador da filamentação na ausência de fontes de nitrogênio em *S. cerevisiae* (Lorenz; Heitman, 1998), *Ustilago maydis* (Smith et al., 2003) e *C. albicans* (Biswas; Morchhauser, 2005).

A alcalinização extracelular também é capaz de modular a morfogênese pela via de sinalização Rim101. Uma família de proteínas com domínio “*zinc finger*” conservada em *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *Y. lipolytica*, *Aspergillus nidulans* e outros membros dessa família (Biswas et al., 2007). Em pH ácido, a proteína Rim101 possui um domínio C-terminal mais longo, enquanto em pH alcalino, a porção carboxi-terminal é clivada. Essa proteólise é regulada pelo pH e ativa a proteína como fator de transcrição, induzindo a expressão de vários genes envolvidos na morfogênese (Li; Mitchell, 1997). No entanto, assim como em *C. albicans*, *Y. lipolytica* continua a realizar a morfogênese na ausência dessa proteína, sugerindo a existência de uma via de sinalização de pH independente da Rim101 (Davis et al., 2000; Szabo; Stofaníková, 2002).

A análise ultraestrutural do crescimento das hifas também revelou uma alteração na dinâmica vacuolar e no padrão morfológico dos vacúolos durante a morfogênese (Figuras 24-27). Os fungos representam um bom modelo no estudo da dinâmica de organelas pois os mecanismos básicos são conservados nas leveduras e nos eucariotos superiores (Weisman, 2006), além disso, o estudo do crescimento polarizado de fungos filamentosos permite obter informações úteis sobre o transporte de membranas por longas distâncias (Schuchardt et al., 2005).

Os vacúolos em células fúngicas são reconhecidos como organelas versáteis, envolvidas em muitos aspectos: *turnover* e hidrólise de glicoproteínas, estocagem de  $Ca^{2+}$ , fosfato e aminoácidos, regulação osmótica, homeostase celular, tráfego de membranas, desintoxicação citoplasmática, sinalização e nutrição celular (Klionsky et al., 1990; Veses et al., 2008). Recentemente, pesquisas também têm revelado a expansão das funções fisiológicas dos vacúolos para o crescimento, diferenciação, simbiose e patogênese fúngica (Veses et al., 2008, 2009; Palmer, 2011). Em *Y. lipolytica*, também foi relatado a degradação dos peroxissomos nos vacúolos por um mecanismo de macroperoxifagia (Nazarko et al., 2005). A análise da dinâmica vacuolar durante a morfogênese da *Y. lipolytica* demonstrou a presença de uma intensa vacuolização na região subapical durante o crescimento polarizado. O mesmo processo foi descrito previamente na morfogênese de *C. albicans* (Gow; Gooday, 1982).

O vacúolo representa a maior organela em células fúngicas, no entanto sua herança é assimétrica durante a citocinese. As células-filhas normalmente recebem pequenos fragmentos vacuolares que posteriormente aumentam de tamanho. As regiões apicais de hifas fúngicas representam células-filhas em contínuo processo de

extensão celular, enquanto a célula-mãe e os compartimentos subapicais permanecem estagnados no ciclo celular. Como os vacúolos são herdados de forma assimétrica durante a citocinese, a região subapical possui mais vacúolos, enquanto a região apical é constituída principalmente por citoplasma (Barelle et al., 2003; Veses et al., 2009), o que explica a intensa vacuolização na região subapical das hifas em *Y. lipolytica*.

Durante o crescimento das hifas de *Y. lipolytica* também foi possível observar o aumento no tamanho vacuolar e a formação de vacúolos tubulares durante a morfogênese (Figuras 24-27). Em *C. albicans*, a formação das hifas fúngicas envolve inicialmente o aumento dos vacúolos nas células-mãe, enquanto o restante do citoplasma fica mais confinado no interior das hifas, assim o volume ocupado pelo vacúolo no interior das células pode indiretamente afetar a regulação do ciclo celular e a frequência de brotamento de hifas (Barelle et al., 2006; Veses et al., 2008). A formação de vacúolos tubulares atua como condutores de nutrientes e potencialmente na sinalização celular em longa distância. A extensão vacuolar pode substituir a biossíntese de citoplasma quando os nutrientes estão escassos, enquanto a expansão apical e a motilidade celular ocorrem com mínima demanda biossintética (Veses et al., 2008). De fato, os vacúolos tubulares foram inicialmente encontrados no fungo micorrízico *Pisolithus tinctorius* (Shepherd et al., 1993) e foram associados com o transporte intra- e intercelular de nutrientes (Ashford, 1998; Shoji et al., 2006).

Durante o crescimento das hifas de *C. albicans*, os vacúolos esféricos das células-mãe se alongam numa estrutura tubular e se dirigem para a região de brotamento. Com o surgimento do broto, parte desse vacúolo é fragmentado formando uma estrutura composta por várias vesículas que entram, em seguida, fundidas na célula-filha (Veses; Gow, 2008). Em *Y. lipolytica*, observamos que as células-filha herdam pequenos vacúolos fragmentados durante a formação das pseudohifas ou hifas verdadeiras, no entanto, posteriormente ocorre provavelmente a fusão desses pequenos vacúolos que originam os longos vacúolos tubulares.

As finas pontuações fluorescentes observadas na região apical das hifas em crescimento é o resultado do acúmulo das sondas fluorescentes, principalmente MDY-64, em pequenas vesículas que estão abaixo do limite de resolução da luz do microscópio (Figuras 25 e 26). A presença dessas vesículas, um pouco maiores, também pode ser observada com as sondas derivadas de CMAC na ponta das hifas em crescimento (Figura 34). Essa forte marcação dessas pequenas vesículas nessas condições pode ser atribuída a rápida extensão e *turnover* e/ou o contínuo

carregamento e acúmulo de produtos para a expansão celular. Esse mesmo padrão também foi observado durante o crescimento polarizado das hifas do fungo *Phanerocheate velutina* (Zhuang et al., 2008).

Os efeitos pleiomórficos observado nos vacúolos de *Y. lipolytica* também foram relatados durante o crescimento das hifas de *Aspergillus oryzae* (Shoji et al., 2006), justificado pela dinâmica vacuolar na adaptação dos microrganismos às condições ambientais em termos de disponibilidade de nutrientes e pressão osmótica. A presença de Spm pode realmente alterar a pressão osmótica da célula, o que poderia explicar o surgimento de vários pequenos vacúolos ao longo das hifas fúngicas crescidas na presença de Spm. A diferença na morfologia vacuolar observada entre as células de cultura aerada e crescida em meio sólido (Figuras 24-28) também pode ser explicada pelas condições de crescimento, pois enquanto as células aeradas cresceram sob constante agitação (250 rpm), as células em meio sólido cresceram em condições estáticas.

As hifas fúngicas de *Y. lipolytica* também apresentaram uma dinâmica na movimentação dos vacúolos, principalmente durante as fusões dos pequenos vacúolos e vesículas. Em fungos filamentosos, como *N. crassa*, o próprio fluxo citoplasmático é capaz de movimentar as organelas e representa um componente funcional no crescimento de hifas fúngicas. Gotas de óleo injetadas no interior das hifas se moveram da mesma forma que os vacúolos em *N. crassa*, sem a necessidade de motores celulares (cinesinas e dineínas) e citoesqueleto (Lew, 2005). O fluxo citoplasmático direcionado da região distal para a apical nas hifas fúngicas é formado provavelmente pela criação de um gradiente osmótico gerado pelo transporte diferencial de íons ao longo da hifa que forma uma pressão hidrostática requerida no fluxo citoplasmático. Esse fluxo pode ser parado pela inibição respiratória com cianeto ou com a formação de um gradiente osmótico externo (Lew, 2005, 2011). A ativação do bombeamento de  $H^+$  pela P- $H^+$ -ATPase, observado durante o crescimento polarizado de *Y. lipolytica*, também pode ajustar a osmolaridade por meio da geração de uma força motriz necessária no influxo de solutos co-transportados. O transporte citoplasmático dos pequenos vacúolos também poderia ser associado a ativação da V- $H^+$ -ATPases.

