

MODULAÇÃO DA TRANSIÇÃO DIMÓRFICA DE
Yarrowia lipolytica

KEILLA DOS REIS DUTRA FERREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO-
UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

Abril/2016

MODULAÇÃO DA TRANSIÇÃO DIMÓRFICA DE
Yarrowia lipolytica

KEILLA DOS REIS DUTRA FERREIRA

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

ORIENTADORA: ANNA L. OKOROKOVA FAÇANHA

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

Abril/2016

MODULAÇÃO DA TRANSIÇÃO DIMÓRFICA DE
Yarrowia lipolytica

KEILLA DOS REIS DUTRA FERREIRA

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

Comissão Examinadora:

Prof. Clóvis de Paula Santos - UENF

Prof. Marco Antonio Cruz Lopes - UFRJ

Prof^a. Valdirene Moreira Gomes - UENF

Prof^a Anna L. Okorokova Façanha – UENF (Orientadora)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
RESUMO.....	II
ABSTRACT.....	I
1. REVISÃO DE LITERATURA	II
1.1 <i>Yarrowia lipolytica</i>	- 1 -
1.2 Transição levedura-hifa.....	2
2.FATORES QUE MODULAM A TRANSIÇÃO LEVEDURA - HIFA EM <i>Yarrowia lipolytica</i>	3
2.1 Auxina.....	3
2.2 H ⁺ -ATPases	7
2.3 Óxido Nítrico	8
2.4 Sinalização por meio da cascata da MAPK e PKA.....	10
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo geral.....	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1 Cepa da levedura <i>Yarrowia lipolytica</i>	13
4.2 Preparação dos meios de cultura e manutenção da cepa.....	13
4.3 Acompanhamento da morfologia de <i>Y. lipolytica</i>	13
4.4 Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em meio líquido	13
4.5 Dosagem de compostos indólicos produzidos por <i>Y. lipolytica</i>	14
4.6 Isolamento de membranas celulares de <i>Y. lipolytica</i>	15
4.7 Determinação do conteúdo de proteína.....	15
4.8 Determinação do transporte de H ⁺	16
4.9 Determinação de fosfato inorgânico (P _i).....	17
4.10 Determinação da atividade hidrolítica.....	17
4.11 Quantificação de NO em células de <i>Y. lipolytica</i>	17
4.12 Quantificação de amônia em células de <i>Y. lipolytica</i>	18
5. RESULTADOS.....	20
5.1 Efeito dos inibidores de AIA (TIBA e PCIB) sobre o cultivo e transição dimórfica de <i>Y. lipolytica</i>	20
5.2 Efeito dos inibidores da sinalização da auxina na morfologia das colônias de <i>Yarrowia lipolytica</i>	21
5.3 Efeito do AIA sobre a atividade de H ⁺ -ATPase e tipo P e atividade hidrolítica de <i>Y. lipolytica</i>	22
5.4 Detecção de NO em células de <i>Y. lipolytica</i>	23

5.5 Efeito do doador de óxido nítrico (SNP) sobre o cultivo e transição dimórfica de <i>Y. lipolytica</i>	25
5.6 Efeito do bloqueador de óxido nítrico (PTIO) sobre a transição dimórfica de <i>Y. lipolytica</i>	26
5.7 Efeito do NO sobre a atividade de H ⁺ -ATPase tipo P e atividade hidrolítica de <i>Y. lipolytica</i>	28
5.8 Efeito do inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) sobre a transição dimórfica de <i>Y. lipolytica</i>	29
5.9 Efeito do inibidor de GMP cíclico sobre a transição dimórfica de <i>Y. lipolytica</i>	30
5.10 Efeito da via de sinalização desencadeada pela MAPK na morfogênese de <i>Y. lipolytica</i>	31
5.11 Análise da relação das vias da auxina e a via da MAPK com NO na morfogênese de <i>Y. lipolytica</i>	32
5.12 Efeito da via de sinalização desencadeada pela MAPK sobre a atividade de H ⁺ -ATPase tipo Pe atividade hidrolítica de <i>Y. lipolytica</i>	33
5.13 Efeito do AMP cíclico na morfogênese de <i>Y. lipolytica</i>	35
5.14 Efeito da via da PKA sobre a morfologia de <i>Y. lipolytica</i>	36
5.15 Efeito do inibidor da PKA sobre a transição dimórfica em <i>Y. lipolytica</i>	37
5.16 AMP cíclico reverte o efeito bloqueador da morfogênese causado pelo inibidor da MAPK.....	37
5.17 Efeito dos estimuladores e inibidores da morfogênese de <i>Y. lipolytica</i> sobre o pH ambiental das colônias.....	38
5.18 Quantificação de amônia secretada por células de <i>Y. lipolytica</i>	39
6. DISCUSSÃO.....	40
7.CONCLUSÃO.....	51
8. BIBLIOGRAFIA.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
ACMA	9-Amino-6-Cloro-2-Metoxiacridina
AIA	Ácido indol-3-acético
Al	Alumínio
AMP cíclico	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase (classe de enzimas que hidrolizam ATP)
BSA	Albumina de soro bovino
CTR	Controle
DO _{600 nm}	Densidade Ótica a 600 nm
MÊS	N- morfolino ácido etanosulfônico
MOPS	N-morfolino ácido propano-sulfônico
MP	Membrana Plasmática
NO	Óxido Nítrico
PCIB	Ácido <i>p</i> -clorofenoxisobutírico
ΔPh	Gradiente químico de H ⁺ (Diferença da concentração de H ⁺ através da Membrana)
PTIO	2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
PMSF	Fenil-Metil-Sulfonil-fluorídrico
RPM	Rotações por minuto
SNP	Nitroprussiato de sódio
TIBA	Ácido 2,3,5-triobenzóico
Tris-HCl	Tris[hidroximetil]aminometano
Trp	Triptofano
YED	Yeast extract dextrose, meio de cultivo rico

RESUMO

A transição morfogênica é determinante para a patogenicidade e virulência de fungos que infectam plantas a humanos. Para compreender os mecanismos que regulam a morfogênese, utilizamos como modelo de estudo o fungo dimórfico *Yarrowia lipolytica*, cujo o dimorfismo depende de modulações do pH do meio. A H⁺-ATPase do tipo P exerce uma importante função em células fúngicas e de plantas, na regulação do pH interno e extracelular. Previamente, verificamos que a auxina induz a filamentação em *Y. lipolytica* em baixas concentrações (10 pM). Potentes inibidores de auxina em plantas, TIBA e PCIB, bloquearam a transição dimórfica em *Y. lipolytica*. PCIB interferiu com a organização de colônias, sugerindo que uma sinalização por auxina integra o programa de filamentação. AIA e Trp estimularam cerca de 2 vezes o bombeamento de H⁺ pela H⁺-ATPase tipo P, sendo tal efeito fortemente antagonizado pelo PCIB. Demonstramos que a utilização do doador de NO (SNP) induziu a morfogênese em baixas concentrações (10 nM), enquanto altas concentrações do SNP (50 e 100 μM) inibiram o crescimento celular e bloquearam a morfogênese. Constatou-se ainda que o seqüestrador de NO (PTIO) foi capaz de inibir a transição levedura-hifa, bem como o fez o inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME). A detecção de NO *in vivo* usando uma sonda fluorescente revelou aumento de níveis de NO na presença de SNP em células filamentosas. O transporte de H⁺ ATP-dependente foi regulado positivamente pelo SNP e negativamente pelo PTIO (aumento de 2 vezes e decréscimo de 1,5vezes, respectivamente). O envolvimento da cascata da PKA e MAPK na regulação da morfogênese também foi analisado. O cAMP (25 mM) estimulou a formação de hifas em 50% enquanto o inibidor de MAPK (100 μM) diminuiu a morfogênese pela metade, e teve seu efeito atenuado na presença do cAMP. As atividades de transporte de H⁺ e hidrolítica da bomba foram fortemente inibidas pelo iMAPK (80%), e seu efeito foi antagonizado pelo AIA. As mudanças do pH da hifosfera e do meio extracelular durante a morfogênese foram acompanhadas usando indicador de pH e a produção de NH₃ por fotoacústica. Em conjunto, os resultados indicam que a via de sinalização dependente de auxina, tendo óxido nítrico como um mediador, regula H⁺ATPases de membrana plasmática, influenciando a polarização celular e o desenvolvimento das hifas fúngicas. Os dados fornecem a base mecanística do papel integrativo de auxinas como moléculas chaves da transição levedura-hifa e da morfogênese micelial através de um mecanismo de crescimento ácido, aparentemente conservado na evolução de fungos e plantas.

Palavras-chaves: *Yarrowia lipolytica*, transição dimórfica, Auxina, Óxido Nítrico, H⁺-ATPases, PKA, MAPK.

ABSTRACT

Many fungi that are pathogenic towards plants and animals undergo morphogenic shift. To understand the cellular mechanisms that govern morphogenesis we used *Yarrowia lipolytica*, non-pathogenic yeast which dimorphic switching is induced by medium pH. P-type H⁺-ATPase, the plasma membrane primary plays an essential role in fungal and plant growth, and regulation of internal and external pH. It has been showed previously that very low indole-3-acetic acid (IAA) concentrations [pM to fM] promoted filamentation of *Y.lipolytica*. The potent inhibitors of auxin in plants interfered with yeast-to-hypha transition. Disturbances imposed by PCIB on colonial organization also suggested that auxin signaling events integrate the mycelial program. Two-fold stimulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity by IAA and Trp was antagonized by PCIB. The nitric oxide donor SNP induced morphogenesis in low concentrations (10 nM), while higher concentrations (50-100 μM) inhibited cell growth and morphogenesis. Yeast-to-hypha transition was reduced by PTIO, a nitric oxide scavenger, as well as by L-NAME, the inhibitor of nitric oxide synthase. NO detection *in vivo* using fluorescent probe reveals the increase in NO levels in filamentous cells. In addition, ATP-dependent H⁺ transport was positively regulated by SNP and negatively by PTIO (2-fold increase and 1.5-fold decrease). The participation of PKA and MAPK in the modulation of morphogenesis was also analysed. cAMP (25 mM) stimulated hyphal formation while the inhibitor of MAPK (100 μM) diminished morphogenesis, and its effect was attenuated by cAMP. Both H⁺ transport and ATPase activities were strongly inhibited by iMAPK (80%), which was reverted by IAA. The changes in hyphae pH during morphogenesis were accompanied by pH indicator, and the production of NH₃ by photoacoustic laser. Taken together the data indicate an auxin-dependent activation of the fungal plasma membrane H⁺ pump underlying cell elongation and mycelial development. This provides a mechanistic framework for the consideration of an integrative role of auxins as key signaling molecules of the yeast-to-hypha transition and mycelial morphogenesis through an acid growth mechanism apparently conserved in fungi and plants evolution.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, dimorphic transition, auxin, nitric oxide, H⁺-ATPase, PKA, MAPK.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um fungo hemiascomiceto, pertencente a família Dipodascaceae, cuja pesquisa científica e tecnológica está em plena ascensão. Seu estudo tem atraído grande interesse na área biotecnológica por possuir a capacidade de produzir diversos metabólitos, por exemplo, ácidos orgânicos, os quais incluem o citrato (Barth e Gaillardin, 1997; Groenewald *et al.* 2014). Essa levedura tem atraído a atenção de pesquisadores pela sua capacidade de metabolizar hidrocarbonetos e lipídeos (Barth e Gaillardin, 1996; Dominguez *et al.* 2000; Bankar *et al.* 2009). Pode-se associar essa capacidade de *Y. lipolytica* com o seu habitat, que é dado por possui como nicho substratos ricos em lipídeos e proteínas. Entretanto, algumas espécies têm sido isoladas do solo, rede de tratamento de esgotos e ambientes contaminados com óleo. A mesma produz lipases, enzimas que apresentam grande interesse na indústria de couro e de queijo (*German patent D-272867*). Além disso, possuem vigoroso crescimento em diferentes valores de pH e exibem crescimento ótimo a 30°C, embora seja capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura, que se estende de 5 a 32° C (Barth e Gaillardin, 1997; Fickers *et al.*, 2004., Kamzolova e Morgunov, 2013).

A levedura *Y. lipolytica* difere das bem caracterizadas leveduras convencionais, como *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, Todavia apresenta similaridades com *Cândida albicans* quanto a sua evolução filogenética, fisiologia, genética e biologia molecular (Dujon *et al.*, 2004). Vale a pena ressaltar que inicialmente *Y. lipolytica* foi caracterizada como *Candida lipolytica* porém algumas diferenças levaram os microbiologistas a separar o gênero *Yarrowia* (Van der Walt e Arx, 1980). Contrariamente a *C. albicans*, *Yarrowia lipolytica* é um microrganismo não-patogênico e apresenta o ciclo celular bem definido. Essa última característica permite fácil manipulação gênica, o que proporcionou um rápido progresso das pesquisas com essa levedura. Por ser um fungo dimórfico, *Y. lipolytica* pode ser encontrado sob três formas morfológicas: levedura, pseudohifa (cadeia de células alongadas com

constricções visíveis posicionando o septo) e hifa (filamentos lineares sem constricções visíveis) (Palande *et al.*, 2014).

1.2 Transição levedura-hifa

A transição entre duas formas celulares (levedura e hifa) é característica intrínseca de alguns fungos, sendo comumente considerada necessária para a virulência e patogenicidade de fungos dimórficos que acometem a saúde humana, como por exemplo, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Penicillium marneffeii* e *Coccidioides immitis* (Phan *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 2001; Woods, 2005., Alkan *et al.*, 2013). A transição também é crucial para virulência de fungos patógenos de plantas, como, *Ustilago maydis* (Martinez-Espinoza *et al.*; 2004). Entretanto os fatores considerados mais bem sucedidos para o desenvolvimento dessa virulência ainda permanecem incertos.

A compreensão dos mecanismos de dimorfismo foi aprofundada pelos estudos com *Saccharomyces cerevisiae*. Estes estudos identificaram duas vias capazes de levar a transição morfogênica. A mais importante delas seria a via das MAPKs (mitogen-activated protein kinase) que medeia a formação de hifas em resposta a feromônios, cujo fator de transcrição diretamente envolvido na filamentação é o Cph1 (Liu *et al.*, 1993). A segunda via é a PKA (cAMP-dependent protein kinase A) onde a proteína Efg1 é tida como principal agente no desenvolvimento da morfogênese (Stoldt *et al.*, 1997, Lengeler *et al.*, 2000). Em *S. cerevisiae* a via das MAPKs parece ser a mais importante, entretanto a via PKA é a predominante em *C. albicans* (Ernest, 2000, Schaeckel *et al.*, 2013).

Tornou-se freqüente a utilização de *C. albicans* para estudos da transição levedura-hifa, uma vez que *S. cerevisiae* não forma hifas verdadeiras, sendo somente observado a presença de pseudohifas. Em *C. albicans* foi identificado uma terceira via que envolve o fator de transcrição do tipo *zinc finger* Rim101p que é ativado em resposta a alcalinização do pH extracelular (Li e Mitchell, 1997; Davis *et al.*, 2000, Cornet e Gaillardin, 2014).

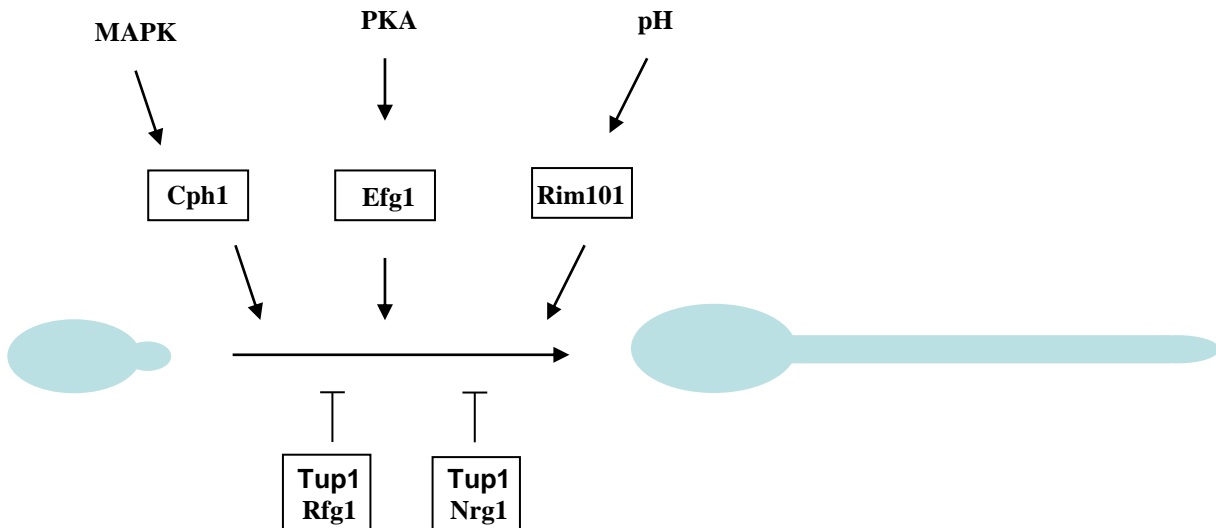


Figura 1. Vias de regulação da transição levedura-hifa. As setas indicam ativação e as barras inibição. Os fatores de transcrição são mostrados nas caixas. Adaptado de Liu (2001).