A fusão de pequenos vacúolos observados durante a morfogênese da *Y. lipolytica* é um fenômeno precisamente regulado nas células eucarióticas e conservados durante a evolução. A fusão de membranas vacuolares em leveduras tem sido extensivamente estudada como modelo para entender esse processo. A

partir de alguns estudos ficou evidente a necessidade da acidificação vacuolar para que a fusão das membranas ocorresse (Ungermann et al., 1999; Coonrod et al., 2013). A V-H<sup>+</sup>-ATPase, como agente reguladora do pH vacuolar, bem como de seu gradiente eletroquímico representa um alvo molecular crucial nesse processo.

O modelo inicial sugere que a presença da subunidade V<sub>0</sub> da V-H<sup>+</sup>-ATPase (um complexo formado por várias subunidades integrais da membrana vacuolar) e não a acidificação vacuolar fosse requerida na fusão das membranas (Bayer et al., 2003; Baars et al., 2007; Takeda et al., 2008). O complexo V<sub>0</sub> é responsável pela translocação de H<sup>+</sup> para o interior do vacúolo e atuaria como um poro de fusão, pois a ausência das subunidades Vph1p (Bayer et al., 2003; Baars et al., 2007) ou Vma6p (Baars et al., 2007; Takeda et al., 2008) do complexo V<sub>0</sub> impediam o fusionamento das membranas. No entanto, um trabalho realizado *in vitro* demonstrou o requerimento mínimo de SNAREs vacuolares, Sec17p, Sec18p, o complexo HOPS, a hidrólise de ATP e a proteína Ypt7p ligada ao GTP na fusão das membranas, sem a necessidade de qualquer subunidade da V-H<sup>+</sup>-ATPase (Stroupe et al., 2009).

Coonrod e colaboradores (2013) evidenciaram a necessidade da acidificação vacuolar e não a presença da V-H<sup>+</sup>-ATPase na promoção do fusionamento das membranas. Os autores defenderam a necessidade da acidificação dos vacúolos por meio de células mutantes que possuíam a V-H<sup>+</sup>-ATPase, mas que não bombeavam o H<sup>+</sup>. No entanto, eles utilizaram a expressão heteróloga de uma bomba de H<sup>+</sup> vacuolar de plantas, a H<sup>+</sup>-pirofosfatase de *A. thaliana*, AVP1, para recuperar a acidificação e a fusão vacuolar (Coonrod et al., 2013). No entanto, recentemente, outro trabalho relatou que a acidificação vacuolar não se mostra um argumento válido para explicar a fusão de membranas. Os autores demonstraram que células de leveduras tratadas com ConA (2 μM) apresentaram uma rápida alcalinização da organela, entre 15 e 30 min, e iniciou o processo de fusionamento das membranas vacuolares após 10 min de incubação nessas condições (Desfougères et al., 2016).

As células crescidas na presença de Spm apresentaram vários pequenos vacúolos não-fusionados nas hifas de *Y. lipolytica* no momento em que não observamos a acidificação vacuolar com a quinacrina (Figura 32). O acúmulo da Spm nos vacúolos, uma poliamina extremamente básica, possivelmente seria responsável por retardar a acidificação dos vacúolos dessas hifas. Além disso, V-H<sup>+</sup>-ATPase apresentou uma importante função no crescimento polarizado das hifas, pois assim como as P-H<sup>+</sup>-ATPase, o bombeamento de H<sup>+</sup> e a atividade hidrolítica dessa enzima também aumentaram durante a morfogênese fúngica. Da mesma forma como a

enzima é capaz de acidificar o vacúolo para a fusão de membranas durante a formação dos vacúolos tubulares, ela também é capaz de regular o pH citoplasmático. O aumento da atividade da V-H<sup>+</sup>-ATPase também pode estar relacionado com as oscilações transientes registradas no pH do citoplasma durante a transição levedura-hifa (Steward et al., 1988; Robson et al., 1996).

O estímulo ocorrido na atividade de bombeamento de H<sup>+</sup> e na hidrólise de ATP pelas V-H<sup>+</sup>-ATPase nas células de *Y. lipolytica* crescidas na presença de Spm, pode estar evolutivamente relacionando com o papel dessa enzima no transporte intracelular de poliaminas. A V-H<sup>+</sup>-ATPase gera um potencial eletroquímico através da membrana vacuolar capaz de gerar a força motriz para ativar os carreadores secundários, que transportam íons, aminoácidos e poliaminas. O transporte de Spm foi completamente inibido por inibidores específicos da V-H<sup>+</sup>-ATPase, bafilomicina A e *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, nas vesículas vacuolares de *S. cerevisiae*, indicando a necessidade do potencial de membrana no transporte das poliaminas nessa levedura (Kakinuma et al., 1992).

Em *S. cerevisiae*, cinco Tpo permeases dependentes do gradiente de H<sup>+</sup> (Tpo1p, Tpo2p, Tpo3p, Tpo4p e Tpo5p) localizadas na membrana vacuolar estão envolvidas no transporte de poliaminas (Tomitori et al., 2001; Aouida et al., 2005). Dentre elas, a Tpo2p e a Tpo3p são transportadores específicos de Spm, enquanto Tpo1p e Tpo4p reconhecem Spd e Spm (Tomitori et al., 2001). A Tpo5p possui maior afinidade por Spd e Put (Aouida et al., 2005).

Células de mamíferos também apresentaram um transporte de poliaminas dependente de H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar, pois células pré-tratadas com bafilomicina não acidificaram as vesículas intracelulares e causou uma drástica redução no acúmulo de Spd, sugerindo a importância da atividade da V-H<sup>+</sup>-ATPase no transporte e acúmulo dessa poliamina (Soulet et al., 2004). Recentemente, uma nova proteína (SLC18B1) também foi descrita como um transportador antiporte H<sup>+</sup>/Spm ou Spd em células humanas (Hiasa et al., 2014).

A importância da V-H<sup>+</sup>-ATPase na morfogênese da *Y. lipolytica* também foi confirmada em ensaios com a ConA, um inibidor específico da enzima, capaz de se ligar especificamente a subunidade c do complexo V<sub>0</sub> (Vma3p), bloquear a rotação das subunidades c que compõem o domínio de membrana e prevenir tanto o transporte de H<sup>+</sup> quanto a hidrólise de ATP (Huss et al., 2002; Bowman et al., 2004). Baixas concentrações (1 μM) de ConA foi suficiente para prevenir a transição levedura-hifa em *Y. lipolytica*, mesmo na presença dos indutores da morfogênese

(Spm e AIA, Figuras 29 e 30). A morfogênese de *C. albicans* também foi inibida quando as células cresceram em 5  $\mu\text{M}$  de ConA, indicando que o transporte de  $\text{H}^+$  mediado pela V- $\text{H}^+$ -ATPase é essencial no processo de filamentação da célula (Rane et al., 2013).

Células crescidas na presença de ConA também preveniram a alcalinização ambiental, mesmo na presença de Spm ou AIA (Figura 31). Além disso, células cultivadas na presença de ConA apresentaram a acidificação citoplasmática e não vacuolar, detectada por meio da marcação com a sonda sensível a pH quinacrina (Figura 32). Esse efeito *per se* poderia justificar o bloqueio da morfogênese, pois o fenômeno requer a alcalinização do citoplasma, um processo regulado tanto por V- como pela P- $\text{H}^+$ -ATPase (Steward et al., 1988; Martínez-Moñoz; Kane, 2008). A acidificação citosólica sem a perda de localização da Pma1p também foi relatada em células de *S. cerevisiae* após um breve tratamento com ConA (Martínez-Moñoz; Kane, 2008), sugerindo um segundo mecanismo de regulação negativa na atividade da Pma1p. De fato, a morfogênese de *Y. lipolytica* ocorreu por um aumento significativo na atividade e na expressão de Pma1p, assim como relatado em *C. albicans* (Monk et al., 1993). Dessa forma, a acidificação citoplasmática indica um desacoplamento ou inativação da atividade de bombeamento de  $\text{H}^+$  por ambas as enzimas. A análise das vesículas de membranas totais isoladas de células de *Y. lipolytica* crescidas por 20 h na presença de 1  $\mu\text{M}$  de ConA revelou a inibição da atividade tanto de P- como de V- $\text{H}^+$ -ATPase.

Em *S. cerevisiae*, mutantes de V- $\text{H}^+$ -ATPase também apresentaram uma acidificação anormal no citoplasma devido a ausência do bombeamento de  $\text{H}^+$  pela Pma1p na superfície celular (Perzov et al., 2000; Martínez-Moñoz; Kane, 2008; Tarsio et al., 2011). A ausência da atividade da V- $\text{H}^+$ -ATPase em células mutantes de *S. cerevisiae* reduziu significativamente a quantidade de Pma1p da membrana plasmática e causou o acúmulo da proteína no retículo endoplasmático (Perzov et al., 2000). Células mutantes *vma* também demonstraram um trânsito lento de Pma1 no complexo de Golgi (Martínez-Moñoz; Kane 2008).

A inativação da V- $\text{H}^+$ -ATPase em *N. crassa* com o inibidor ConA preveniu o crescimento celular em pH 7,2, causou defeitos no acúmulo de aminoácidos básicos e  $\text{H}^+$  no vacúolo e dificultou o crescimento e a ramificação das hifas fúngicas. Por outro lado, as cepas mutantes resistentes a ConA foram associadas com mutações específicas do gene PMA1, pois os mutantes possuíam uma reduzida, mas significativa, atividade de hidrólise e bombeamento de  $\text{H}^+$  pela P- $\text{H}^+$ -ATPase. Essas

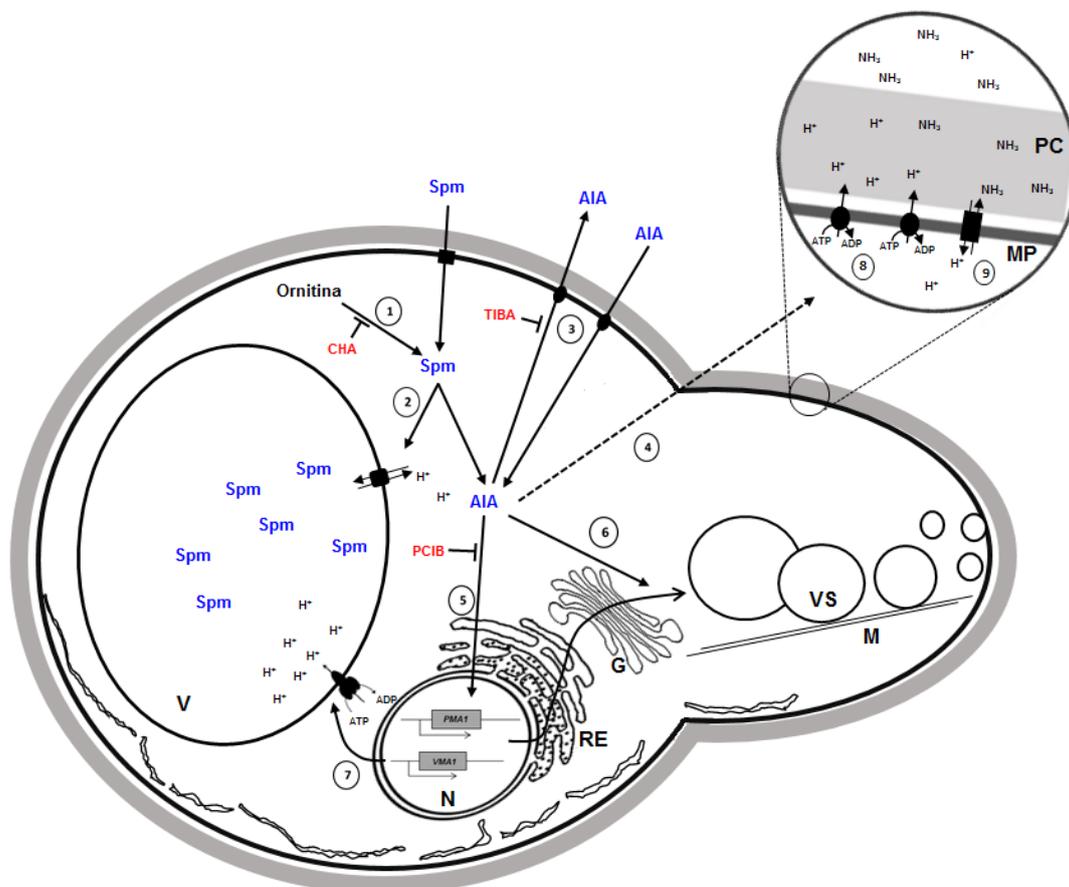
cepas mutantes cresceram em pH alcalino contendo ConA, mas não restauraram a função normal dos vacúolos ou corrigiram as anormalidades morfológicas, sugerindo que a P-H<sup>+</sup>-ATPase não compensa diretamente a inativação da V-H<sup>+</sup>-ATPase (Bowman et al., 1997).

As células de *Y. lipolytica* crescidas na presença de ConA demonstraram a partir da imuno-resposta uma redução significativa nos níveis de expressão da subunidade B1/2 da V-H<sup>+</sup>-ATPase após 20 e 26 h de crescimento quando comparada as células controle, sugerindo também um possível efeito na regulação pré-traducional da enzima (Figura 38). Além disso essas células apresentaram redução na alcalinização ambiental. Todos esses dados sugerem uma regulação sinérgica na atividade de ambas as bombas protônicas (Figuras 36 e 37), um mecanismo de regulação que deve ser melhor investigado futuramente.

A partir dos dados expostos é possível sugerir a modulação da morfogênese pela Spm via sinalização auxina-dependente e ativação dos sistemas primários de transporte de prótons, as P- e V-H<sup>+</sup>-ATPases (Figura 40). Os inibidores da sinalização (PCIB) e transporte (TIBA) de auxina preveniram a morfogênese modulada por Spm, enquanto o bloqueio da biossíntese de espermidina pelo CHA não impediu a morfogênese modulada por AIA. Além disso, a adição de Spm também elevou a concentração de AIA exsudada pelas células de *Y. lipolytica* (Figura 40). A transição levedura-hifa foi acompanhada pelo aumento na expressão, na atividade de bombeamento de H<sup>+</sup> e na hidrólise de ATP pelas H<sup>+</sup>-ATPases vacuolares e da membrana plasmática (V- e P-H<sup>+</sup>-ATPase, respectivamente). As atividades de ambas as bombas protônicas também se mostraram importantes na regulação do pH ambiental e na morfologia vacuolar durante a morfogênese fúngica. A exsudação de amônia pelas células apresentou dependência da atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase, pois a família de proteínas envolvida no transporte de amônia (Ato) possivelmente seja um antiporte H<sup>+</sup>-dependente (Figura 40). Além disso, V-H<sup>+</sup>-ATPase influencia o transporte de Spm via formação de um potencial de membrana que energiza transportadores de poliaminas (Kakinuma et al., 1992) e a acidificação vacuolar aparentou desempenhar uma função importante no fusão de membrana dos pequenos vacúolos ao longo da hifa para a formação de vacúolos tubulares durante o crescimento polarizado das hifas (Coonrod et al., 2013).

Até onde sabemos, esse trabalho é o primeiro a descrever um mecanismo de ação de poliaminas e auxina na morfogênese fúngica envolvendo a ativação das bombas protônicas. A compreensão desse fenômeno possui um amplo interesse

econômico, médico e biotecnológico, pois a transição levedura-hifa e o crescimento polarizado de células fúngicas também causa alterações metabólicas requeridas na adaptação e sobrevivência de muitos fungos em condições adversas (Sudbery, 2011; Brand, 2012; Bellou et al., 2014). Nesse contexto, os mecanismos que representam alvos moleculares chaves em intervenções que objetivam modular a transição levedura-hifa são extremamente importantes por influenciar na produção industrial, na capacidade de virulência e simbiose de muitas espécies fúngicas de interesse industrial, médico ou agrônômico.



**Figura 40. Esquema representativo do possível mecanismo de modulação da morfogênese por Spm em *Y. lipolytica*.** O crescimento polarizado das hifas fúngicas é precedido pelo aumento intracelular de poliaminas (1), seja pela produção endógena ou pela captação extracelular. A Spm pode ser estocada em vacúolos ou vesículas citoplasmáticas (2), mas para isso requer a ativação dos transportadores de poliaminas por meio do potencial de membrana formado pela V-H<sup>+</sup>-ATPase. A presença de Spm também aumentou o efluxo de AIA pelas células de *Y. lipolytica* (3). Baseado em nossos resultados, Spm induz a morfogênese de *Y. lipolytica* por uma via de sinalização AIA-dependente. O aumento da quantidade de AIA poderia modular a ativação das bombas protônicas, seja por meio da fosforilação da P-H<sup>+</sup>-ATPase (4), como pelo aumento na expressão das proteínas (5). O AIA também é capaz de aumentar o tráfego intracelular de vesículas, auxiliando no endereçamento das proteínas para a membrana plasmática ou vacuolar (6 e 7). A P-H<sup>+</sup>-ATPase produz um potencial de membrana e um gradiente de pH (8) necessários no estabelecimento e manutenção do crescimento polarizado das hifas fúngicas, pois mostrou-se essencial na exsudação de amônia (NH<sub>3</sub>) pelas células (9), possivelmente pelas preteínas da família Ato. V, vacúolo; N, núcleo; RE, retículo endoplasmático; VS, vesículas secretoras; G, Golgi; MP, membrana plasmática; PC, parede celular, M, microtúbulos.