2. Fatores que modulam a transição dimórfica de *Yarrowia lipolytica*

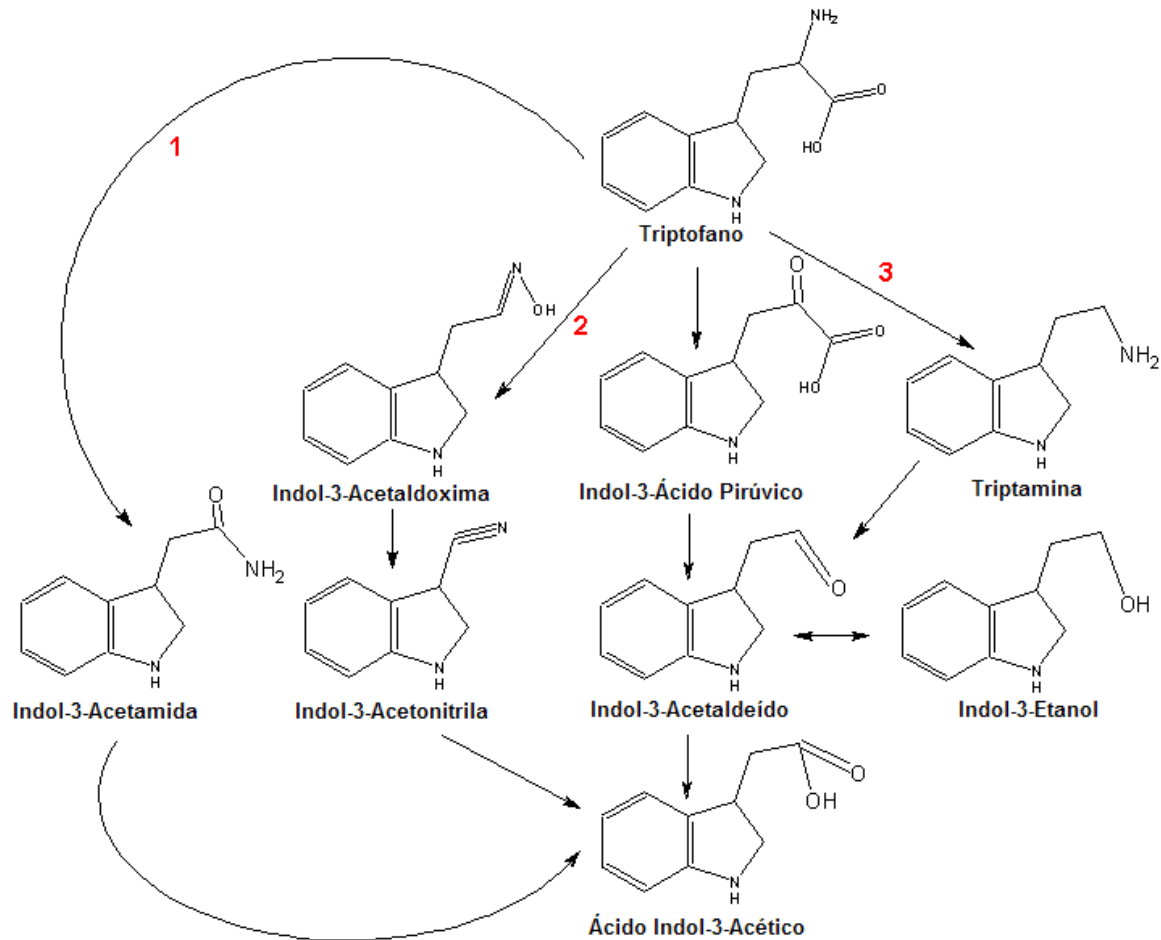
2.1 Auxina

Auxina é um hormônio produzido por plantas, sendo que esse nome é utilizado hoje como um nome genérico para designar um grupo de importantes moléculas de origem vegetal com habilidades de regular respostas de crescimento às plantas. Também pode ser encontrada em humanos, animais e microorganismos (Teale *et al.*, 2006). Essa foi a primeira família de hormônios vegetais a ser identificada através de estudos de fototropismo realizados por Darwin e seu filho. Entretanto a auxina é capaz de regular muitos outros processos além do fototropismo, incluindo: divisão celular, formação de raízes laterais e adventícias, dominância apical senescência de folhas, amadurecimento de frutas e floração (Taiz e Zeiger, 2006; Shrivastava *et al.*, 2008).

A auxina predominante e a mais ativa biologicamente nas plantas é o ácido indol-3-acético (AIA). O AIA é produzido em locais de intensa proliferação celular como folhas jovens e raízes, e posteriormente redistribuída para o restante da planta (Teale *et al.*, 2006). Hull *et al.* (2000) estabeleceram que as duas rotas mais comuns para síntese de AIA *in vivo* são Triptofano → Indol-3-Acetamida e Triptofano → Indol-3-Acetaldoxima (Figura 2). Uma terceira rota

que converte triptofano a triptamina e posteriormente a AIA, não se acredita ter função *in vivo* devido a falta de resultados experimentais.

Figura 2. Vias de biosíntese de Ácido Indol-3-Acético (AIA) em plantas. As duas rotas mais comuns para síntese de AIA *in vivo*: Triptofano → Indol-3-Acetamida (1) e Triptofano → Indol-3-Acetaldoxima (2). Uma terceira rota que converte triptofano a triptamina (3) (adaptada de Hull *et al.*, 2000).



A auxina ativa sistemas primários de transporte de prótons na membrana plasmática de células vegetais (Frias *et al.*, 1996). O gradiente eletroquímico gerado pela H^+ -ATPase de MP está diretamente envolvido com um dos mecanismos fundamentais do desenvolvimento vegetal, o aumento da plasticidade da parede celular para possibilitar o processo de crescimento e divisão da célula vegetal. Esse último mecanismo está relacionado com a teoria do crescimento ácido que postula que um aumento da extrusão de prótons mediado pela H^+ -ATPase promove a acidificação do apoplasto, que por sua

vez ativa enzimas específicas que atuam sobre a parede celular aumentando sua plasticidade e, conseqüentemente, permitindo o alongamento da célula (Rayle e Cleland, 1992). Zandonadi *et al.* (2007), examinando o efeito da auxina em plântulas de milho, demonstraram que a auxina foi capaz de ativar H⁺-ATPases tanto de MP como vacuolar.

Porém, interessante os efeitos da auxina em leveduras já haviam sido relatados por Robinson e Stier em 1941, que observaram o efeito aparente da auxina sobre o tamanho e aspecto das células de levedura (*S. cerevisiae*) em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de peptona. Este autores notaram que células longas e mais largas apareceram unicamente em meios que continham consideráveis quantidades de auxina. Este foi um dos trabalhos pioneiros sobre formação de auxina em culturas de leveduras., Entretanto, esse estudo não teve seguimento e as pesquisas subseqüentes foram realizadas somente em modelos vegetais.

Curiosamente, apenas após cerca de 60 anos a ação da auxina em leveduras voltou a chamar a atenção dos pesquisadores. Onde Prusty, *et al.* (2004) demonstraram que concentrações altas de AIA (250 µM) inibem o crescimento de *S. cerevisiae* em contrapartida, concentrações baixas (120 µM) induzem a uma filamentação e adesão da levedura. Estas respostas são mediadas por uma família de transportadores e o fator de transcrição fúngico Yap1. Além disso a indução da morfogênese por AIA requer a função de Flo11, uma conhecida proteína da superfície celular requerida para a indução da filamentação e crescimento invasivo.

Os dados do nosso grupo de pesquisa mostraram que o tratamento com AIA estimulou a formação de hifas em *Y. lipolytica*, e que esse efeito é dose dependente (Figura 3). Doses baixas (10 pM) estimularam a transição dimórfica e doses altas (100 µM) inibiram o crescimento celular (Dutra, 2008).

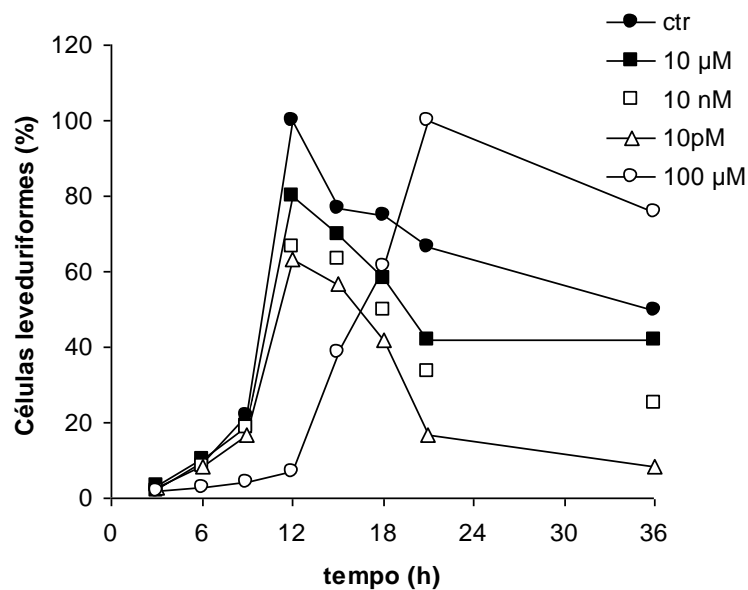


Figura 3. Efeito da auxina na transição dimórfica de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de 10 pM, 10 nM, 10 μM e 100 μM, de AIA. O número de células na forma de levedura foi contado em cada ponto temporal e o valor máximo na cultura controle foi considerado 100% (Dutra, 2008).

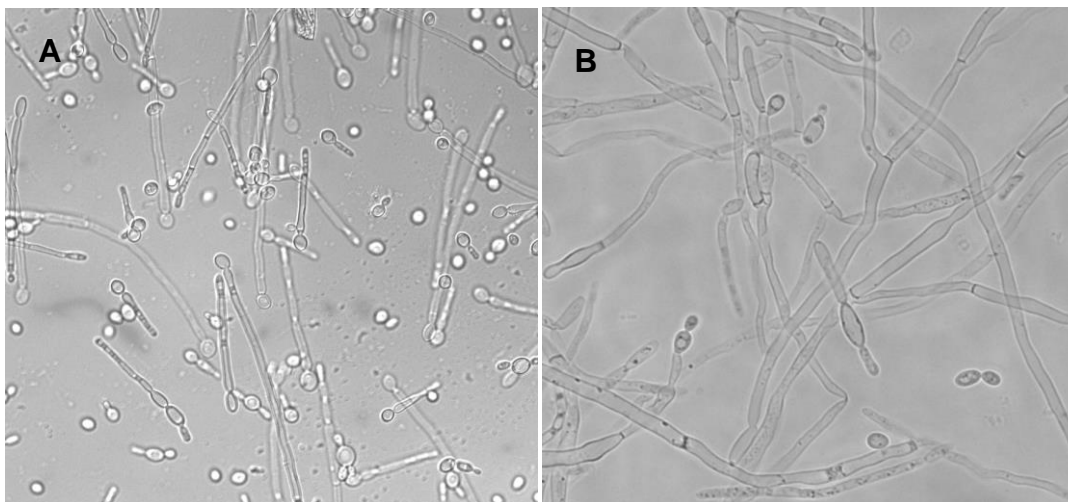


Figura 4. Estados morfológicos de *Y. lipolytica*. (A) Controle. (B) Tratamento com 10 pM de auxina. As células foram visualizadas após 24 horas de cultivo.

Existem alguns componentes moleculares responsáveis pelo transporte de AIA, dentre esses pode-se citar os transportadores de influxo (AUX1) e os de efluxo (PIN) (Gälweiler *et al.*, 1998, Bennett *et al.*, 1996, Paciorek *et al.*, 2005). O AIA é capaz de causar rápidas mudanças na expressão de genes e duas famílias de proteínas foram identificadas responsáveis por estas respostas: ARFs (*Auxin Response Factors*) e proteínas Aux/AIA (Hagen e

Guilfolyle, 2002; Paciorek e Friml, 2006). As proteínas Aux/AIA são capazes de suprimir a expressão de genes induzidos pela auxina (Tiwari *et al.*, 2001), em contrapartida a presença de altas concentrações de auxina pode causar uma aceleração na degradação destas proteínas (Gray *et al.*, 2000).

Os dados obtidos indicam a existência de uma via de controle da transição morfogênica dependente de AIA (Dutra 2010). Dessa forma, para melhor compreender a ação de AIA na transição dimórfica em *Y. lipolytica*, utilizamos no presente trabalho dois inibidores da sinalização de AIA: o ácido 2,3,5-triobenzóico (TIBA) e o ácido *p*-clorofenoxisobutírico (PCIB). O TIBA é um inibidor de efluxo de AIA (Lomax *et al.*, 1995). O PCIB é um inibidor, que atua regulando a estabilidade das proteínas AUX/AIA, bloqueando a transcrição de genes induzidos por AIA (Oono *et al.*, 2003).

2.2. H⁺-ATPases

As H⁺-ATPases ou bombas de H⁺ são capazes de transportar prótons através das membranas contra o gradiente eletroquímico de H⁺, usando a energia da hidrólise do complexo ATP-Mg (Nelson, 1992). Essas bombas são consideradas enzimas eletrogênicas, pois transportam carga elétrica (positiva) em forma de H⁺, criando uma diferença de cargas elétricas através da membrana, chamada de potencial de membrana (E_M) e, simultaneamente, uma diferença dos potenciais químicos de H⁺ ou gradiente de concentração de prótons (ΔpH) (Pedersen & Carafoli, 1987).

São conhecidos três tipos de ATPases protônicas: H⁺-ATPases do tipo P (P H⁺-ATPases), H⁺-ATPases do tipo V (V H⁺-ATPases) e H⁺-ATPases do tipo F (F H⁺-ATPases) (Pedersen & Carafoli, 1987). As P H⁺-ATPases estão localizadas na membrana plasmática (Serrano, 1983; Pedersen & Carafoli, 1987), nas vesículas secretórias (Alves, 2006) e nas organelas da via secretória de levedura (Samarão, 2003). As V H⁺-ATPases são encontradas em membranas intracelulares (Stevens & Forgac, 1997; Samarão *et al.*, 2009) e também na membrana plasmática de células animais especializadas. (Klionsky *et al.*, 1990; Merzendorfer *et al.*, 1997; Nelson & Harvey, 1999; Wieczorek *et al.*, 1999; Beyenbach & Wieczorek, 2006). Enquanto as ATPases do tipo F

estão localizadas nas mitocôndrias, em membranas de bactérias e nos cloroplastos. As F^{H+}-ATPases funcionam como ATP sintases, pois são responsáveis pela síntese de ATP, mas também são capazes de hidrolisar ATP, *in vitro* (Pedersen & Carafoli, 1987).

As H⁺-ATPases tipo P exibem uma importante função na fisiologia de fungos e plantas. Estão entre as mais abundantes proteínas existentes na membrana plasmática de plantas e leveduras (Petrov e Slayman 2000). Os íons de H⁺, assim como Ca²⁺, são utilizados para a transdução de sinais químicos e ambientais (Ramos *et al.*, 2005). Além disso, o gradiente eletroquímico de prótons é usado como força motriz para o transporte de íons, açúcares, e aminoácidos através da membrana plasmática, um processo fundamental para a energização celular. A extrusão de H⁺ catalisada pela H⁺-ATPase da membrana plasmática contribui para a regulação do pH intracelular e o pH de superfície de *Y. lipolytica* (Lobão *et al.*, 2007). Enquanto H⁺-ATPases tipo V acidificam compartimentos endomembranas, incluindo o vacúolo (Sze *et al.*, 1999, Gaxiola *et al.*, 2012).

Interessantemente, dentre os genes requeridos para transição, foram identificados genes que codificam transportadores de prótons. Poltermann *et al.* (2005) demonstraram que a expressão da subunidade Vma7 da H⁺ ATPase vacuolar é essencial para acidificação do vacúolo, crescimento de hifas, e, conseqüentemente, virulência de fungos patogênicos, como por exemplo *C. albicans*.

2.3 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula bioativa que tem sido descrito como um mensageiro secundário que participa de muitos processos em animais, onde foi primeiramente descrito. O mesmo está envolvido no relaxamento vascular tendo um papel de grande importância na dilatação de vasos sanguíneos e defesa durante as respostas do sistema imunológico, onde é capaz de destruir patógenos e células tumorais. E ainda o NO parece estar relacionado numa série de outros eventos em plantas e fungos; ele está envolvido na defesa do hospedeiro, da virulência do patógeno e também

muitas formas de interação simbiótica (Beligni e Lamattina 1999; Turrion-Gomez e Benito 2011). Contudo o NO pode apresentar um papel dúbio, as vezes benéficos e outras prejudicial. Pois, apesar de ter uma importante função como mensageiro e modulador em diversos processos biológicos essenciais, o mesmo é potencialmente tóxico (Mayer e Hemmens, 1997, Delledonne 2005). A sua toxicidade se apresenta particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários de oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (Gow e Ischiropoulas, 2001).