## 7 CONCLUSÕES

- Os resultados revelaram que a morfogênese de *Y. lipolytica* induzida por Spm foi bloqueado pelos inibidores de sinalização (PCIB) e transporte (TIBA) de auxina, enquanto a morfogênese induzida por AIA não foi prevenida pela inibição da síntese de espermidina (CHA), sugerindo uma via de controle morfogênico onde Spm estaria *upstream* ao AIA;
- Colônias de *Y. lipolytica* crescidas na presença dos indutores da morfogênese (Spm ou AIA) apresentaram um fenótipo mais enrugado e longas franjas coloniais, enquanto as colônias crescidas na presença dos inibidores (PCIB, TIBA ou CHA) apresentaram uma textura mais lisa e franjas coloniais mais curtas, indicando a capacidade da poliamina e da auxina em estimular a transição dimórfica e o crescimento polarizado em células fúngicas;
- A expressão, o bombeamento de H<sup>+</sup> e a atividade hidrolítica da P- e V-H<sup>+</sup>-ATPase aumentaram significativamente durante a morfogênese fúngica. A presença de Spm no meio de crescimento estimulou mais a expressão e as atividades de ambas as bombas quando comparada às células controle, sugerindo uma relação entre a ativação das bombas com a morfogênese induzida por Spm;
- Assim como na morfogênese, a presença de Spm não foi suficiente para reverter completamente a inibição na atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase causada pelos inibidores de auxina (PCIB ou TIBA), corroborando a hipótese de uma via de controle morfogênico onde Spm estaria *upstream* ao AIA, com a participação coordenada da ativação das bombas de H<sup>+</sup>;
- A detecção do fluxo protônico em células vivas também revelou o aumento no efluxo de H<sup>+</sup> em células crescidas na presença de Spm ou AIA durante a morfogênese de *Y. lipolytica*;
- As células de *Y. lipolytica* foram capazes de produzir e exsudar AIA. Células crescidas na presença de Spm exsudaram maior quantidade de AIA quando comparadas as células controle;
- Durante a morfogênese fúngica foi detectado a alcalinização no pH ambiental. A presença dos indutores da morfogênese (Spm e AIA) intensificaram a alcalinização, enquanto os inibidores (PCIB, TIBA, CHA, ConA e VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) retardaram o processo;

- As células de *Y. lipolytica* foram capazes de produzir e exsudar amônia (NH<sub>3</sub>) principalmente em cultivos na fase estacionária. A exsudação de amônia pôde ser relacionada com alcalinização observada durante a morfogênese fúngica;
- Os vacúolos celulares apresentaram uma dinâmica específica durante a morfogênese fúngica, inicialmente com a fragmentação vacuolar na formação de pseudohifas e hifas jovens. Por outro lado, em hifas mais velhas ocorreu a fusão de vários pró-vacúolos para a formação de um vacúolo tubular ao longo de toda a hifa. Hifas crescidas na presença de Spm demonstraram um atraso no fusão das membranas vacuolares;
- Baixas concentrações (1 μM) de ConA foram suficientes para impedir a morfogênese de *Y. lipolytica*;
- A acidificação vacuolar pela V-H<sup>+</sup>-ATPase foi observada após o início da transição dimórfica fúngica. O fenômeno foi caracterizado pela fusão das membranas vacuolares;
- Células de *Y. lipolytica* crescidas na presença de ConA demonstraram significativa inibição nas atividades de bombeamento de H<sup>+</sup> e hidrólise de ATP em ambas as bombas protônicas, além de diminuir a expressão da subunidade B1/2 da V-H<sup>+</sup>-ATPase, sugerindo uma interdependência entre as atividades das bombas vacuolares com as da membrana plasmática.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, P.; Casadevall, A. (2012) Quorum sensing in fungi - a review. *Medical Mycology*, 50:337-345.
- Anwar, R.; Mattoo, A.K.; Handa, A.K. (2015) Polyamine interactions with plant hormones: crosstalk at several levels. *In: Polyamines - A universal molecular nexus for growth, survival, and specialized metabolism*. Kusano, T.; Suzuki, H. (eds). Springer Japan: Tokyo, 267-302.
- Aouida, M.; Leduc, A.; Poulin, R.; Ramotar, D. (2005) AGP2 encodes the major permease for high affinity polyamine import in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280:24267-24276.
- Ashford, A.E. (1998) Dynamic pleiomorphic vacuole systems: are they endosomes and transport compartments in fungal hyphae? *Advances in Botanical Research*, 28:119-159.
- Baars, T.L.; Petri, S.; Peters, C.; Mayer, A. (2007) Role of the V-ATPase in regulation of the vacuolar fission-fusion equilibrium. *Molecular Biology of the Cell*, 18:3873-3882.
- Barelle, C.J.; Bohula, E.A.; Kron, S.J.; Wessels, D.; Soll, D.R.; Schäfer, A.; Brown, A.J.; Gow, N.A. (2003) Asynchronous cell cycle and asymmetric vacuolar inheritance in true hyphae of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 2:398–410.
- Barelle, C.J.; Richard, M.L.; Gaillardin, C.; Gow, N.A.R.; Brown, A.J.P. (2006) *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. *Eukaryotic Cell*, 5:359–367.
- Bayer, M.J.; Reese, C.; Buhler, S.; Peters, C.; Mayer, A. (2003) Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca<sup>2+</sup>-releasing channel. *The Journal of Cell Biology*, 162:211–222.
- Bellou, S.; Makri, A.; Triantaphyllidou, I.E.; Papanikolaou, S.; Aggelis, G. (2014) Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiology*, 160:807-817.
- Beopoulos, A.; Chardot, T.; Nicaud, J.M. (2009) *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, 91:692-696.
- Beyenbach, K.W.; Wiczorek, H. (2006) The V-H<sup>+</sup>-ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *Journal of Experimental Biology*, 209:577-589.

- Biswas, K.; Morschhäuser, J. (2005) The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 56:649-669.
- Biswas, S.; van Dijck, P.; Datta, A. (2007) Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71:348-376.
- Blanchin-Roland, S. (2013) Ambient pH signaling in *Yarrowia lipolytica*. In: *Yarrowia lipolytica: genetics, genomics, and physiology*. Barth, G (eds). Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. 121-144.
- Bowman, E. J.; Bowman, B. J. (1982) Identification and properties of an ATPase in vacuolar membranes of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 151:1326-1337.
- Bowman, E.J.; Graham, L.A.; Stevens, T.H.; Bowman, B.J. (2004) The bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPase from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:33131-33138.
- Bowman, E.J.; Kendle, R.; Bowman, B.J. (2000) Disruption of *vma-1*, the gene encoding the catalytic subunit of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase, causes severe morphological changes in *Neurospora crassa*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275:167-176.
- Bowman, E.J.; O'Neill, F.J.; Bowman, B.J. (1997) Mutations of *pma-1*, the gene encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of *Neurospora crassa*, suppress inhibition of growth by concanamycin A, a specific inhibitor of vacuolar ATPases. *The Journal of Biological Chemistry*, 272:14776-14786.
- Brand, A. (2012) Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. *International Journal of Microbiology*, 2012:517-529.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Brefort, T.; Doehlemann, G.; Mendoza-Mendoza, A.; Reissmann, S.; Djamei, A.; Kahmann, R. (2009). *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, 47:423-445.
- Brüx, A.; Liu, T.Y.; Krebs, M.; Stierhof, Y.D.; Lohmann, J.U.; Miersch, O.; Wasternack, C.; Schumacher, K. (2008) Reduced V-ATPase activity in the trans-Golgi network

- causes oxylipin-dependent hypocotyl growth inhibition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20:1088-1100.
- Bueno, S.C.E.; Baptista Filho, M.; Almeida Jr, P.S.G.; Polidoro, J.C.; Olivares, F.L.; Sthel, M.S.; Vargas, H.; Mota, L.; Silva, M.G. (2015) Cuban zeolite as ammonium carrier in urea-based fertilizer pellets: photoacoustic-based sensor for monitoring N-ammonia losses by volatilization in aqueous solutions. *Sensors and Actuators B*, 212:35-40.
- Competelli, A.; Bonazzi, D.; Minc, N. (2012) Electrochemical regulation of cell polarity and the cytoskeleton. *Cytoskeleton*, 69:601-612.
- Cáp, M.; Váchová, L.; Palková, Z. (2012) Reactive oxygen species in the signaling and adaptation of multicellular microbial communities. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012: 976753.
- Cervantes-Chávez, J.A.; Ruiz-Herrera, J. (2006) STE11 disruption reveals the central role of a MAPK pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, 6:801-815.
- Cervantes-Chavez, J.A.; Kronberg, F.; Passeron, S.; Ruiz-Herrera, J. (2009) Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology*, 46:390-399.
- Chang, F.; Minc, N. (2014) Electrochemical control of cell and tissue polarity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30:317-336.
- Chaturvedi, R.; Assim, M.; Barry, D.P.; Frye, J.W.; Casero, R.A.Jr; Wilson, K.T. (2014) Spermine oxidase is a regulator of macrophage host response to *Helicobacter pylori*: enhancement of antimicrobial nitric oxide generation by depletion of spermine. *Amino Acids*, 46:531-542.
- Cogo, A.J.D. Modulação da transição dimórfica de *Yarrowia lipolytica* pelas poliaminas via transporte primário de prótons. 106f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Programa de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2013.
- Collette, J.R.; Zhou, H.; Lorenz, M.C. (2014) *Candida albicans* suppresses nitric oxide generation from macrophages via a secreted molecule. *Plos One*, 22:e96203.
- Coonrod, E.M.; Graham, L.A.; Carpp, L.N.; Carr, T.M.; Stirrat, L.; Bowers, K.; Bryant, N.J.; Stevens, T.H. (2013) Homotypic vacuole fusion in yeast requires organelle acidification and not the V-ATPase membrane domain. *Developmental Cell*, 27:462-468.

- Cullen, P.J. (2015) The plate-washing assay: a simple test for filamentous growth in budding yeast. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015:168-171.
- Danhof, H.A.; Lorenz, M.C. (2015) The *Candida albicans* ATO gene family promotes neutralization of the macrophage phagolysosome. *Infection and Immunity*, 83:4416-4426.
- Davis, D.; Wilson, R.B.; Mitchell, A.P. (2000) Rim101-Dependent and -independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*, 20:971-978.
- Desfougères, Y.; Vavassori, S.; Rompf, M.; Gerasimaite, R.; Mayer, A. (2016) Organelle acidification negatively regulates vacuole membrane fusion in vivo. *Scientific Reports*, 6:29045.
- Domínguez, A.; Fermiñán, E.; Gaillardin, C. (2000) *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. *Contributions to Microbiology*, 5:151-172.
- Dutra, N.T.; Silveira, V.; Azevedo, I.G.; Gomes-Neto, L.R.; Façanha, A.R.; Steiner, N.; Guerra, M.P.; Floh, E.I.; Santa-Catarina, C. (2012) Polyamines affect the cellular growth and structure of pro-embryogenic masses in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures through the modulation of proton pump activities and endogenous levels of polyamines. *Physiologia Plantarum*, 148:121-132.
- Dutra, K.R. Transição dimórfica em leveduras: ação de auxina e óxido nítrico. 100f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Programa de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2010.
- Dutra, K.R. Modulação da transição dimórfica de *Yarrowia lipolytica*. 73f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Programa de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2016.
- Falhof, J.; Pedersen, J.T.; Fuglsang, A.T.; Palmgren, M.G. (2016) Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Molecular Plant* 9:323-337.
- Fickers, P.; Marty, A.; Nicaud, J.M. (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 29:632-644.
- Fiske, C.H.; Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*, 66:375-400.

- Flor-Parra, I.; Castillo-Lluva, S.; Pérez-Martín, J. (2007) Polar growth in the infectious hyphae of the phytopathogen *Ustilago maydis* depends on a virulence-specific cyclin. *The Plant Cell*, 19:3280-3296.
- Forgac, M. (2007) Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8:917-929.
- Fontaine, T.; Hartland, R.P.; Diaquin, M.; Simenel, C.; Latge, J.P. (1997) Differential patterns of activity displayed by two exo- $\beta$ -1,3-glucanases associated with the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Journal of Bacteriology*, 179:3154-3163.
- Frías, I.; Caldeira, M.T.; Pérez-Castiñeira, J.R.; Navarro-Aviñó, J.P.; Culiñez-Maciá, F.A.; Kuppinger, O.; Stransky, H.; Pagés, M.; Hager, A.; Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H(+)-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *The Plant Cell*, 8:1533-1544.
- García-Pedrajas, M.D.; Baeza-Montañez, L.; Gold, S.E. (2010) Regulation of *Ustilago maydis* dimorphism, sporulation, and pathogenic development by a transcription factor with a highly conserved APSES domain. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23:211-222.
- Garufi, A.; Visconti, S.; Camoni, L.; Aducci, P. (2007) Polyamine as physiological regulators of 14-3-3 interaction with the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Cell Physiology*, 48:434-440.
- Geldner, N.; Friml, J.K.; York-Dieter, S.; Jürgens, G.; Palme K. (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413:425-428.
- Goffeau, A.; Slayman, C. (1981) The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 639:197-223.
- Gonzalez, M.E.; Marco, F.; Minguet, E.G.; Carrasco-Sorli, P.; Blázquez, M.A.; Carbonell, J.; Ruiz, O.A.; Pieckenstain, L. (2011) Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetra-amine spermine in *Arabidopsis* defense against *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology*, 156:2266-2277.
- Gradmann, D.; Hansen, U.-P.; Long, W.S.; Slayman, C.L.; Warnke, J. (1978) Current-voltage relationships for the plasma membrane and its principal electrogenic pump in *Neurospora crassa*. *The Journal of Membrane Biology*, 59:333-367.
- Guevara-Olvera, L.; Calvo-Mendez, C.; Ruiz-Herrera, J. (1993) The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of General Microbiology*, 193:485-493.

- Gow, N.A.R.; Gooday, G.W. (1982) Vacuolation, branch production and linear growth of germ tubes of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*, 128:2195-2198.
- Gow, N.A.R.; van de Veerdonk, F.L.; Brown, A.J.; Netea, M.G. (2012) *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, 10:112-122.
- Hager, A. (2003) Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and news aspects. *Journal of Plant Research*, 116:483-505.
- Hager, A.; Debus, G.; Edel, H.G.; Stransky, H.; Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta* 185:527-537.
- Han, T.L.; Cannon, R.D.; Villas-Boas, S.G. (2011) The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and *quorum sensing*. *Fungal Genetics and Biology*, 48:747-763.
- Harold, F.M. (1990) To shape a cell: an inquiry into the causes of morphogenesis. *Microbiological Reviews*, 54:381-431.
- Harris, S.D. (2011) Hyphal morphogenesis: an evolutionary perspective. *Fungal Biology*, 115:475-484.
- Hartland, R.P.; Fontaine, T.; Debeaupuis, J.P.; Simenel, C.; Delepierre, M.; Latge, J.P. (1996) A novel  $\beta$ -(1-3)-glucanoyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271:26843-26849.
- Haruta, M.; Gray, W.M.; Sussman, M.R. (2015) Regulation of the plasma membrane proton (H<sup>+</sup>-ATPase) by phosphorylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 28:68-75.
- Hausman, J.F.; Kevers, C.; Gaspar, T. (1995) Auxin-polyamine interaction in the control of the rooting inductive phase of poplar shoots *in vitro*. *Plant Science*, 110:63-71.
- Heath, I.B. (1990) Tip growth in plant and fungal cells. Academic press: San Diego, California. pp.351.
- Herrero, A.B.; Lopez, M.C.; Fernandez-Lago, L.; Dominguez, A. (1999) *Candida albicans* and *Yarrowia lipolytica* as alternative models for analysing budding patterns and germ tube formation in dimorphic fungi. *Microbiology*, 145:2727-2737.