Em células humanas tem sido apresentado que a proliferação celular induzida por NO ocorre via ativação da cascata da MAPK. Assim como em animais, recentes descobertas tem extensivamente mostrado a presença e funcionalidade do NO em plantas, sendo novas e diversas funções atribuídas a essa molécula em muitos processos fisiológicos, tais como: crescimento e desenvolvimento, defesa contra patógenos, morte celular programada e tolerância à condições de estresse (Lamattina *et al.*, 2003, Neill *et al.*, 2003).

Pesquisas voltadas para a descoberta da origem do NO no metabolismo de plantas, resultaram na descoberta de algumas rotas enzimáticas, as quais são capazes de produzir quantidades consideráveis de NO para processos de sinalização. Também foram relatadas rotas de produção de NO que não dependem da atividade de enzimas.

Dentre as enzimas envolvidas na produção de NO está descrita uma enzima homóloga a NO Sintase de animais, que utiliza como substrato o aminoácido arginina (Crawford, 2006). A redução enzimática e não enzimática de nitrato e nitrito pode conduzir a produção de NO. A formação não enzimática é favorecida em valores de pH ácidos, onde o nitrito pode ser transformado à NO via nitrato (Stohr e Ullrich, 2002, Bethke *et al.* 2004). Entre valores de pH de 3 a 6 o nitrito pode também ser quimicamente reduzido pelo ácido ascórbico para produzir NO (Henry *et al.*, 1997). Esta reação pode ocorrer nos cloroplastos e no espaço apoplástico onde a presença de ácido ascórbico tem sido identificada (Horemans *et al.*, 2000). Adicionalmente, duas enzimas que catalisam a redução de nitrato em plantas, nitrato redutase no citosol e nitrito redutase nos plastídios, tem sido estudadas por sua capacidade de formação de NO (Yamasaki *et al.*, 2000).

Recentemente o NO vem sendo apontado como um intermediário na cascata de sinalização regulada pela auxina, influenciando a morfologia e fisiologia de raízes (Correa-Aragunde *et al.*, 2007). Tem-se verificado evidências da participação do NO em processos induzidos por auxina na expansão de raízes (Gouvea *et al.*, 1997), na promoção de raízes adventícias (Pagnussat *et al.*, 2002), e formação de raízes laterais (Correa-Aragunde *et al.*, 2004).

A origem de NO em leveduras é ainda um assunto de debate essencialmente devido à falta de ortólogos de NO sintase no genoma de leveduras. Porém Ludovico *et al.*, (2007) identificaram na levedura *S. cerevisiae* uma atividade semelhante a da NO sintase de animais, onde a produção de NO depende dos níveis intracelulares de arginina, indicando a existência de uma enzima com atividades semelhante a NO sintase. Castello e colaboradores mostraram que células de leveduras são capazes de produzir NO na mitocôndria em condições de hipoxia. (Castello *et al.*, 2006). E ainda a sinalização por NO vem sendo apontada em resposta ao estresse oxidativo em *S. pombe* e *C. albicans* (Astuti *et al.*, 2015 e Tilmann *et al.*, 2011).

2.4 Sinalização por meio de MAPK e PKA

Muitas espécies de fungos são dimórficos, podendo mudar entre células de levedura e longos filamentos multicelulares chamados hifas ou pseudohifas. Diversos estudos têm apresentado vias de sinalização que governam a transição morfogênica. Uma razão fundamental para isto é que o dimorfismo está envolvido na virulência de muitos fungos patogênicos (Lengeler *et al.*, 2000; Rodriguez-Kessler *et al.*, 2012; Jiménez-Bremont *et al.*, 2012).

Na maioria dos fungos dimórficos, incluindo *Y. lipolytica*, é conhecido que estímulos ambientais transmitem informações que influenciam os processos de diferenciação da célula através de vias de sinalização, das quais, MAPK e PKA parecem ser as mais importantes (Ruiz-Herrera *et al.*, 2012).

Em *C. albicans* e *U. maydis*, proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) tem sido relacionada ao crescimento filamentososo (Banuett, 1998; Martínez-Espinoza *et al.*, 2004). A cascata da MAPK são vias de sinalização

multifuncionais que evolutivamente são bem conservadas em todas as células eucarióticas. Um típico modo de fosforilação da MAPK envolve três proteínas quinases em ordem hierárquica: uma proteína quinase (MAPK), uma Mapk quinase (MAPKK) e uma MAPKK quinase (MAPKKK). A ativação sequencial destas quinases por fosforilação mostram-se fundamentais na transdução de sinais (Banuett, 1998; Widmann *et al.*, 1999). Em *Saccharomyces cerevisiae*, pelo menos, cinco MAPK foram identificadas (Lengeler *et al.*, 2000). Estas governam diferentes fenômenos no ciclo de vida da levedura: o acasalamento e invasão em linhagens haplóides, desenvolvimento de pseudohifase formação de esporos em linhagens diplóides, bem como a manutenção da integridade da parede celular e a resposta das células ao estresse osmótico (Heinisch *et al.*, 1999; Panet *et al.*, 2000; Saito e Tatebayashi, 2004; Bardwell, 2005). Em *C. albicans* e *U. maydes*, vários genes que codificam componentes da cascata da MAPK têm-se mostrado envolvidos na regulação da transição dimórfica (Leberer *et al.*, 1996; Banuett, 1998; Martínez-Espinoza *et al.*, 2002, 2004).

Cabe ressaltar que uma outra via central na transição levedura – hifa em muitos fungos é a rota da PKA. Em eucariotos, a PKA é ativada por AMPc, uma importante molécula na sinalização (Taylor *et al.*, 2004, 2005). O aumento na concentração de AMPc intracelular culmina na ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Essa enzima é composta por duas subunidades: uma reguladora (R), com alta afinidade pelo AMPc, e uma catalítica (C). Na ausência de AMPc, a subunidade C torna-se inativa pela formação de um complexo tetramérico R_2C_2 . A ligação do AMPc à subunidade R induz mudanças conformacionais que resultam na dissociação da haloenzima inibida e consequente ativação da PKA, que em seguida pode fosforilar as proteínas alvo (Johnson *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2004, 2005).

As duas cascatas de sinalização (MAPK e PKA) exibem importantes funções na morfogênese de *S. cerevisiae* e *C. albicans* (Lengeler *et al.*, 2000; Berman e Sudbery, 2002). Os componentes destas vias também estão presentes em *Y. lipolytica*, mas são pouco esclarecidas, pois apresentam baixa similaridade nas sequências de aminoácidos com os de *S. cerevisiae* e *C. albicans* (Cervantes-Chavez e Ruiz Herrera, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Demonstrar a existência de uma via de controle da transição dimórfica levedura-hifa em *Yarrowia lipolytica* baseada numa modulação pelo óxido nítrico como um mediador da cascata de sinalização da auxina, MAPK e PKA.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos do inibidor de AIA (PCIB) no cultivo e na transição dimórfica de *Y. lipolytica*.
- Identificar mudanças na atividade de H⁺-ATPase tipo P durante a transição dimórfica das células na presença de AIA e dos inibidores
- Analisar o efeito da sinalização da via do AIA na morfologia das colônias de *Y. lipolytica*;
- Detectar a produção de NO em células de levedura em diferentes estágios da morfogênese cultivadas na presença de AIA, SNP, PTIO;
- Analisar atividade de H⁺-ATPase tipo P em membranas isoladas de células de *Y. lipolytica* cultivadas na presença e ausência de doador e sequestrador de NO (SNP e PTIO);
- Determinar a participação da via da MAPK na transição dimórfica de células de *Y. lipolytica*;
- Identificar mudanças na atividade de H⁺-ATPase tipo P durante a transição dimórfica de células de *Y. lipolytica*, cultivadas na presença do inibidor da via MAPK;
- Determinar a participação da via da PKA na transição dimórfica de células de *Y. lipolytica*;
- Adaptar o uso do espectroscopia fotoacústica a laser para detecção de amônia em células vivas de *Y. lipolytica*;
- Quantificar a secreção de amônia por células durante morfogênese.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepa da levedura *Yarrowia lipolytica*.

Neste estudo foi utilizada a cepa de *Yarrowia lipolytica*: JM-12 (*MatB leu2-35 lys5-12 ura3-18*) cedida pelo Prof. Angel Domínguez do Instituto de Microbiologia Bioquímica/CSIC, Universidade de Salamanca (Espanha).

4.2 Preparação dos meios de cultura e manutenção da cepa.

As células de levedura *Y. lipolytica* foram propagadas a 30°C no meio rico YED (1% extrato de levedura, 1% glicose, suplementado com uracila, leucina e lisina, a 0,05%). O meio de cultura foi ajustado à pH diferentes com HCl. Para se obter o meio sólido, foi acrescido 2% de ágar à concentração final. Como forma de esterilizar o meio de cultura, este foi submetido a uma pressão de 1 atm, por 15 minutos na autoclave. O meio sólido foi vertido em placas de Petri (esterilizadas) no fluxo laminar e posteriormente incubadas em estufa a 30 °C por 24 horas, a fim de obtermos um controle de esterilidade.

Para a manutenção da cepa, após este procedimento acima citado, uma alçada da colônia das células de *Y. lipolytica* foi retirada do meio com ágar de uma placa de Petri e semeada em outra placa fazendo estrias contínuas, de três em três meses. A placa foi incubada a 30°C por 3 dias e estocada a 7°C. A manutenção era realizada periodicamente a cada 3 meses.

4.3 Acompanhamento da morfologia de *Y. lipolytica*

Células de *Y. lipolytica* foram plaqueadas em meio sólido, contendo os inibidores e/ou estimuladores da morfogênese, sendo posteriormente mantida em estufa a 30°C por 48h para fim de crescimento. Após esse procedimento a morfologia das células foi verificada através da visualização em microscopia ótica.

4.4 Cultivo de *Y. lipolytica* em meio líquido

A levedura *Y. lipolytica* foi cultivada em meio YED pH 4,5 contendo:

- AIA na concentração de 10 pM, solubilizado em água.

- Trp (precursor do AIA) na concentração de 40 µg/mL, solubilizado em água;
- PCIB (inibidor do AIA) nas concentrações de 100 µM, 10 µM, 50 nM e 10 nM, solubilizado em DMSO.
- SNP (doador de NO) nas concentrações de 100 µM, 10 µM, 10 nM e 10 pM, solubilizado em água.
- PTIO (sequestrador de NO) nas concentrações de 100 µM, 10 µM, 50 nM e 10 nM, solubilizado em etanol.
- Inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME), nas concentrações de (20, 50, 100 e 200 µM), solubilizado em água.
- Inibidor de GMP cíclico (Azul de Metileno), nas concentrações de (60, 100, e 1 mM), solubilizado em água.
- AMPc, nas concentrações de (100 µM, 10, 20 e 25 mM), solubilizado em água.
- Inibidor da MAPK (PD98059), nas concentrações (25, 50 e 100 µM), solubilizado em DMSO até 25 mg/ml
- Inibidor da PKA (SCP0064), nas concentrações de (25 e 50 µM).

Foi preparado uma pré-cultura em meio líquido a partir da placa de cultivo, em geral com pH sem ajuste (pH 6), visando prévia adaptação das células às condições citadas anteriormente, as quais foram expostas subsequentemente. Uma alíquota desta pré-cultura foi adicionada em Erlenmeyers de modo que a densidade óptica inicial da cultura correspondesse a $A_{600} = 0,01$. A proporção do volume de meio de cultura nos frascos foi de 1:5, a fim de garantir máxima aeração. O crescimento da cultura foi feito a 250 rpm, a 30°C até a saturação da mesma após 42h de cultivo. O crescimento foi acompanhado através de leituras no espectrofotômetro. Dessa forma todas as leituras no espectrofotômetro foram realizadas com feixe luminoso de $\lambda = 600$ nm, sendo que as medições nunca ultrapassa a leitura de 0,200 U. Para leituras acima desse valor foram realizadas diluições da amostra em água. Paralelamente, observações da morfologia e contagem das células foram realizadas em Câmara de Neubauer no microscópio ótico.

4.5 Dosagem de compostos indólicos produzidos por *Y. lipolytica*

As células de *Yarrowia lipolytica* foram cultivadas a 30°C no meio rico YED com 40 µg/mL de Trp e pH ajustado para 4,5. A cada duas horas uma

alíquota da cultura será centrifugada afim de coletar o sobrenadante. Foi adicionado ao sobrenadante uma solução de revelação (Salkowski: 2% de 0,5M FeCl_3 e 35% de uma solução de ácido perclórico a 50%) em uma proporção de 1:2. Adiciona-se a solução de salkovisk de 30 a 30 segundos e aguardou-se exatamente 25 minutos, à temperatura ambiente, e procedeu-se as leituras em espectrofotômetro a 535 nm obedecendo ao mesmo intervalo de tempo utilizado anteriormente. Os valores obtidos nas dosagens devem ficar, entre os valores estabelecidos na curva padrão. Para determinação da curva padrão foi utilizado concentrações crescentes de AIA diluídas em meio YED e adicionou-se a solução de salkovisk em uma proporção de 1:2. (TsavKelova *et al.*, 2007).

4.6 Isolamento de membranas celulares *Y. lipolytica*

As células foram inoculadas em meio YED com pH ajustado para 4,5 e crescidas no agitador orbital Inova 4300 (New Brunswick Scientific) em 250 rpm a 30°C até a fase logarítmica do crescimento. Ao atingirem a densidade óptica pré-determinada, as culturas de células foram submetidas a tais condições: uma condição controle, condição de estímulo com AIA e Trp (precursor da síntese de AIA), uma condição de estresse com o inibidor de AIA (PCIB) ou a combinação de inibidores/estimuladores, a 30°C sob agitação (250 rpm). Após o período de incubação as células foram transferidas para os tubos de centrifuga e coletadas. As células foram centrifugadas a 4000×g por 5 min, lavadas com água destilada e centrifugadas a 4000×g por 5 min a 4 °C. O isolamento de esferoplastos e a obtenção de membranas celulares foram realizados de acordo com a técnica descrita por Okorokov e Lehle (1998) e aperfeiçoado por Lobão, (2007). Amostras de membranas foram estocadas a -70°C para análise posterior.

4.7 Determinação do conteúdo de proteína

Para determinação da curva padrão foi utilizada uma solução de albumina de soro bovino contendo 1 mg/mL, armazenada em freezer ou congelador. Mediu-se volumes de 2 µL a 20 µL da solução de albumina, completa-se para um volume de 100 mL com água destilada, e adiciona-se 1 mL da solução de

Bradford (Bradford, 1976). Aguarda-se exatamente 10 minutos, à temperatura ambiente, e procede-se as leituras em espectrofotômetro a 595 nm. O conteúdo de proteína foi determinado utilizando entre 5 e 15 μL de suspensão de membranas, completando o volume para 100 μL com água destilada e adicionando 1 mL da solução de Bradford em intervalos de 30 em 30 segundos. Aguardou-se novamente exatos 10 minutos, à temperatura ambiente, e procedeu-se as leituras em espectrofotômetro a 595 nm obedecendo ao mesmo intervalo de tempo utilizado anteriormente. O volume de membrana utilizado pode variar de acordo com o conteúdo de proteína. Os valores obtidos nas dosagens devem ficar, preferencialmente, entre os valores médios estabelecidos na curva padrão.

4.8 Determinação do transporte de H^+

O ensaio de determinação do transporte de H^+ em membranas de levedura foi realizado seguindo o protocolo descrito por Lobão *et al.*, 2007. Registrou-se a formação do ΔpH através das membranas a partir do transporte de H^+ realizado pela P H^+ -ATPase. Para tal, utilizou-se tampão de incubação contendo KCl 20 mM, MgSO_4 2,5 mM, solução de MOPS-KOH (sacarose 12,5 %, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) em volume necessário para completar 2,0 mL de volume final, 3 μL de ACMA 1 mM (dissolvido em etanol) e suspensão de membranas com volume variando entre 20 e 90 μL , dependendo da atividade apresentada, de modo que a amplitude máxima ($F_{\text{máx}}$) não ultrapasse o valor de 50 %. Após três minutos de incubação (ou tempo necessário para estabilização da fluorescência) acrescentou-se ATP 1 mM pH 7,2, observando-se a cinética enzimática em fluorímetro, nos comprimentos de ondas de excitação 415 nm e emissão em 485 nm com abertura de 5 nm/10 nm. Após um tempo aproximado de 600 segundos (ou suficiente para atingir o equilíbrio entre efluxo e influxo de prótons), adicionou-se 0,02 M de NH_4Cl a fim de parar a reação, desfazendo o gradiente protônico estabelecido.

Para análise de P H^+ -ATPase seguiu-se o mesmo procedimento, adicionando-se 200 μM de vanadato (inibidor de P H^+ -ATPase) ao tampão de incubação. Sendo a atividade de H^+ -ATPase tipo P determinado como o componente vanadato-sensível. (= atividade total subtraída da atividade vanadato insensível).

4.9 Determinação de fosfato inorgânico (P_i).

A solução estoque de KH₂PO₄ 0,5 µmol/mL (previamente desidratado a uma temperatura entre 40 °C e 60 °C por 2 – 3 h) foi usada como padrão do conteúdo de fosfato inorgânico (P_i). Volumes entre 50 e 1000 µL dessa solução foram utilizados para determinar a curva padrão. Os volumes abaixo de 1000 µL foram completados com quantidade suficiente de água destilada para completar o volume final de 1 mL. A solução de P_i foi incubada a 30 °C durante 30 min. Após esta incubação, 2 mL da solução C (mistura de 100:1 da solução A [molibdato de amônio 0,5%; SDS 0,5%; H₂SO₄ 2%] e a solução B [Ácido ascórbico 10%], respectivamente, preparada no momento próximo a sua adição) foi adicionada, com 30 s de intervalo de um tubo de reação para outro. Cada amostra foi incubada a 30 °C por exatamente 10 min, seguida imediatamente da leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm. A solução C foi utilizada em iguais condições e proporções para a determinação de hidrólise do ATP.

4.10 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade ATPásica foi determinada pelo aumento da quantidade de fosfato inorgânico (P_i) resultante da hidrólise de ATP. O preparo dos ensaios de hidrólise de ATP foi feito sob refrigeração. Nos tubos de ensaio foram colocados 230 µL do tampão de hidrólise (sorbitol 100 mM; MOPS-KOH 30 mM; MgSO₄ 9,5 mM; molibdato de amônio 262 µM; pH 7,2); 15 µL de KCl 1 M; água destilada necessária para completar 300 µL; diferentes concentrações de KNO₃ (para concentrações finais de 0 a 200 mM); volumes da suspensão de vesículas de membranas (10 µL ou 15 µL; volumes de membranas diluídos previamente em tampão de hidrólise); 15 µL de ATP-NaOH 100 mM, pH 7,2. Em outras versões do experimento também foram utilizados outros inibidores (22 nM de concanamicina; 200 µM de vanadato). O meio de reação foi incubado a 30 °C durante 30 min. Após a incubação, o volume da reação de hidrólise foi completado para 1 mL com água destilada gelada (para parar a reação) e os tubos foram colocados no gelo novamente. Depois foram

adicionados 2 mL da solução C e o meio de reação foi incubado a 30 °C durante 10 min, seguido imediatamente da leitura da absorbância a 750 nm.

4.11 Quantificação de NO em células de *Y. lipolytica*

NO foi visualizado usando diacetato 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2 DA) por microscopia de fluorescência. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas até a fase logarítmica de crescimento (18 h). Em seguida foi adicionados 10 µM de DAF-2 DA em 10mM de tampão HEPES-BTP, pH 7,5 por 40 minutos. As células foram lavadas três vezes e analisadas microscopicamente (excitação 488nm, emissão 495-577 nm). As células sem adição de DAF-2 DA serão utilizadas como controle negativo.

4.12 Quantificação de amônia em células de *Y. lipolytica*

111A levedura foi cultivada por diferentes tempos (15, 24 e 48h) em meio líquido YED, pH inicial de 4,5. Então a cultura foi levada para o Laboratório de Física do Centro de Ciências e Tecnologias (CCT) da UENF, em colaboração com o Professor Marcelo Gomes da Silva para quantificação de amônia pelo Espectrômetro Fotoacústico acoplado com um LASER de Cascata Quântica (LCQ).

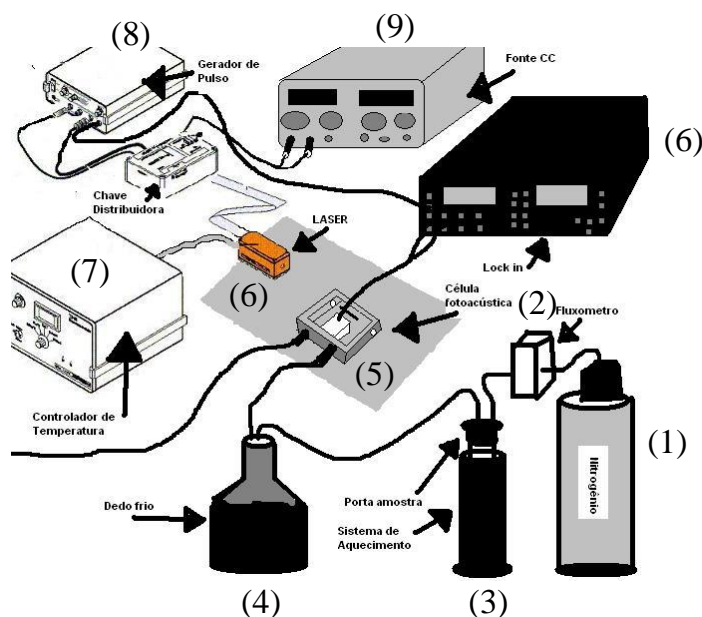


Figura 5- Montagem experimental; (1) gás de arraste (nitrogênio), (2) fluxômetro eletrônico, (3), (4) armadilha de nitrogênio líquido, (5) célula

fotoacústica (detector), (6) laser, (7) amplificador “lock-in”, (7)-(9) – eletrônica usado para o funcionamento do laser (Bueno, 2013).

Como pode ser observado na Figura 5, o nitrogênio como gás de arraste (1), a amônia emitida pelas células de *Y. lipolytica* é arrastada do porta amostra (3) até o interior do detector (célula fotoacústica (5)). Utilizando um fluxômetro eletrônico (2), Brooks Instruments, a vazão da amostra gasosa é mantida constantemente através de todo o sistema. Embora a água não absorva significativamente na faixa espectral a ser usada, 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 (Harman, 2006). A fim eliminar esse efeito, que levaria a uma medida superestimada da concentração de amônia na amostra gasosa, uma armadilha de nitrogênio líquido (4) para a retenção de água é utilizada. Como fonte de excitação eletromagnética, um laser de cascata quântica (6) (Kosterev e Tittel, 2002), Alpeslaser LCQ, será empregado e a sua emissão será sintonizada no comprimento de onda de $9,56 \text{ cm}^{-1}$, onde amônia possui uma forte absorção (Baptista-Filho *et al.*, 2006). O laser é eletronicamente modulado na frequência de ressonância da célula fotoacústica. A calibração do sistema foi realizada utilizando uma amostra padrão de 10ppmV de amônia em nitrogênio, White Martins.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito dos inibidores de AIA (TIBA e PCIB) sobre o cultivo e transição dimórfica de *Y. lipolytica*

Na presença de baixas concentrações de TIBA e PCIB (10 μ M) não foram observadas alterações no padrão de cultivo e tempo de dobra de células de *Y. lipolytica* (Figura 6 A e C). Porém, altas concentrações (100 μ M) inibiram o crescimento celular em cerca de 20%.

Quanto ao aspecto da transição dimórfica de *Y. lipolytica*, foram observadas alterações em todas as concentrações testadas para ambos os inibidores. Na concentração de 100 μ M de TIBA e PCIB foi verificados o maior efeito inibitório na morfogênese (Figura 6 B e D). Deste modo ao final do cultivo (42h) 80 % das células ainda estavam na forma de levedura. Com o mesmo tempo de incubação, células cultivadas na ausência dos inibidores apresentaram aproximadamente 40 % deste numero de levedura (Figura 6 D).

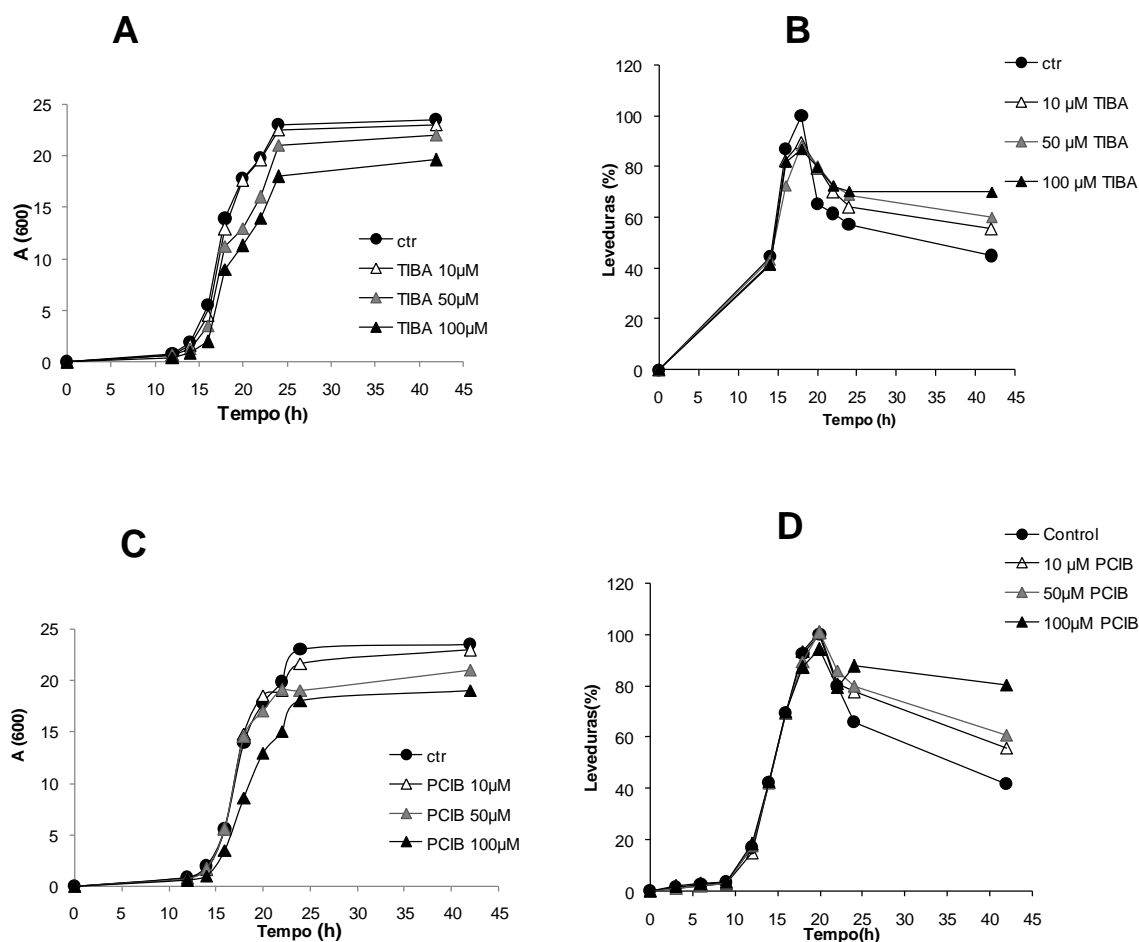


Figura 6: Efeito dos inibidores da auxina sobre o cultivo e transição dimórfica de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de TIBA (A e B) e PCIB (C e D) nas concentrações de 10 μM, 50 μM e 100 μM. O número de células na forma de levedura foi contado em cada ponto temporal e o valor máximo na cultura controle foi considerado 100%. Dados representativos de 4 experimentos

5.2 Efeito dos inibidores de AIA na morfologia das colônias de *Yarrowia lipolytica*.

Na presença de AIA as colônias de *Y. lipolytica* se apresentaram mais aglomeradas e enrugadas, indicando um maior grau de filamentação (Figura 7A). A observação no microscópio revelou um maior número de hifas quando as células foram cultivadas nessa condição que na condição controle (Figura 7B). Contrariamente, a presença de TIBA e PCIB no meio de cultivo promoveu mudanças na morfologia da colônia que passou a apresentar superfície lisa, refletindo a predominância de células de levedura e menor número de formas filamentosas (Figura 7A). As franjas coloniais tiveram aumento de

aproximadamente 2 vezes na presença de AIA (10 pM), e diminuição de 50% com inibidores de AIA (Figura 7C).

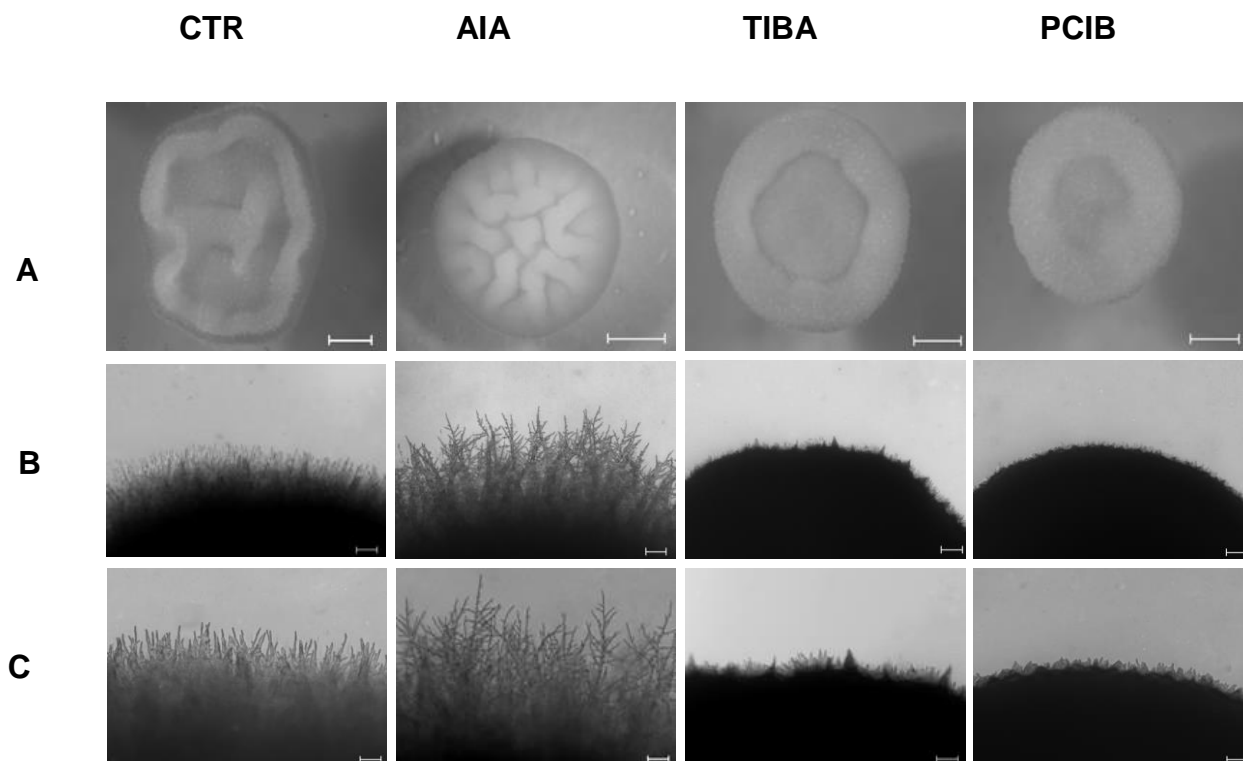


Figura 7: Efeito da auxina e seus inibidores sobre a morfologia da colônia de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 por 5 dias na ausência ou presença de 10 pM de AIA, 100 μ M de TIBA (inibidor de transporte de AIA) e 100 μ M PCIB (inibidor da via de sinalização do AIA). Após o cultivo as colônias foram visualizadas em microscopia ótica. Sob os aumentos de 10 X (A), 50 X (B) e 100 X (C). As barras correspondem em (A) 1000 μ m, (B) 200 μ m e (C) 100 μ m.

5.3 Efeito do AIA, sobre o transporte de H^+ e atividade hidrolítica de H^+ ATPase tipo P de *Y. lipolytica*

A adição de 1mM ATP às vesículas de membranas isoladas de células resultou em um decaimento da fluorescência da sonda fluorescente ACMA, indicando que houve transporte de H^+ ATP-dependente. Esse transporte foi sensível ao vanadato, um inibidor específico de ATPases do tipo P (dados não mostrados).

As células cultivadas na presença de AIA ou Trp dobraram o bombeamento de

H⁺ isso sugere um estímulo de ATPase tipo P tanto por AIA como por Trp. Notavelmente, as membranas isoladas das células cultivadas na presença de PCIB reduziram pela metade o transporte de H⁺ indicando que na presença do inibidor de auxina, além da inibição da morfogênese, ocorre também a inibição do transporte de H⁺ mediado pela H⁺-ATPase (Figura 8 A).

Para saber se a enzima está funcionando de forma acoplada, verificamos a atividade hidrolítica de ATP de tais enzimas.

Observamos que membranas de células cultivadas na presença de AIA ou Trp exibiram um aumento de 2 vezes na hidrólise de ATP vanadato-sensível. Enquanto as células cultivadas na presença de PCIB tiveram um decréscimo de 1,5 vezes na hidrólise do ATP (Figura 8 B). Desse modo, ocorre regulação semelhante tanto do transporte de H⁺ como de atividades ATPásica indicando que H⁺-ATPase atua de forma acoplada em células de *Y. lipolytica*.