- Hiasa, M.; Miyaji, T.; Haruna, Y.; Takeuchi, T.; Harada, Y.; Moriyama, S.; Yamamoto, A.; Omote, H.; Moriyama, Y. (2014) Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter. *Scientific Reports*, 4:6836.
- Holliday, L.S. (2014) Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: an essential multitasking enzyme in physiology and pathophysiology. *New Journal of Science*, 2014:ID675430.
- Hughes, A.L.; Gottschling, D.E. (2012) An early age in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature*, 13:261-265.
- Hurtado, C.A.R.; Rachubinski, R.A. (2002) YIBM1 encodes a 14-3-3 protein that promotes filamentous growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology*, 148:3725-3735.
- Igarashi, K.; Kashiwagi, K. (1999) Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochemical Journal*, 344:633-642.
- Huss, M.; Ingenhorst, G.; König, S.; Gassel, M.; Dröse, S.; Zeeck, A.; Altendorf, K.; Wiczorek, H. (2002) Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPase, binds to the V(0) subunit c. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:40544-40548.
- Igarashi, K.; Kashiwagi, K. (2010) Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:506-512.
- Jacobsen, I.D.; Lüttich, A.; Kurzai, O.; Hube, B.; Brock, M. (2014) *In vivo* imaging of disseminated murine *Candida albicans* infection reveals unsuspected host sites of fungal persistence during antifungal therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69:2785-2796.
- Kakinuma Y.; Masuda, N.; Igarashi, K. (1992) Proton potential-dependent polyamine transport by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1170:126-130.
- Kakinuma, Y.; Ohsumi, Y.; Anraku, Y. (1981) Properties of H<sup>+</sup>-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 256:10859-10863.
- Kane, P.M. (1995) Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270:17025-17032.
- Kane, P.M. (2006) The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70:177-191.
- Kashiwagi, K.; Igarashi, K. (2011) Identification and assays of polyamine transport systems in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology*, 720:295-308.

- Kaur-Sawhney, R.; Tiburcio, A.F.; Altabella, T.; Galston, A.W. (2003) Polyamines in plants: an overview. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2:1-12.
- Kawasaki-Nishi, S.; Nishi, T.; Forgac, M. (2001) Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa a-subunit differ in coupling efficiency and *in vivo* dissociation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:17941-8.
- Klionsky, D.J.; Herman, P.K.; Emr, S.D. (1990) The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiological Reviews*, 54:266–292.
- Kolotilin, I.; Koltai, H.; Bar-Or, C.; Chen, L.; Nahon, S.; Shlomo, H.; Levin, I.; Reuveni, M. (2011) Expressing yeast *SAMdc* gene confers broad changes in gene expression and alters fatty acid composition in tomato fruit. *Physiologia Plantarum*, 142:211-223.
- Kresge, N.; Simoni, R.D.; Hill, R.L. (2007) The biosynthesis of polyamines: the work of Herbert Tabor and Celia White Tabor. *The Journal of Biological Chemistry*, 282:e26.
- Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5:282-295.
- Kumar, R.; Chadha, S.; Saraswat, D.; Bajwa, J.S.; Li, R.A.; Conti, H.R.; Edgerton, M. (2011) Histatin 5 uptake by *Candida albicans* utilizes polyamine transport Dur3 and Dur 32 proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 286:43748-43758.
- Kummasook, A.; Cooper, C.R.Jr.; Sakamoto, A.; Terui, Y.; Kashiwagi, K.; Vanittanakom, N. (2013) Spermidine is required for morphogenesis in the human pathogenic fungus, *Penicillium marneffeii*. *Fungal Genetics and Biology*, 58-59:25-32.
- Kuznetsov, V.V.; Shevyakova, N.I. (2007) Polyamines and stress tolerance of plants. *Plant Stress*, 1:50-71.
- Lee, S.C.; Phadke, S.; Sun, S.; Heitman, J. (2012) Pseudohyphal growth of *Cryptococcus neoformans* is a reversible dimorphic transition in response to ammonium that requires Amt1 and Amt2 ammonium permeases. *Eukaryotic Cell*, 11:1391-1398.
- Lew, R.R. (2011) How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 9:509-518.
- Lew, R.R. (2005) Mass flow and pressure-driven hyphal extension in *Neurospora crassa*. *Microbiology*, 151:2685-2692.
- Lew, R.R.; Levina, N.N.; Walker, S.K.; Garrill, A. (2004) Turgor regulation in hyphal organisms. *Fungal Genetics and Biology*, 41:1007-1015.

- Li, B.; Skinner, C.; Castello, P.R.; Kato, M.; Easlon, E.; Xie, L.; Li, T.; Lu, S.P.; Wang, C.; Tsanq, F.; Poyton, R.O.; Lin, S.J. (2011) Identification of potential calorie restriction-mimicking yeast mutants with increased mitochondrial respiratory chain and nitric oxide levels. *Journal of Aging Research*, 31:673185, 2011.
- Li, W.; Mitchell, A.P. (1997) Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics*, 145:63-73.
- Lin, X.; Alspaugh, J.A.; Liu, H.; Harris, S. (2015) Fungal morphogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5:a019679.
- Lo, H.J.; Köhler, J.R.; DiDomenico, B.; Loebenberg, D.; Cacciapuoti, A.; Fink, G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90:939-949.
- Lobão, F.A. Modulação da transição dimórfica de *Yarrowia lipolytica* via sistemas de transporte primário de prótons: regulação por auxina e alumínio. 124f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Programa de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2012.
- Lorenz, M.C.; Heitman, J. (1998) The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, 17:1236-1247.
- Martínez-Moñoz, G.A.; Kane P. (2008) Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 283:20309-20319.
- Martinez-Vazquez, A.; Gonzalez-Hernandez, A.; Domínguez, A.; Rachubinski, R.; Riquelme, M.; Cuellar-Mata, P.; Guzman, J.C.T. (2013) Identification of the transcription factor Znc1p, which regulates the yeast-to-hypha transition in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Plos One*, 8:e66790.
- Mayer, F.L.; Wilson, D.; Hube, B. (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4:119-128.
- Minc, N.; Chang, F. (2010) Electrical control of cell polarization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Biology*, 20:710-716.
- Monk, B.C.; Niimi, M.; Shepherd, M.G. (1993) The *Candida albicans* plasma membrane and H(+)-ATPase during yeast and germ tube formation. *Journal of Bacteriology*, 175:5566-5574.
- Morales-Vargas, A.T.; Domínguez, A.; Ruiz-Herrera, J. (2012) Identification of dimorphism-involved genes of *Yarrowia lipolytica* by means of microarray analysis. *Research in Microbiology*, 163:378-387.

- Morín, M.; Monteoliva, L.; Insenser, M.; Gil, C.; Domínguez, A. (2007) Proteomic analysis reveals metabolic changes during yeast to hypha transition in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Mass Spectrometry*, 42:1453-1462.
- Morsomme P.; Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H(+)-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*.1465:1-16.
- Nazarko, T.Y.; Nicaud, J.M.; Sibirny, A.A. (2005) Observation of the *Yarrowia lipolytica* peroxisome-vacuole dynamics by fluorescence microscopy with a single filter set. *Cell Biology International*, 29:65-70.
- Nicaud, J.M. (2012) *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29:409-418.
- Nicznyj, M.; Champagne, A.; Alam, I.; Nader, J.; Boutry, M. (2016) Expression of a constitutively activated plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Nicotiana tabacum* by BY-2 cells results in cell expansion. *Planta*, 244:1109-1124.
- Nobile, C.J.; Mitchell, A.P. (2005) Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Current Biology*, 15:1150-1155.
- Notario, V. (1982)  $\beta$ -Glucanases from *Candida albicans*: purification, characterization and the nature of their attachment to cell wall components. *Journal of General Microbiology*, 128:747-759.
- Okorokov, L.; Kulakovskaya, T.V.; Kulaev, I.S. (1982) Solubilization and purification of vacuolar ATPase of yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *FEBS Letters*, 145:160-162.
- Okorokov, L.A.; Lehle, L. (1998) Ca<sup>2+</sup>-ATPases of *Saccharomyces cerevisiae*: diversity and possible role in protein sorting. *FEMS Microbiology Letters*, 162:83-91.
- Okorokov, L.A.; Lichko, L.P. (1983a) The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. ATPase is electrogenic H<sup>+</sup>-translocase. *FEMS Letters*, 155:102-106.
- Okorokov, L.A.; Lichko, L.P.; Martines, E. (1983b) The ATP-dependent eletrogenic transport of protons into isolated vacuoles of the *Saccharomyces carlsbergensis* yeast. *Doklady Akademii Nauk SSSR Moscow*, 270:987-990.
- Oliveira, M.T.; Specian, A.F.L.; Andrade, C.G.T.J.; França, E.J.G.; Furlaneto-Maia, L.; Furlaneto, M.C. (2010) Interactions of *Candida parapsilosis* isolates with human hair and nail surfaces revealed by scanning eletron microscopy analysis. *Micron*, 41:604-608.