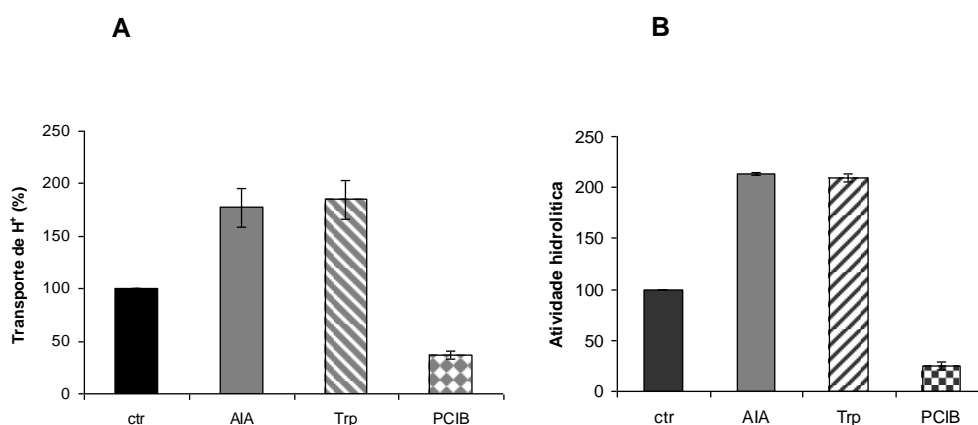


Figura 8. Efeito do AIA, sobre o transporte de H⁺ e atividade hidrolítica de H⁺ ATPase tipo P de *Y. lipolytica*. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de 10pM AIA, 40 µg/mL de Trp e 100 µM de PCIB. Membranas totais foram isoladas de células das *Y. lipolytica* para a determinação da translocação de H⁺ sensível a vanadato e dependente de ATP e atividade hidrolítica de ATP sensível a vanadato. Os resultados representam uma média de três experimentos ±SE

5.4 Detecção de NO em células de *Y. lipolytica*

Os dados anteriores sugerem fortemente que a sinalização por NO é essencial para a morfogênese. Desse modo prosseguimos para a identificação de NO nas células de *Y. lipolytica*. Para tanto, após 24 h de cultivo, incubamos

a cultura com uma sonda marcadora de NO (DAF-2 DA) na presença e ausência do doador e sequestrador de NO.

Através de microscopia, observamos que as células cultivadas na presença de SNP, exibiram uma maior fluorescência, indicando maior presença de NO quando comparado ao controle, sem adição de SNP ou PTIO (Figura 14A e B). De forma contrária, o cultivo na presença de PTIO atenuou a fluorescência, em decorrência da diminuição de NO nas células (Figura 14A e C).

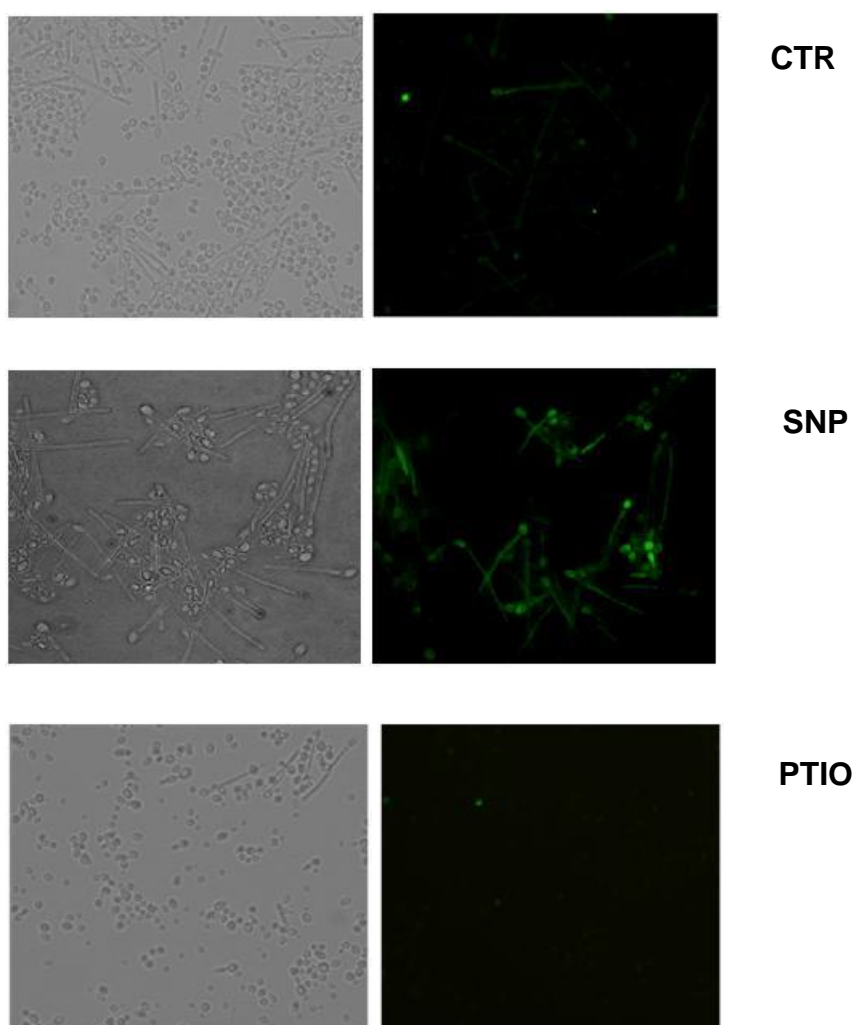


Figura 9: Detecção de NO em células de *Y. lipolytica*. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 por 24 h na ausência ou presença de 10 pM de SNP e PTIO. Após o cultivo as células foram incubadas com DAF-2 DA e visualizadas em microscópio de fluorescência, em um aumento de 400X.

5.5 Efeito do doador de óxido nítrico (SNP) sobre o cultivo e transição dimórfica de *Y. lipolytica*.

A adição de SNP não afetou nenhuma das fases de crescimento de *Y. lipolytica*.

Verificou-se que na presença de SNP houve maior filamentação em comparação com a cultura controle, sem SNP. Observou-se que o número de células em forma de levedura atingiu seu número máximo em 20h de cultivo em todas as culturas. A partir desse ponto houve uma diminuição do número de células em forma de levedura, refletindo o aparecimento de hifas, verificando o acontecimento/ocorrência da transição levedura-hifa. As células de *Y. lipolytica* expostas às baixas concentrações de SNP (10 nM) exibiram um aumento de formas filamentosas em comparação com a cultura controle.

No entanto constatou-se também que aumentando as concentrações de SNP no meio de cultivo resultou em uma redução do crescimento celular, sendo que as concentrações de 50 μ M e 100 μ M inibiram o crescimento celular em até aproximadamente 40 e 45% respectivamente (Figura 10 A). É notável também que quanto menor a concentração de SNP adicionada ao meio de cultura, mais acentuada foi a transição de levedura para micélio (Figura 10 B) sugerindo que SNP tem efeito dose dependente sobre o dimorfismo celular. Além disso, em altas concentrações de SNP na transição dimórfica levedura-hifa ocorreu mais lentamente, apenas depois de 36 h de cultivo (Figura 10 C).

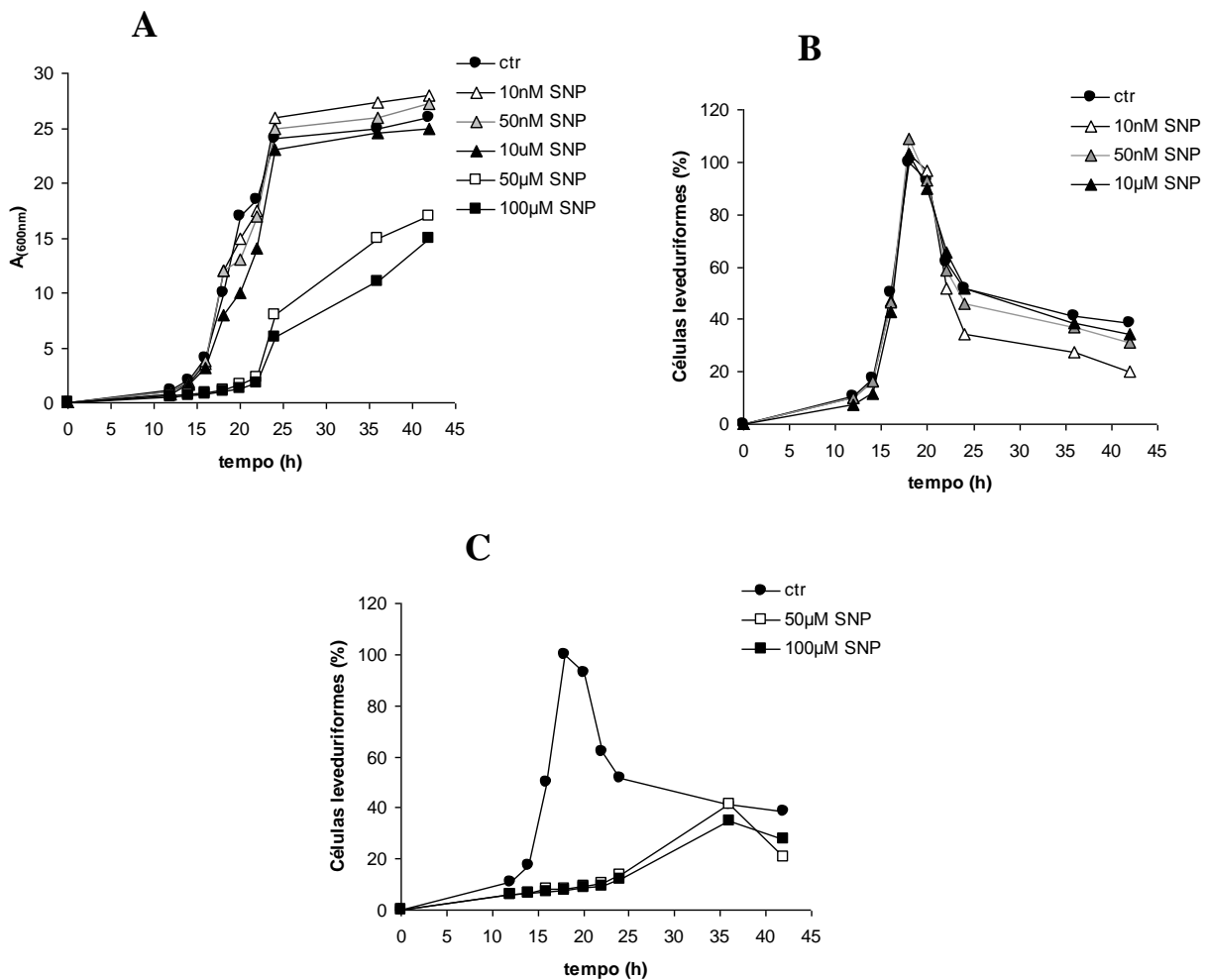


Figura 10: Efeito do doador de óxido nítrico (SNP) sobre o cultivo e transição dimórfica de *Y. lipolytica*. Ascélulas de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de (A) 10 nM, 50 nM, 10 μM, 50 μM e 100 μM de SNP. (B) e (C) O número de células na forma de levedura foi contado em cada ponto temporal e o valor máximo na cultura controle foi considerado 100%. Os resultados representam uma média de três experimentos.

5.6 Efeito do bloqueador de óxido nítrico (PTIO) sobre a transição dimórfica de *Y. lipolytica*.

Após verificado que o SNP estimulou a transição dimórfica em baixas concentrações (10 nM) e que altas concentrações (50 μM e 100 μM) foram capazes de inibir o cultivo de *Y. lipolytica*, analisamos se o bloqueador de óxido nítrico (PTIO) seria capaz de antagonizar o efeito de SNP sobre a transição dimórfica.

A morfologia celular foi observada por microscopia ótica, na qual foi possível analisar que a transição levedura-hifa ocorreu na cultura controle após 20 h. Após esse período houve um rápido declínio no número de células em forma de leveduras, refletindo a aparição de formas filamentosas compostas de

pseudo-hifas e hifas (Figura 11 A). A cultura de *Y. lipolytica* exposta a 50 e 100 μM de PTIO exibiu uma diminuição significativa de formas filamentosas em comparação com a cultura controle, sem adição de PTIO (Figura 11 A). É importante ressaltar que nesta mesma condição não foi possível observar a formação de hifas verdadeiras, pois a maior parte das células da cultura encontrava-se na forma de levedura e algumas pseudo-hifas também foram verificadas. No entanto a adição de SNP juntamente com PTIO não foi capaz de reverter tal efeito inibidor da transição morfogênica ocasionada pelo sequestrador de NO (Figura 11C).

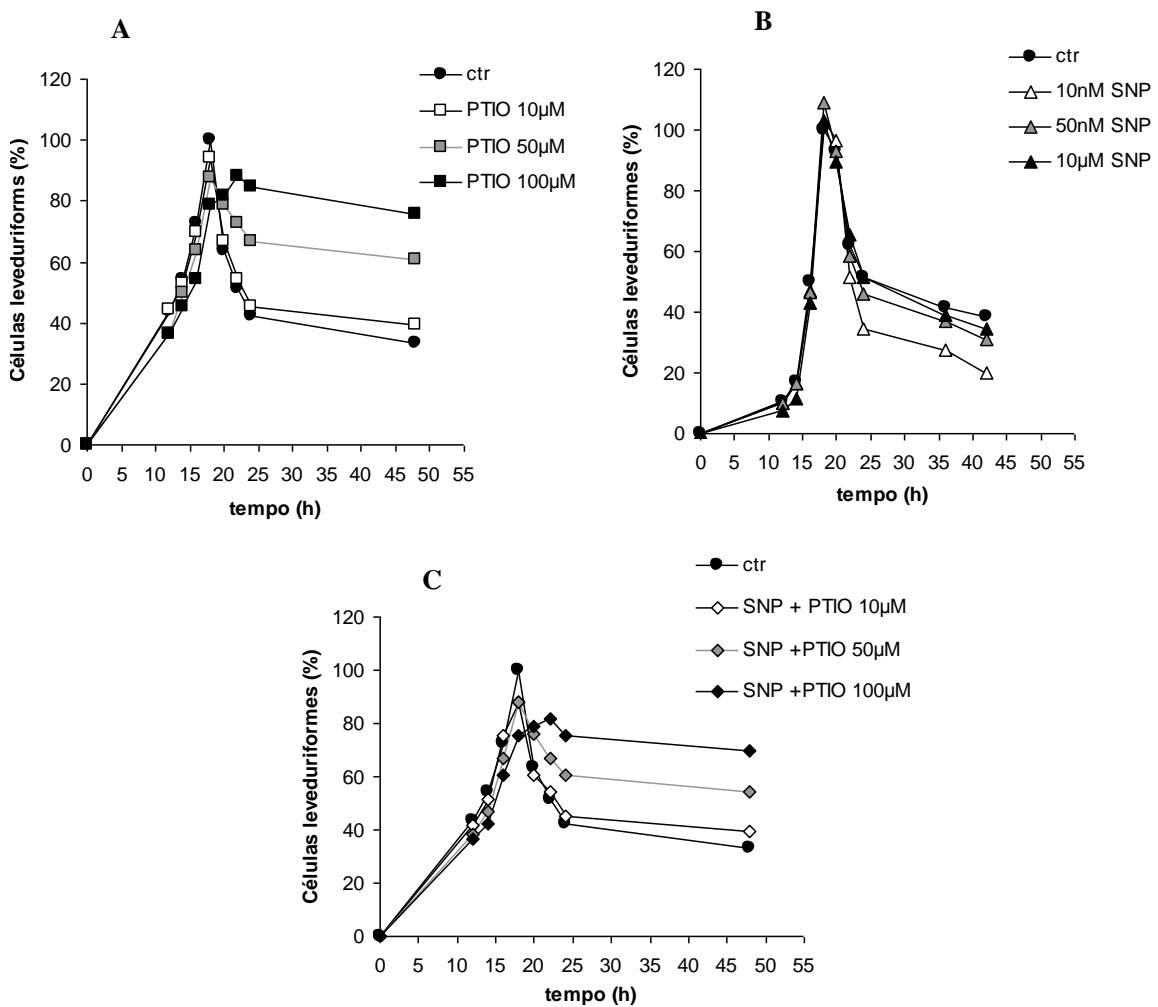


Figura 11. Efeito do bloqueador de óxido nítrico (PTIO) sobre a transição dimórfica de *Y. lipolytica*. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de (A) 10 μM , 50 μM , 100 μM de PTIO. (B) 10 nM, 50 nM e 10 μM de SNP ou a combinação de (C) (10 nM SNP + 10 μM PTIO), (10 nM SNP + 50 μM PTIO), (10 nM SNP + 10 μM PTIO). O número de células na forma de levedura foi determinado em cada ponto temporal e o valor máximo na cultura controle foi considerado 100%. Os resultados representam uma média de três experimentos

5.7 Efeito do NO sobre o transporte de H⁺ e atividade hidrolítica de H⁺ ATPase tipo P de *Y. lipolytica*.

Após a observação que o doador de NO, SNP, estimulou a morfogênese de *Y. lipolytica* em baixas concentrações, enquanto que o seqüestrador de NO, PTIO, foi capaz de bloquear o dimorfismo; analisamos o efeito desses moduladores sobre a atividade de H⁺-ATPases tipo P de membrana plasmática.

A adição de 1 mM de ATP às vesículas de membranas isoladas de células promoveu um decaimento da fluorescência do ACMA, indicando que houve transporte de H⁺ ATP dependente. Células cultivadas na presença de SNP exibiram um aumento de 2,5 vezes no bombeamento de H⁺ por ATPase tipo P. Enquanto as células cultivadas na presença de PTIO tiveram um decréscimo de 1,5 vezes no transporte de H⁺. Notavelmente, a adição de SNP nas culturas que continham PTIO foi capaz de restaurar o transporte de H⁺ (Figura 11 A). Na Figura 11 B, pode – se observar que as células cultivadas na presença de SNP exibiram um aumento de 100 % na hidrólise de ATP (2 vezes) por ATPase tipo P. Já as células cultivadas na presença de PTIO tiveram uma decréscimo próximo de 50% no transporte de H⁺ e também na hidrólise do ATP.

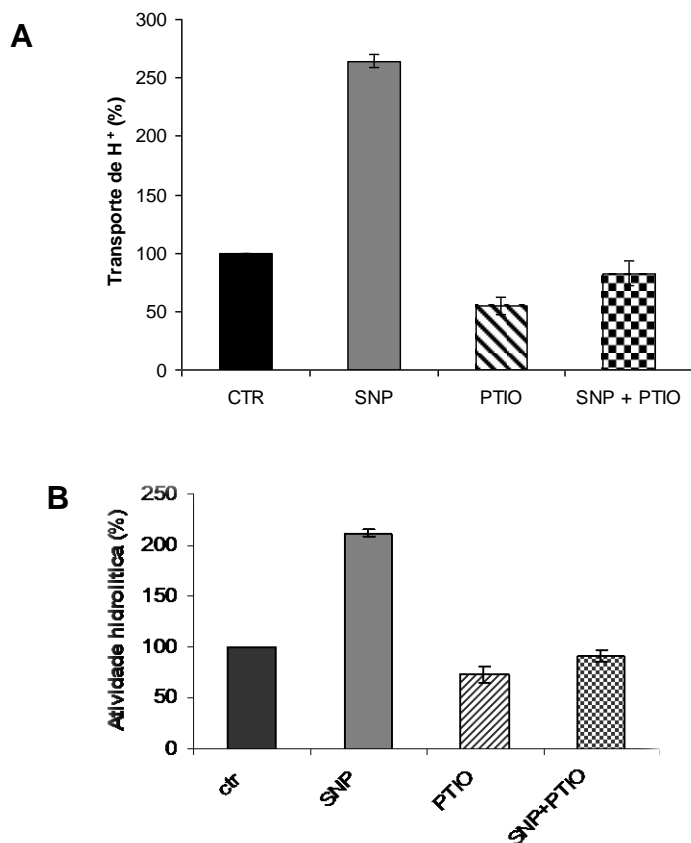


Figura 12. Efeito do NO sobre o transporte de H⁺ e atividade hidrolítica de H⁺ ATPase tipo P de *Y. lipolytica*. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de 10 nM de SNP, 100 μM de PTIO e 100 μM de PCIB + 10 nM de SNP. Membranas totais foram isoladas de células das *Y. lipolytica* para a determinação da translocação de H⁺ e determinação da atividade hidrolítica de ATP sensível a vanadato e dependente de ATP. Os resultados representam uma média de três experimentos.

5.8 Efeito do inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME) sobre a transição dimórfica de *Y. lipolytica*

Apesar de não haver alteração no crescimento celular na presença de L-NAME, foi observada alteração no dimorfismo da levedura. A morfologia das células foi observada por microscopia ótica, sendo possível analisar que a transição levedura-hifa ocorreu de forma mais acentuada na cultura controle e na presença de 20 μM de L-NAME em comparação com as células cultivadas nas concentrações mais elevadas, (Figura 13 A e B). Observou-se que o número de células em forma de levedura atingiu seu pico em 20h de cultivo em

todas as culturas. A partir desse ponto houve uma diminuição do número de células em forma de levedura, refletindo o aparecimento de hifas. As células de *Y. lipolytica* expostas à altas concentrações de L-NAME (200µM) exibiram uma diminuição de aproximadamente 30% nas formas filamentosas em comparação com a cultura controle.

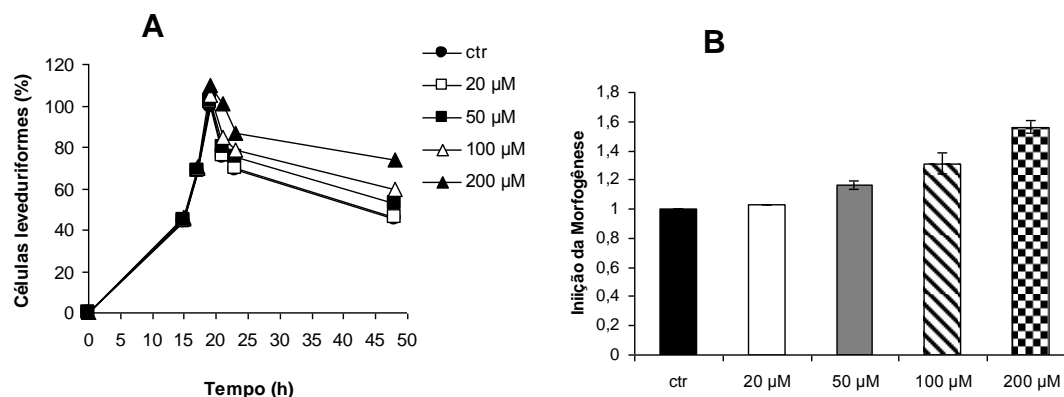


Figura 13: Efeito do inibidor da NO Sintase (L-NAME) sobre a transição dimórfica de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de 20 µM, 50 µM e 100 µM e 200 µM de L-NAME. (A) O número de células na forma de levedura foi contado em cada ponto temporal e o valor máximo na cultura controle foi considerado 100%. (B) Inibição da morfogênese dose-dependente causada pelo L-NAME. Os resultados representam uma média de três experimentos ±SE.

5.9 Efeito do inibidor de GMP cíclico sobre a transição dimórfica de *Y. lipolytica*

Como o GMP cíclico (cGMP) é um sinalizador atuante na via do NO neste ensaio foi utilizado o azul de metileno conhecido por inibir a guanilato ciclase e assim diminuir os níveis intracelulares de cGMP. Para verificar o efeito da sinalização do cGMP em *Y. lipolytica* cultivamos as células dessa levedura na presença de diferentes concentrações (60 µM, 100 µM, 300 µM e 1mM) de azul de metileno.

A morfologia celular foi observada por microscopia ótica, na qual foi possível analisar que a morfogênese ocorreu na cultura controle, sem adição de azul de metileno após 20 h (Figura 14 A). A cultura de *Y. lipolytica* exposta a

100 μ M e 1mM de azul de metileno exibiu uma diminuição significativa de hifas em comparação com a cultura controle (Figura 14 A e B). É importante ressaltar que nesta mesma condição não foi possível observar a formação de hifas verdadeiras. A maior parte das células da cultura encontrava-se na forma de levedura e algumas pseudo-hifas também foram verificadas.

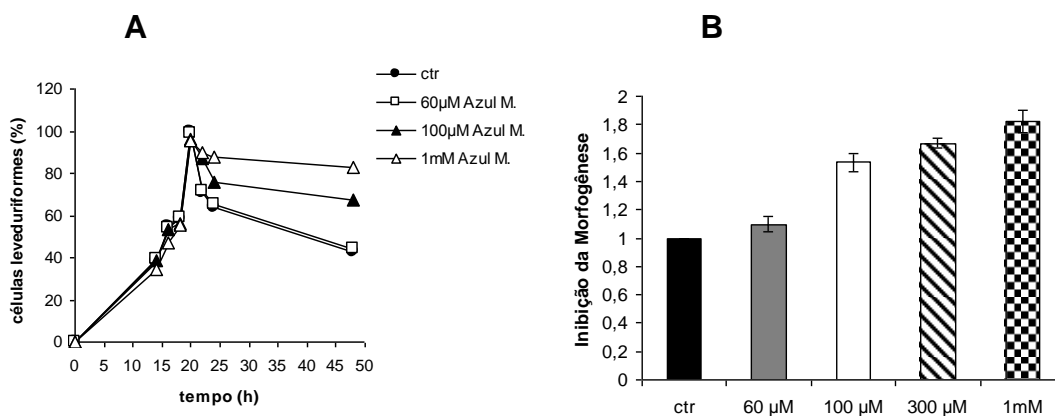


Figura 14: Efeito do inibidor de GMP cíclico (azul de metileno) sobre a transição dimórfica de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de 60 μ M, 100 μ M, 300 μ M e 1 mM de azul de metileno. (A) O número de células na forma de levedura foi contado em cada ponto temporal e o valor máximo na cultura controle foi considerado 100%. (B) Inibição da morfogênese dose-dependente causada pelo inibidor de GMP cíclico. Estes resultados representam uma média de três experimentos \pm SE.

5.10 Efeito da via de sinalização desencadeada pela MAPK na morfogênese de *Y. lipolytica*

Verificamos que no final do cultivo na concentração de 100 μ M a totalidade das células ainda estava com morfologia leveduriforme, indicando que o inibidor da MAPK interfere com a filamentação (Figura 15 A e B) Deste modo, observamos que as vias das MAPKs são de grande importância para a morfogênese de *Y. lipolytica*.

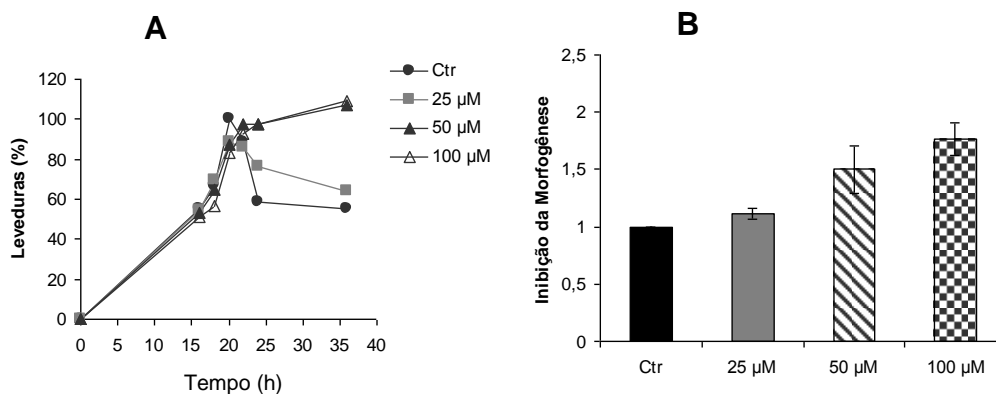


Figura 15: Efeito da via de sinalização da MAPK na morfogênese de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M do inibidor da MAPK. (A) O número de células na forma de levedura foi contado em cada ponto temporal e o valor máximo na cultura controle foi considerado 100%. (B) Inibição da morfogênese ocasionada pelo inibidor da MAPK. Estes resultados representam uma média de três experimentos \pm SE.

5.11 Análise da relação das vias da auxina e a via da MAPK com NO na morfogênese de *Y. lipolytica*

As células cultivadas na presença de AIA e SNP, como observado anteriormente estimularam a morfogênese em *Y. lipolytica*. Foi observado nestas condições, hifas maiores e mais ramificadas em comparação com a cultura controle, sem adição de AIA e SNP, .em contrapartida a adição de altas concentrações do inibidor de MAPK (100 μ M) foram eficientes em bloquear a filamentoação, onde no final do cultivo totalidade das células ainda estavam na forma de levedura. As células cultivadas na presença de AIA + Inibidor de MAPK e SNP + Inibidor da MAPK não formaram as hifas. Portanto, a adição de auxina ou SNP nas culturas que continham o inibidor da MAPK, não foi capaz de reverter o efeito inibitório da morfogênese causada pelo inibidor da MAPK (Figura 16).

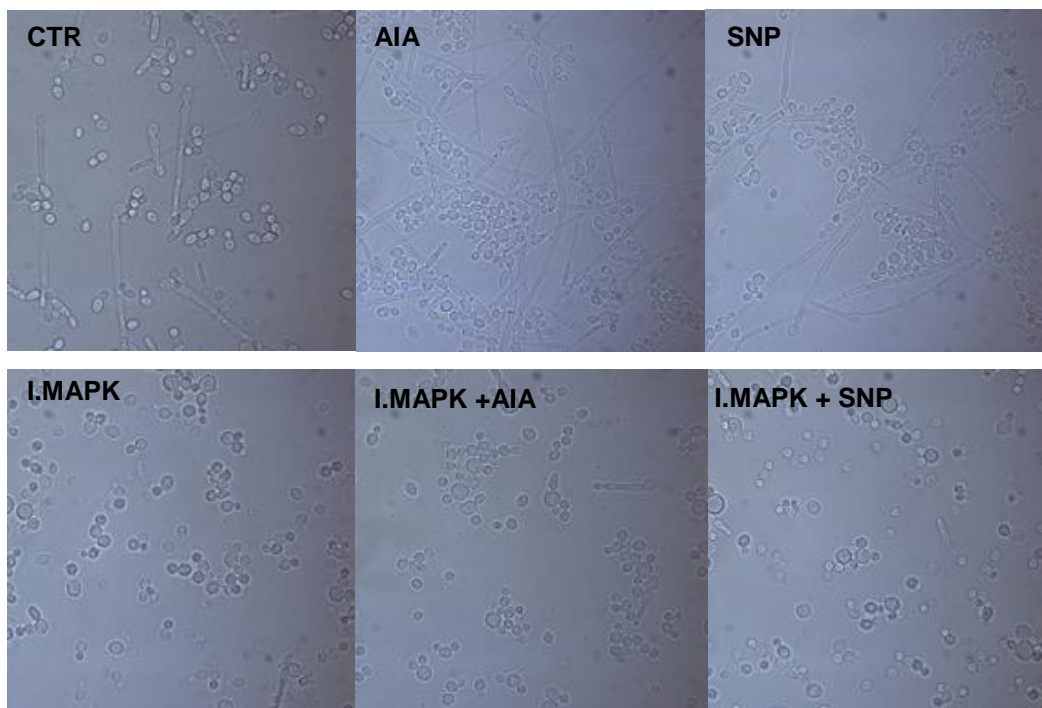


Figura 16: Análise da relação de AIA, NO e MAPK na morfogênese de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença 10 pM de AIA, 10 nM de SNP, 100 µM do inibidor da MAPK e a combinação de AIA+ Inibidor de MAPK e SNP + Inibidor de MAPK por 36h. Após esse período as células foram visualizadas em microscópio ótico. As imagens representam 4 experimentos realizados. Aumento de 400X.

5.12 Efeito da via de sinalização desencadeada pela MAPK sobre a atividade de H⁺-ATPase tipo P de *Y. lipolytica*

Após verificarmos que a via desencadeada pela MAPK é crucial para o dimorfismo de *Y. lipolytica*, analisamos se essa mesma via interfere com o transporte de H⁺, e atividade hidrolítica, tendo em vista que a sinalização protônica é possivelmente requerida para promoção do crescimento celular polarizado. Com esse objetivo cultivamos as células de *Y. lipolytica* na ausência ou presença de 10 pM de AIA, 100 µM do Inibidor da MAPK e a combinação do inibidor da MAPK + AIA e avaliamos a atividade de H⁺-ATPase.

O AIA estimulou aproximadamente 2 vezes o transporte de H⁺, como já visto anteriormente. Enquanto isso a presença do inibidor da MAPK diminuiu aproximadamente em 0,8 vezes a atividade de H⁺-ATPases. Quando as células foram cultivadas na presença do inibidor da MAPK conjuntamente com

AIA, verificamos uma pequena reversão do bloqueio causado pelo inibidor da MAPK. É importante ressaltar que esse efeito negativo do inibidor da MAPK foi revertido parcialmente por AIA, sugerindo novamente um forte estímulo da H⁺-ATPase por esta auxina em células de *Y. lipolytica* (Figura 17A). Observamos que a atividade hidrolítica das H⁺-ATPases foi estimulada pelo AIA, enquanto o inibidor da MAPK foi capaz de reduzir a hidrólise de ATP de forma semelhante ao que ocorreu no transporte de H⁺ (Figura 17 B).

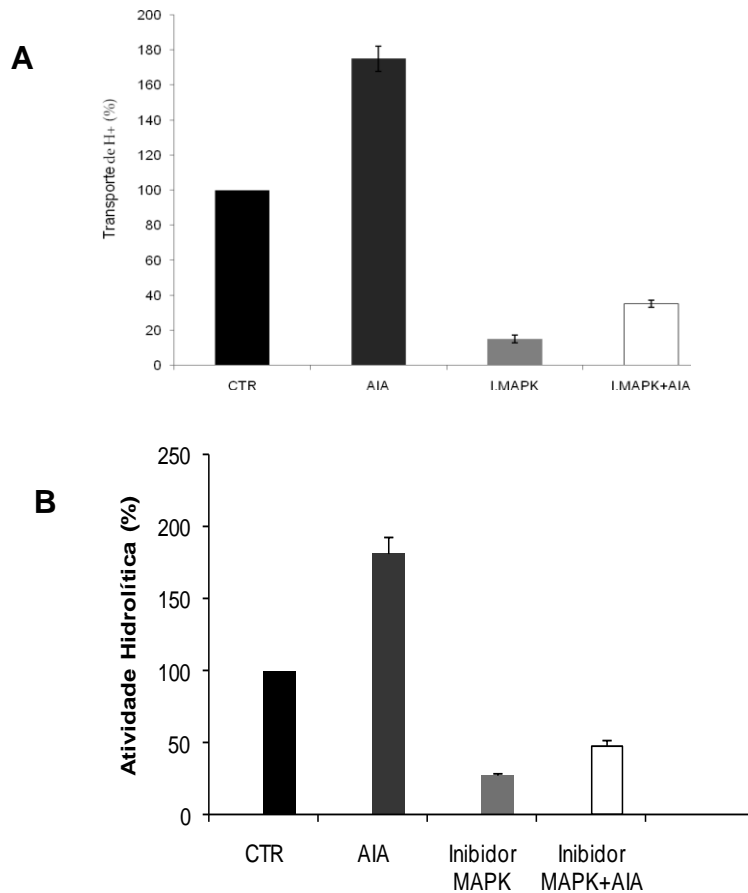


Figura 17. Efeito da via de sinalização desencadeada pela MAPK sobre a atividade de H⁺-ATPase tipo P de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de 10 μM de AIA, 100 μM do inibidor da MAPK ou 100 μM do inibidor de MAPK + 10 pM de AIA. As membranas totais foram isoladas de células de *Y. lipolytica* para a determinação da translocação de H⁺ e atividade hidrolítica sensível a vanadato e dependente de ATP.