- Oono, Y.; Ooura, C.; Rahman, A.; Aspuria, E.T.; Hayashi, K.; Tanaka, A.; Uchimiya, H. (2003) *p*-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* root. *Plant Physiology*, 133:1135-1147.
- Palková, Z.; Devaux, F.; Icíková, M.; Mináriková, L.; Le Crom, S.; Jacq, C. (2002) Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Molecular Biology of the Cell*, 13:3901-3914.
- Palková, Z.; Janderová, B.; Gabriel, J.; Zikánová, B.; Pospíšek, M.; Forstová, J. (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature*, 390:532-536.
- Palková, Z.; Váchová, L. (2016) Yeast cell differentiation: lessons from pathogenic and non-pathogenic yeasts. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 57:110-119.
- Palková, Z.; Wilkinson, D.; Váchová, L. (2014) Aging and differentiation in yeast populations: elders with different properties and functions. *FEMS Yeast Research*, 14:96-108.
- Palmer, G.E. (2011) Vacuolar trafficking and *Candida albicans* pathogenesis. *Communicative & Integrative Biology*, 4:240-241.
- Palmgren, M.G.; Nissen, P. (2011) P-type ATPases. *Annual Review of Biophysics*, 40:243-266.
- Pandolfi, C.; Pottosin, I.; Cuin, T.; Mancuso, S.; Shabala, S. (2010) Specificity of polyamines effects on NaCl-induced ion flux kinetics and salt stress amelioration in plants. *Plant Cell Physiology*, 51:422-434.
- Patenaude, C.; Zhang, Y.; Cormack, B.; Köhler, J.; Rao, R. (2013) Essential role for vacuolar acidification in *Candida albicans* virulence. *The Journal of Biological Chemistry*, 288:26256-26264.
- Patterson, M.J.; McKenzie, C.G.; Smith, D.A.; Dantas, A.S.; Sherston, S.; Veal, E.A.; Morgan, B.A.; MacCallum, D.M.; Erwig, L.P.; Quinn, J. (2013) Ybp1 and Gpx3 signaling in *Candida albicans* govern hydrogen peroxide-induced oxidation of the Cap1 transcription factor and macrophage escape. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19:2244-2260.
- Pedersen, P. L.; Carafoli, E. (1987) Ion motive ATPases. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends in Biochemical Sciences*, 12:146-150.
- Pemberton, L.F. (2014) Preparation of yeast cells for live-cell imaging and indirect immunofluorescence. *In: Yeast genetics: methods and protocols*. Smith, J.S.; Burke, D.J. (eds). Springer: New York, 79-90.
- Pérez-Martín, J.; Di Pietro, A. (2012) *Morphogenesis and Pathogenicity in Fungi*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, pp.286.

- Pérez-Campo, F.M.; Domínguez, A. (2001) Factors affecting the morphogenetics switch in *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology*, 43:429-433.
- Perzov, N.; Nelson, H.; Nelson, N. (2000) Altered distribution of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase as a feature of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase null mutants. *The Journal of Biological Chemistry*, 275:40088-40095.
- Polke, M.; Sprenger, M.; Scherlach, K.; Albán-Proaño, M.C.; Martin, R.; Hertweck, C.; Hube, B.; Jacobsen, I.D. (2016) A functional link between hyphal maintenance and *quorum sensing* in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, doi: 10.1111/mmi.13526.
- Poltermann, S.; Nguyen, M.; Günther, J.; Wendland, J.; Härtl, A.; Künkel, W.; Zipfel, P.F.; Eck, R. (2005) The putative vacuolar ATPase subunit vma7p of *Candida albicans* is involved in vacuole acidification, hyphal development and virulence. *Microbiology*, 5:1645-1655.
- Portillo, F. (2000) Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 10:31-42.
- Pottosin, I.; Velarde-Buendía, A.M.; Bose, J.; Fuglsang, A.T.; Shabala, S. (2014) Polyamines cause plasma membrane depolarization, activate Ca<sup>2+</sup> and modulate H<sup>+</sup>-ATPase pump activity in pea roots. *Journal of Experimental Botany*, 65:2463-2472.
- Prusty, R.; Grisafi, P.; Fink, G.R. (2004) The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101:4153-4157.
- Rayle, D.L.; Cleland, R. (1970) Enhancement of wall loosening and elongation by Acid solutions. *Plant Physiology*, 46:250-253.
- Rayle, D.L.; Cleland, R.E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99:1271-1274.
- Ramos, A.C.; Façanha, A.R.; Feijó, J.A. (2008a) Proton (H<sup>+</sup>) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 178:177-188.
- Ramos, A.C.; Façanha, A.R.; Lima, P.T.; Feijó, J.A. (2008b) pH signature for the responses of arbuscular mycorrhizal fungi to external stimuli. *Plant Signaling and Behavior*, 3:850-852.
- Ramos A.C.; Martins, M.A.; Okorokova-Façanha A.L.; Olivares F.L.; Okorokov L.A.; Sepúlveda N.; Feijó J.A.; Façanha A.R. (2009) Arbuscular mycorrhizal fungi

- induce differential activation of the plasma membrane and vacuolar H<sup>+</sup> pumps in maize roots. *Mycorrhiza*, 19:69-80.
- Rane, H.S.; Bernardo, S.M.; Raines, S.M.; Binder, J.L.; Parra, K.J.; Lee, S.A. (2013) *Candida albicans VMA3* is necessary for V-ATPase assembly and function and contributes to secretion and filamentation. *Eukaryotic Cell*, 12:1369-1382.
- Rao, R.P.; Hunter, A.; Kashpur, O.; Normanly, J. (2010) Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. *Genetics*, 185:211-220.
- Ribeiro, C.C.; Monteiro, R.M.; Freitas, F.P.; Retamal, C.; Teixeira, L.R.S.; Palma, L.M.; Silva, F.E.; Façanha, A.R.; Okorokova-Façanha, A.L.; Okorokov, L.A. (2012) Extracellular glucose increases the coupling capacity of the yeast V H<sup>+</sup>-ATPase and the resistance of its H<sup>+</sup> transport activity to nitrate inhibition. *Plos One*, 7:e49580.
- Ricicová, M.; Kucerová, H.; Váchová, L.; Palková, Z. (2007) Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768:1170-1178.
- Richards, A.; Veses, V.; Gow, N.A. (2010) Vacuole dynamics in fungi. *Fungal Biology Reviews*, 24:93-105.
- Richards, A.; Gow, N.A.R.; Veses, V. (2012) Identification of vacuole defects in fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 91:155-163.
- Riquelme, M. (2013). Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annual Review of Microbiology*, 67:587-609.
- Robert, S.; Kleina, Vehn. J.; Barbez, E.; Sauer, M.; Paciorek, T.; Baster, P.; Vanneste, S.; Zhang, J.; Simon, S.; Covannová, M.; Hayashi, K.; Dhonukshe, P.; Yang, Z.; Bednarek, S.Y.; Jones, A.M.; Luschig, C.; Aniento, F.; Zazimalová, E.; Friml, J. (2010) ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell*, 143:111-121.
- Robson, G.D.; Prebble, E.; Rickers, A.; Hosking, S.; Denning, D.W.; Trinci, A.P.J.; Robertson, W. (1996) Polarized growth of fungal hyphae is defined by an alkaline pH gradient. *Fungal Genetics and Biology*, 20:289-298.
- Rodriguez, C.; Domínguez, A. (1984). The growth and characteristics of *Saccharomycopsis lipolytica*: morphology and induction of mycelium formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 30:605-612.