5.13 Efeito do AMP cíclico na morfogênese de *Y. lipolytica*

A morfologia celular foi observada por microscopia ótica, na qual foi possível analisar que a transição levedura – hifa ocorreu na cultura controle após 20 h. Após esse tempo (20h) houve um rápido declínio no número de células em forma de leveduras, refletindo a aparição de formas filamentosas compostas de pseudo-hifas e hifas. A cultura de *Y. lipolytica* exposta ao cAMP exibiu um aumento de formas filamentosas em comparação com a cultura controle, na ausência de cAMP (Figura 18).

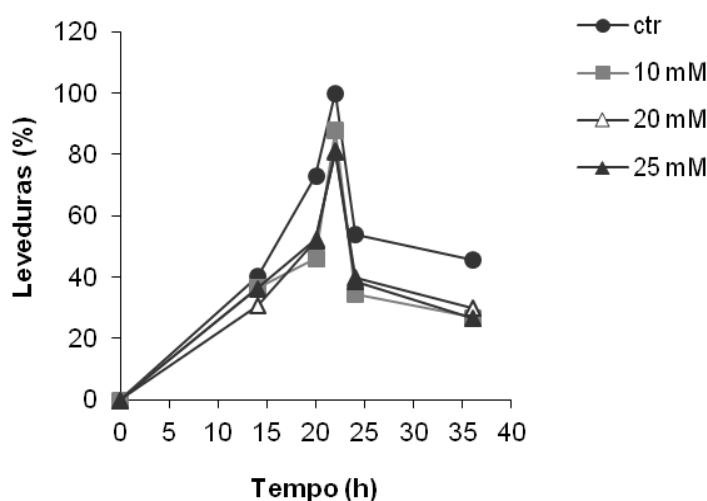


Figura 18. Efeito do AMP cíclico na morfogênese de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de 10 mM, 20 mM e 25 mM de cAMP. O número de células na forma de levedura foi contado em cada ponto temporal e o valor máximo na cultura controle foi considerado 100%. Estes resultados representam uma média de três experimentos.

5.14 Efeito da via da PKA sobre a morfologia de *Y. lipolytica*.

Para verificar o envolvimento da via da PKA na transição dimórfica de *Y. lipolytica*, nós cultivamos as células na presença de diferentes concentrações de AMP cíclico (cAMP, 100 μ M e 20mM) por 36h. Após o cultivo uma alíquota de 10 μ L foi retirada para visualização em microscopia ótica.

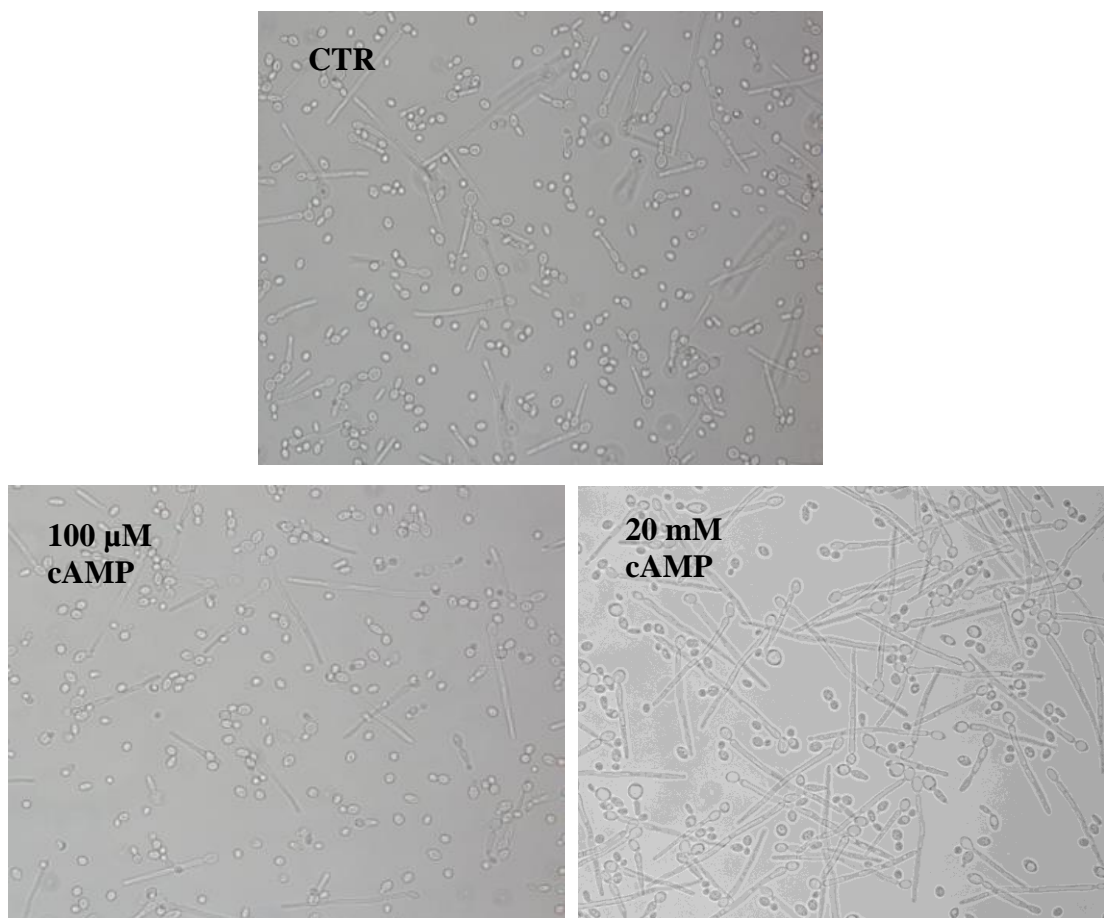


Figura 19: Efeito da via da PKA sobre a morfologia de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 por 36 h na ausência ou presença de 100 μ M e 20 mM de cAMP. Após o cultivo as células foram visualizadas em microscopia ótica, aumento de 400X.

5.15 Efeito do inibidor da PKA sobre a transição dimórfica em *Y. lipolytica*.

Tanto a concentração de 50 μM quanto a concentração de 25 μM foram eficientes em bloquear a formação de hifas, evidenciando fortemente o requerimento da via PKA na filamentação (Figura 20).

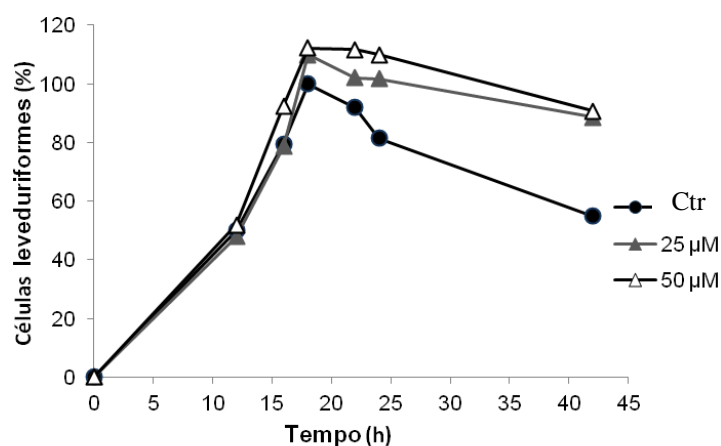


Figura 20: Efeito do inibidor da PKA na morfogênese de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de, 25 μM e 50 μM de inibidor da PKA. O número de células na forma de levedura foi contado em cada ponto temporal e o valor máximo na cultura controle foi considerado 100%. Estes resultados representam uma média de três experimentos.

5.16 AMP cíclico reverte o efeito bloqueador da morfogênese causado pelo inibidor da MAPK.

A adição de cAMP na cultura foi eficiente em reverter o efeito bloqueador do dimorfismo causado pelo inibidor da MAPK

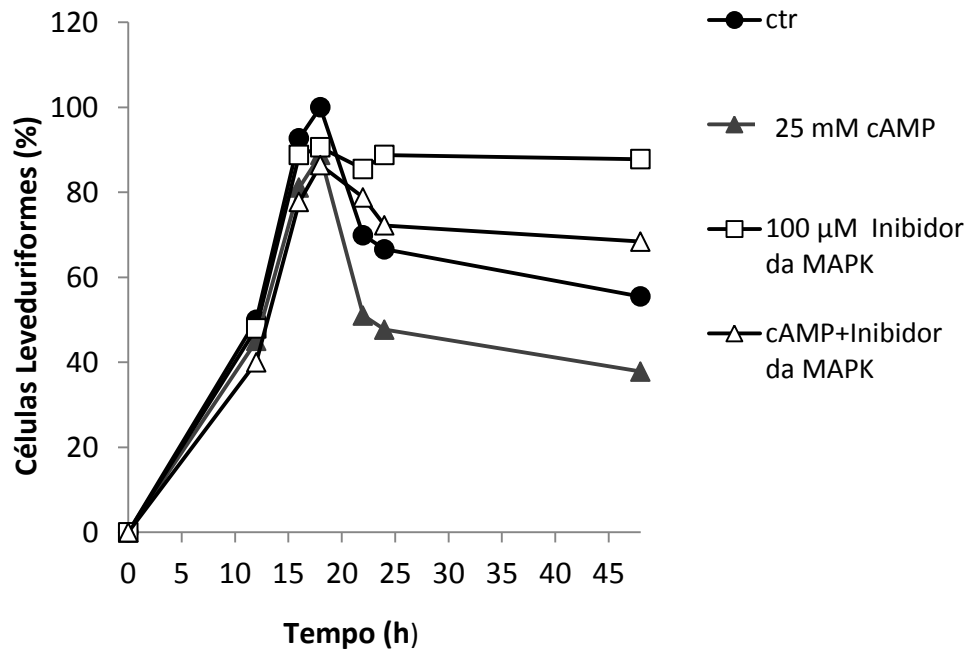


Figura 21: Efeito das vias da PKA e MAPK sobre a morfogênese de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED, pH 4,5 na ausência ou presença de, 25 μM de cAMP, 100 μM do inibidor da MAPK e cAMP conjuntamente com o inibidor da MAPK. O número de células na forma de levedura foi contado em cada ponto temporal e o valor máximo na cultura controle foi considerado 100%.

5.17 Efeito pH ambiental sobre a morfogênese de *Y. lipolytica*

Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio sólido contendo PBC na ausência ou presença de alguns estimuladores (AIA e Trp) e bloqueadores (PCIB). A área em torno das colônias (pH ambiental) crescidas na presença de AIA e Trp apresentou a coloração indicativa de pH mais alcalino em comparação a placa controle. Já as células cultivadas na presença de PCIB tiveram uma menor alcalinização do meio mediada por células de *Y. lipolytica* (Figura 22 A, B, C,D e E).

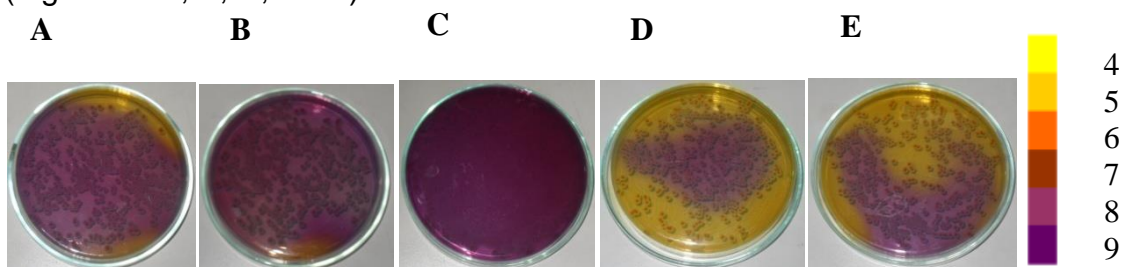


Figura 22. Efeito dos estimuladores e inibidores da morfogênese de *Y. lipolytica* no pH do meio sólido. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED sólido, contendo o

indicador de pH, púrpura de bromocresol, na (A) ausência ou presença de (B) Trp, (C) AIA, (D) PCIB ou a (E) combinação de AIA + PCIB por 48h. O pH inicial do meio foi ajustado para 4,5. Conforme o crescimento das colônias a coloração do meio controle era modificada de amarelo até o roxo.

5.18 Quantificação de amônia secretada por células de *Y. lipolytica*

As culturas que possuíam mais células na forma de levedura após 15 h de crescimento apresentavam uma menor liberação de amônia em comparação com a cultura que apresentava uma mistura de células na forma de pseudohifas e hifas com 24h de crescimento. Constatamos ainda que a secreção de amônia por células de *Y. lipolytica* aumentava conforme o envelhecimento da cultura e concomitantemente ao aumento das formas filamentosas (48h de cultivo).

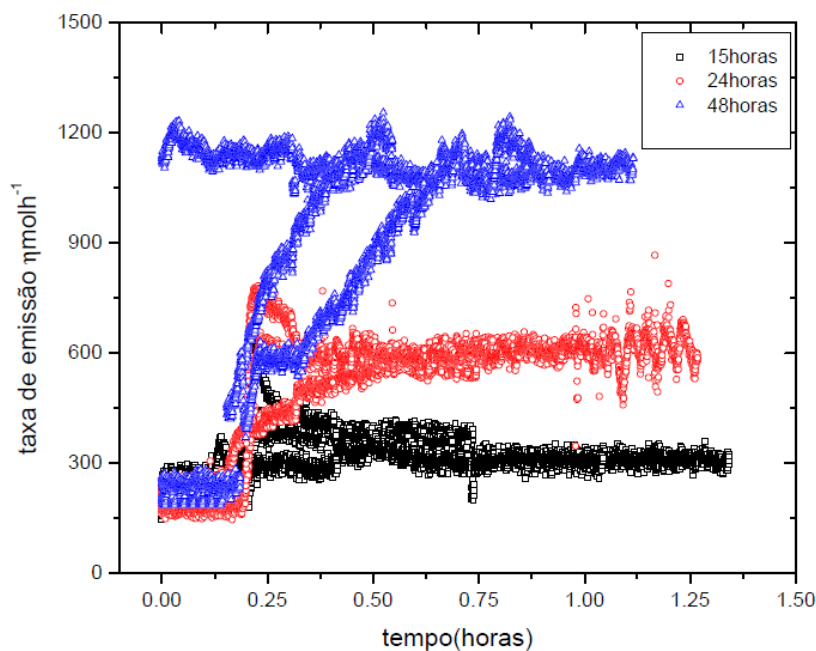


Figura 23: Quantificação de amônia secretada por células de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio YED líquido, pH 4,5 por até 48h. Após o cultivo foi feito a dosagem de amônia liberada pelas culturas de *Y. lipolytica* no aparelho Laser de Cascata Quântica.

6. DISCUSSÃO

A capacidade de mudança na morfologia entre levedura, pseudohifa e hifa é comumente considerada necessária para virulência de muitos fungos patógenos.(Pan *et al.*, 2000, Braun *et al.*, 2001, Woods, 2005). Entretanto os fatores considerados mais bem sucedidos para o desenvolvimento dessa virulência ainda permanecem incertos.

A transição levedura-hifa é influenciada por vários fatores. Entre esses fatores, pode-se incluir mudanças de temperatura, pH, gases atmosféricos de crescimento, ou a presença de componentes específicos no meio de cultura (Szaniszlo,1985; Perez-Campos e Dominguez , 2001).

Por ser um fungo dimórfico e não patogênico, *Y. lipolytica* é um excelente modelo alternativo tanto para estudo de fatores de patogenicidade e virulência como de morfogênese. Neste trabalho foi estudada a existência de uma via de controle da transição levedura-hifa em *Y. lipolytica* baseada na cascata de sinalização da auxina, tendo o NO como possível mediador.

Dados anteriores do nosso grupo (Dutra, 2008 e 2010) indicam a existência de uma via de controle da transição morfogênica dependente de AIA. Observou-se que concentrações baixas de AIA (10 pM) foram as mais eficientes em estimular a formação de micélio, enquanto que concentrações altas (100 µM) mostraram-se inibitórias para o crescimento celular e dimorfismo de *Y. lipolytica* (Dutra, 2008 e 2010). Portanto após verificado que a sinalização de AIA estimulou a transição dimórfica, agora nós analisamos a influência dos inibidores de AIA, TIBA e PCIB sobre o cultivo e a morfogênese de *Y. lipolytica*.