- Rosales, E.P.; Iannone, M.F.; Groppa, M.D.; Benavides, M.P. (2011) Polyamines modulate nitrate reductase activity in wheat leaves: involvement of nitric oxide. *Amino Acids*, 42:857-865.
- Ruiz-Herrera, J.; Sentandreu, R. (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology*, 178:477-483.
- Saini, S.; Sharma, I.; Kaur, N.; Pati, P.K. (2013) Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports*, 32:741-757.
- San-Blas, G.; San-Blas, F.; Sorais, F.; Moreno, B.; Ruiz-Herrera, J. (1997) Polyamines in growth and dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Archives of Microbiology*, 166:411-413.
- Schuchardt, I.; Assmann, D.; Thines, E.; Schuberth, C.; Steinberg, G. (2005) Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell*, 16:5191-5201.
- Shepherd, V.A.; Orlovich, D.A.; Ashford, A.E. (1993) A dynamic continuum of pleiomorphic tubules and vacuoles in growing hyphae of a fungus. *Journal of Cell Science*, 104:495-507.
- Shoji, J.Y.; Arioka, M.; Kitamoto, K. (2006) Possible involvement of pleiomorphic vacuolar networks in nutrient recycling in filamentous fungi. *Autophagy*, 2-3:226-227.
- Smith, D.G.; Garcia-Pedrajas, M.D.; Gold, S.E.; Perlin, M.H. (2003) Isolation and characterization from pathogenic fungi of genes encoding ammonium permeases and roles in dimorphism. *Molecular Microbiology*, 50:259-275.
- Soeno, K.; Goda, H.; Ishii, T.; Ogura, T.; Tachikawa, T.; Sasaki, E.; Yoshida, S.; Fujioka, S.; Asami, T.; Shimada, Y. (2010) Auxin biosynthesis inhibitors, identified by a genomics-based approach, provide insights into auxin biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 51:524-536.
- Soulet, D.; Gagnon, B.; Rivest, S.; Audette, M.; Poulin, R. (2004) A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acid vesicles via a two-step mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:49355-49366.
- Spartz, A.K.; Ren, H.; Park, M.Y.; Grandt, K.N.; Lee, S.H.; Murphy, A.S.; Sussman, M.R.; Overvoorde, P.J.; Gray, W.M. (2014) SAUR inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase to promote cell expansion in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26:2129-2142.
- Stewart, E.; Gow, N.A.R.; Bowen, D.V. (1988) Cytoplasmic alkalinization during germ tube formation in *C. albicans*. *Journal of General Microbiology*, 134:1079-1087.

- Stroupe, C.; Hickey, C.M.; Mima, J.; Burfeind, A.S.; Wickner, W. (2009) Minimal membrane docking requirements revealed by reconstitution of Rab GTPase-dependent membrane fusion from purified components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106:17626–17633.
- Sudbery, P.E. (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, 9:737-748.
- Szabo, R.; Stofanikova, V. (2002) Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Letters*, 206:45-50.
- Tabor, C.W.; Tabor, H. (1984) Polyamines. *Annual Reviews of Biochemistry*, 53:749-790.
- Tabor, C.W.; Tabor, H. (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiological Reviews*, 49:81-99.
- Takahashi, K.; Hayashi, K.; Kinoshita, T. (2012) Auxin activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 159:632-641.
- Takeda, K.; Cabrera, M.; Rohde, J.; Bausch, D.; Jensen, O.N.; Ungermann, C. (2008) The vacuolar V1/V0-ATPase is involved in the release of the HOPS subunit Vps41 from vacuoles, vacuole fragmentation and fusion. *FEBS Letters*, 582:1558-1563.
- Tarsio, M.; Zheng, H.; Smardon, A.M.; Martínez-Muñoz, G.A.; Kane, P.M. (2011) Consequences of loss of Vph1 protein-containing vacuolar ATPases (V-ATPases) for overall cellular pH homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*, 286:28089-28096.
- Toei, M.; Saum, R.; Forgac, M. (2010) Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry*, 49:4715-4723.
- Tomitori, H.; Kashiwagi, K.; Asakawa, T.; Kakinuma, Y.; Michael, A.J.; Igarashi, K. (2001) Multiple polyamine transport systems on the vacuolar membrane in yeast. *Biochemical Journal*, 353:681-688.
- Tonon, G.; Kevers, C.; Gaspar, T. (2001) Changes in polyamines, auxin and peroxidase activity during *in vitro* rooting of *Fraxinus angustifolia* shoots: an auxin-independent rooting model. *Tree Physiology*, 21:655-663.
- Tsigie, Y.A.; Wang, C.Y.; Truong, C.T.; Ju, Y.H. (2011) Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology*, 102:9216-9222.

- Tun, N.N.; Santa-Catarina, C.; Begum, T.; Silveira, V.; Handro, W.; Floh, E.I.; Scherer, G.F. (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiology*, 47:346-354.
- Uemura, T.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K. (2007) Polyamine uptake by DUR3 and SAM3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282:7733-7741.
- Ueno, Y.; Fukumatsu, M.; Ogasawara, A.; Watanebe, T.; Mikami, T.; Matsumoto, T. (2004) Hyphae formation of *Candida albicans* is regulated by polyamines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27:890-892.
- Ungermann, C.; Wickner, W.; Xu, Z. (1999) Vacuole acidification is required for trans-SNARE pairing, LMA1 release, and homotypic fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96:11194–11199.
- Váchová, L.; Chernyavskiy, O.; Strachotová, D.; Bianchini, P.; Burdíková, Z.; Fercíková, I.; Kubínová, L.; Palková, Z. (2009) Architectura of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environmental Microbiology*, 11:1866-1877.
- Valdés-Santiago, L.; Guzman-de-Pena, D.; Ruiz-Herrera, J. (2010) Life without putrescine: disruption of the gene-encoding polyamine oxidase in *Ustilago maydis* odc mutants. *FEMS Yeast Research*, 10:928-940.
- van Heusden, G.P.H.; Steensma, H.Y. (2006) Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast*, 23:159-171.
- Veses, V.; Gow, N.A.R. (2008) Vacuolar dynamics during the morphogenetic transition in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 8:1339-1348.
- Veses, V.; Richards, A.; Gow, N.A.R. (2008) Vacuole inheritance regulates cell size and branching frequency of *Candida albicans* hyphae. *Molecular Microbiology*, 71:505-519.
- Veses, V.; Richards, A.; Gow, N.A. (2009) Vacuole inheritance regulates cell size and branching frequency of *Candida albicans* hyphae. *Molecular Microbiology*, 71:505-519.
- Vopálenská, I.; Støvíček, V.; Janderová, B.; Váchová, L.; Palková, Z. (2010) Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Environmental Microbiology*, 12:264-277.
- Vylkova, S.; Carman, A.J.; Danhof, H.A.; Collette, J.R.; Zhou, H.; Lorenz, M.C. (2011) The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *MBio*, 2:e00055-11.

- Vylkova, S.; Lorenz, M.C. (2014) Modulation of phagosomal pH by *Candida albicans* promotes hyphal morphogenesis and requires Stp2p, a regulator of amino acid transport. *Plos Pathogens*, 10:e1003995.
- Wang, L.; Lin, X. (2012) Morphogenesis in fungal pathogenicity: shape, size, and surface. *Plos Pathogens*, 8:e1003027.
- Weisman, L.S. (2006) Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:243-252.
- Whiteway, M.; Bachewich, C. (2007) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology*, 61:529-553.
- Wongsuk, T.; Pumeesat, P.; Luplertlop, N. (2016) Fungal *quorum sensing* molecules: role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology*, 56:440-447.
- Yamasaki, H.; Cohen, M.F. (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plant? *Trends Plant Science*, 11:522-524.
- Zandonadi, D.B.; Santos, M.P.; Dobbss, L.B.; Olivares, F.L.; Canellas, L.P.; Binzel, M.L.; Okorokova-Façanha, A.L.; Façanha, A.R. (2010) Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activation. *Planta*, 231:1025-1036.
- Zhuang, X.; Tlalka, M.; Davies, D.S.; Allaway, W.G.; Watkinson, S.C.; Ashford, A.E. (2008) Spitzenkörper, vacuoles, ring-like structures, and mitochondria of *Phanerochaete velutina* hyphal tips visualized with carboxy-DFFDA, CMAC and DiOC6(3). *Mycological Research*, 113:417-431.
- Zinjarde, S.; Apte, M.; Mohite, P.; Kumar, A.R. (2014) *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications. *Biotechnology Advances*, 32:920-933.