Em plantas tem se verificado que o TIBA age como inibidor de efluxo de AIA bloqueando o transporte polar de AIA nos tecidos (Niedergang-Kamien e, Leopold,1957, Agarwal *et a.,* 2006). Já o PCIB é capaz de inibir muitos processos fisiológicos auxina-induzidos impedir a ação do hormônio, competindo com o seu sítio de ligação no receptor e alterando diretamente sua via de sinalização, por afetar a estabilidade de proteínas Aux/IAA (Oono *et al.*, 2003). Dessa forma esses inibidores de AIA podem interferir em muitos processos de crescimento e desenvolvimento em plantas (MacRae e Bonner, 1953). Alguns efeitos causados pelo PCIB, assim como inibição do desenvolvimento de raízes laterais, baixa resposta gravitrópica e inibição do

crescimento radicular também podem ser causados pelo inibidor de efluxo de AIA, TIBA (Casimiro *et al.*, 2001, Rahman *et al.*, 2002).

Zandonadi (2007) analisando o efeito desses inibidores (TIBA e PCIB) sobre plântulas de milho observou que ambos mostraram-se eficientes em inibir o crescimento radicular. Ao verificar a ação destes inibidores sobre o dimorfismo de *Y. lipolytica*, constatamos que altas concentrações (100 µM) inibiram o crescimento celular em aproximadamente 20 % e mostraram-se capazes de inibir a morfogênese, uma vez que ao final do cultivo quase totalidade das células ainda apresentavam-se na forma de leveduras. Diversos trabalhos afirmam que baixas concentrações de TIBA e PCIB são capazes de causar um efeito inibitório em plantas (Taryone, 2002; Kulka, 2008., Zandonadi, 2007), entretanto em *Y. lipolytica* pudemos constatar que somente altas concentrações foram capazes de causar tal efeito.

Para complementar os dados referentes à regulação do AIA na morfogênese de *Y. lipolytica*, nós verificamos o efeito dos moduladores desta rota na morfologia colonial desta levedura. A observação das bordas das colônias de *Y. lipolytica* revelaram importantes diferenças no aspecto e arquitetura das colônias. As células cultivadas na presença de AIA apresentavam aspecto rugoso bem evidente, enquanto as células cultivadas na presença dos inibidores de AIA, TIBA e PCIB, a rugosidade era menos proeminente. Além disso, as colônias crescidas na presença de AIA, também foram observadas longas franjas filamentosas na borda das colônias, provavelmente mais eficazes na invasão e adesão ao meio sólido. Tais alterações fenotípicas são naturais e relacionadas à variabilidade de uma população apta a colonizar diferentes condições ambientais (Furlaneto *et al.*, 2012). Observamos com esses resultados que na presença de AIA as colônias de *Y. lipolytica* se apresentaram mais aglomeradas (enrugadas) e com maiores franjas na borda da colônia, indicando maior grau de filamentação. Já a presença de TIBA e PCIB no meio de cultivo fez com que a colônia ficasse com aparência mais lisa, mostrando um menor número de formas filamentosas. Isto confirma a importância da cascata da auxina na manutenção do crescimento hifal e na morfogênese de *Y. lipolytica*.

Segundo Rayle e Cleland (1972), a expansão da célula pode ser induzida pela ação das auxinas. Acredita-se que as auxinas aumentam a taxa

de extrusão de H^+ pela estimulação de H^+ -ATPases preexistentes na membrana plasmática e/ou síntese de novas H^+ -ATPases. Então, com a acidificação do apoplasto provocada pelo aumento da atividade de H^+ -ATPases, ocorreria a ativação de enzimas específicas, que aumentariam a plasticidade da parede celular, necessário para a expansão da célula (Cleland, 1995).

Apesar de ser utilizada como modelo nos estudos biotecnológicos e ambientais, pouco se conhece a cerca da bioenergética de *Y. lipolytica*. Neste trabalho fornecemos fortes evidências bioquímicas da importância das bombas de H^+ de membrana plasmática (tipo P) na morfogênese desta levedura. Ao monitoramos o transporte de H^+ e atividades hidrolíticas das H^+ -ATPases tipo P, na presença e ausência de AIA, Trp e PCIB, verificamos que o tratamento com AIA e seu precursor, Trp, causou uma estimulação de aproximadamente 50% no transporte de H^+ . Enquanto o inibidor de AIA, PCIB, causou uma diminuição na atividade dessa enzima também de 50%. O mesmo foi observado para os dados de atividade hidrolítica, mostrando que o AIA e o Trp estimulam a hidrólise de ATP, de forma semelhante ao transporte de H^+ e que o PCIB foi capaz de causar uma diminuição da atividade hidrolítica, como do transporte de H^+ por H^+ -ATPase do tipo P. Isto sugere que a enzima está acoplada, uma vez que o aumento do transporte de H^+ foi concomitante com a hidrólise de ATP e a inibição do transporte de H^+ também acarretou o decréscimo na atividade hidrolítica de ATP. Portanto sugere que a expansão celular na forma de hifa é dada pelas H^+ -ATPases tipo P reguladas por AIA.

Estudos apontam que a cascata de sinalização regulada pela auxina tem o NO como intermediário, influenciando a morfologia e fisiologia de raízes (Gouvea *et al.*, 1997; Pagnussat *et al.*, 2002; Correa-Aragunde *et al.*, 2004). Então a fim de demonstrar a existência de uma via de controle da transição levedura-hifa baseada na modulação pelo NO, como um mediador da cascata de sinalização da auxina em *Y. lipolytica*, nós verificamos que o doador de NO, SNP, induziu de forma mais proeminente a transição dimórfica nesse fungo em comparação com a cultura controle (sem SNP). Concentrações baixas (10nM, 50 nM, 10 μ M) de SNP não afetaram o padrão de crescimento das células, porém altas concentrações (50 μ M e 100 μ M) inibiram o crescimento celular em até cerca de 45 %. Curiosamente, quanto menor a concentração de SNP (10

nM) utilizado mais eficiente é a transição dimórfica, uma vez que foi possível observar que as células de *Y. lipolytica* expostas à baixas concentrações de SNP (10 nM), exibiram um aumento de formas filamentosas. Já com o aumento da concentração de SNP (50 e 100 μ M) no meio de cultivo houve uma demora na transição levedura–hifa. Estes dados são semelhantes ao que foi visto em outros trabalhos com plantas, onde o efeito do SNP também foi dependente da dose. Nossos resultados corroboram com aqueles encontrados por de Lamatina *et al.*(2003), Tian *et al.* (2007) e Zandonadi (2010), nesses estudos, baixas concentrações de SNP (10 μ M) não afetaram a elongação da raiz, porém altas concentrações (> 50 μ M) apresentaram efeito inibitório. Um similar efeito inibitório de altas concentrações de SNP na elongação radicular e hipocótilo também têm sido reportado por Beligni e Lamatina, (2000) e Correa-Aragunde *et al.*, (2004). Todavia, vale ressaltar que a ação do NO sobre a morfologia e fisiologia de plantas já ser conhecida e relatada, ainda pouco se sabe sobre a ação do NO em fungos para uma comparação mais aprofundada.

Resultados similares aos obtidos no presente trabalho foram observados por Dutra (2008) quando células de *Y. lipolytica* foram cultivadas na presença de AIA. O efeito de AIA também foi dependente da dose, semelhante ao efeito do SNP, de forma que baixas concentrações de AIA (10 pM) estimularam a morfogênese e altas concentrações (100 μ M) inibiram o crescimento celular em cerca de 50 %. Portanto os dados sugerem que o NO atua em uma via dependente de AIA, agindo como um intermediário em sua cascata de sinalização, uma vez que o tratamento com SNP mostrou efeitos idênticos aos do tratamento com AIA sobre a morfogênese e crescimento celular de *Y. lipolytica*.

Após verificado a ação do doador de NO, analisamos se com sequestrador de NO, o PTIO, seria capaz de bloquear o efeito de SNP sobre a transição dimórfica. Deste modo foi observado que altas concentrações de PTIO (100 μ M) foram as mais efetivas em bloquear a filamentação e que baixas concentrações (10 μ M) não tiveram efeito significativo. Tais dados indicam que o sequestrador de NO, PTIO, foi capaz de bloquear a transição morfogênica devido a sua capacidade de seqüestrar endógenas concentrações de NO. Isto implica que a morfogênese de *Y. lipolytica* é diretamente relacionada com a concentração endógena desta molécula bioativa, o NO.

Foi observado que o doador de NO (SNP) não foi capaz de reverter o efeito inibidor de PTIO sobre a morfogênese de *Y. lipolytica*. O adicional efeito inibitório de PTIO sobre o dimorfismo indica que o mesmo pode estar agindo através de diferentes mecanismos, resultando em uma grande redução das concentrações endógenas de NO que não pode ser revertida pelo SNP.

Após a observação dos efeitos do NO, sobre a morfogênese de *Y. lipolytica*; analisamos o efeito de seus moduladores, SNP e PTIO, sobre o transporte de H^+ e atividade hidrolítica de H^+ -ATPases de membrana plasmática. SNP causou uma forte estimulação de aproximadamente 150% no transporte de H^+ , enquanto, PTIO, teve efeito contrário, levando a uma redução de 50% na atividade de H^+ . Resultado semelhante foi encontrado para a atividade hidrolítica.

Similar ao que foi encontrado para AIA, a via desencadeada pelo NO também estimula o transporte de H^+ , e possivelmente está participando conjuntamente com a via auxínica na ativação de H^+ - ATPases, estabelecendo o crescimento hifal. Tais dados corroboram aqueles obtidos por Zandonadi *et al.*, 2010, que demonstrou o efeito do NO sobre as bombas de H^+ em plantas. Visto que plantas tratadas com SNP, apresentaram um aumento de 3 vezes na atividade de H^+ -ATPases, enquanto a adição de PTIO foi capaz de suprimir essa estimulação.

Após o entendimento que a sinalização por NO é essencial para a morfogênese, detectamos a presença de NO nas células de *Y. lipolytica*. O cultivo da levedura na presença de SNP aumentou consideravelmente a detecção de NO endógeno nas células. Em contrapartida a adição de PTIO diminuiu a fluorescência do marcador, indicando um menor acúmulo de NO nas células. A adição do SNP no meio de cultivo acarretou o aumento dos níveis endógeno de NO, conduzindo a ativação das bombas de H^+ e a transição levedura – hifa. Enquanto o PTIO (sequestrador de NO) foi capaz de suprimir tais efeitos em *Y. lipolytica*. Sendo assim estes resultados confirmam que a via do NO é requerida para ativação de H^+ -ATPases e filamentação de *Y. lipolytica*.

O NO parece desempenhar funções importantes na sinalização do crescimento polarizado em microrganismos. Apesar disso, a presença de NO em fungos ainda é um assunto controverso, devido à ausência de genes

ortólogos às enzimas de síntese, mesmo com os recentes relatos da possível atividade da NO sintase (NOS) em leveduras (Almeida *et al.*, 2007; Kig e Temizkam, 2009). Em plantas, tem sido mostrado extensivamente a presença e funcionalidade do NO e de uma enzima descrita como homóloga da NOS de animais.

Com o intuito de verificar a participação da NOS na transição morfogênica em *Y. lipolytica*, fizemos o cultivo na presença de diferentes concentrações de L-NAME, um inibidor da NOS. Foi observado que altas concentrações de L-NAME (200 μ M) exibiram uma diminuição de aproximadamente 30% nas formas filamentosas. Constatamos também que baixas concentrações de L-NAME (20, 50 e 100 μ M) não tiveram efeito significativo sobre a transição levedura – hifa. Esses dados apontam a importância da cascata de sinalização do NO na morfogênese de *Y. lipolytica*. Embora uma taxa de inibição de 30% possa ser considerada baixa, o dado indica existir outras fontes de produção de NO independente da ação da NOS nesse fungo, explicando a formação de hifas mesmo na presença de altas concentrações de L-NAME.

O GMP cíclico (cGMP) é um sinalizador atuante pela via do NO. Os níveis de NO regulam essa via de sinalização por cGMP (Besson-Bard *et al.*, 2008). Então verificamos o efeito da sinalização do cGMP em *Y. lipolytica*, observamos que a cultura exposta a 100 μ M e 1 mM de azul de metileno exibiu uma diminuição significativa de hifas em comparação com a cultura controle. Isso mostra que o azul de metileno foi capaz de inibir eficientemente a transição levedura – hifa de *Y. lipolytica*. Sugerimos com esses resultados que a morfogênese dessa levedura esteja relacionada com as concentrações endógenas de cGMP. Uma vez que o cGMP mostra-se como um intermediário na via de sinalização do NO, a transição dimórfica de *Y. lipolytica* demonstra-se dependente da sinalização desencadeada pelo NO.

Algumas vias de sinalização já foram identificadas como estimuladoras da transição dimórfica em alguns fungos. A compreensão dos mecanismos de dimorfismo foi aprofundada pelos estudos com *Candida albicans*. Com estes estudos foi possível estabelecer que a via da MAPK (mitogen-activated protein kinase) medeia à formação de hifas em resposta a ferormônios (Liu *et al.*, 1993, Lee *et al.*, 2003; Lengeler *et al.*, 2000).

Analisando a ação da rota da MAPK sobre a morfogênese de *Y. lipolytica*, constatamos que altas concentrações (100 µM) do inibidor de MAPK foram eficientes em bloquear a filamentação, uma vez que ao final do cultivo totalidade das células ainda estavam na forma de levedura (Figura 12 A e B). Esses resultados corroboram com Cervantes-Chavez e Ruiz-Herrera (2006), onde a via da MAPK exibe uma função positiva em estimular a transição levedura hifa em *Y. lipolytica*. Tais dados mostram que o dimorfismo de *Y. lipolytica* está estritamente relacionado com a ativação da via da MAPK, uma vez que ao se cultivar as células desta levedura na presença do inibidor da MAPK, bloqueamos completamente a transição morfogênica. Mais uma vez mostramos que a via da MAPK também parece ser de grande importância para a filamentação de *Y. lipolytica*.

A cascata da MAPK vem sendo apontada como uma importante mediadora na transdução de sinais, conectando a percepção de estímulos externos a sinais celulares. MAPKs são descritas estando envolvidas na sinalização de vários estresses bióticos e abióticos, e tem sido implicada na regulação do ciclo celular e processos de desenvolvimento (Pagnussa *et al.*, 2014). Alguns estudos recentes sobre o crescimento radicular induzido por AIA e NO em plantas mostram o envolvimento da ativação da cascata da MAPK durante a formação de raízes adventícias (Lombardo *et al.*, 2006, Lanteri *et al.*, 2014). No presente trabalho também entendemos que há uma relação estreita entre AIA, NO e MAPK.

Diante do exposto elaboramos a hipótese que a cascata da auxina, tendo o óxido nítrico como um intermediário, possa estar atuando como um sinalizador, regulando vias já descritas por ativarem a morfogênese, como por exemplo, a via da MAPK. Para comprovar isso, cultivamos células de *Y. lipolytica* na presença de AIA conjuntamente com Inibidor de MAPK (AIA + Inibidor da MAPK) e SNP conjuntamente com Inibidor de MAPK (SNP + Inibidor da MAPK). Neste experimento, observamos que o inibidor da MAPK foi capaz de inibir o dimorfismo significativamente, enquanto a adição de AIA ou SNP em combinação com o inibidor de MAPK, não foi capaz de reverter o efeito inibitório da morfogênese. Portanto sugerimos que a sinalização de AIA pode estar agindo pela via da MAPK. Uma vez que as células cultivadas na presença do inibidor de MAPK + AIA ou SNP não tiveram sua filamentação

restaurada. Isto mostra que a sinalização do AIA requer que a via da MAPK esteja ativada para que a filimentação ocorra.

Após verificarmos que a via desencadeada pela MAPK é crucial para o dimorfismo de *Y. lipolytica*, analisamos se essa mesma via interfere com o transporte de H⁺, uma vez que a sinalização protônica é requerida para promover o crescimento polarizado. Observamos com esses resultados que o inibidor da MAPK bloqueou quase em sua totalidade o transporte de H⁺. A adição de AIA não reverteu o efeito do inibidor sobre a atividade da H⁺ - ATPase tipo P. Novamente, confirmamos que a morfogênese de *Y. lipolytica* é influenciada pela via de sinalização da MAPK, que deve estar agindo “*downstream*” do AIA. E que esses dados complementam a hipótese de que a via auxínica é dependente da ativação da cascata da MAPK, uma vez que a adição de AIA conjuntamente com o inibidor da MAPK não reverteu o efeito inibitório sobre a morfogênese, nem sobre a atividade das bombas de H⁺. Desta forma, mostramos que o AIA é dependente da via da MAPK para promover a filimentação em *Y. lipolytica*. E que essas vias regulam a transição dimórfica por ativarem diretamente a atividade de H⁺-ATPases, de forma semelhante à teoria do crescimento polarizado proposta para células vegetais.

Em alguns fungos como *Candida albicans*, *Mucor circinelloides*, *Ustilago maydis*, *Blastomyces dermatitidis* a via da PKA exerce uma importante função durante o dimorfismo (Wolff *et al.*, 2002, Sctaudohar *et al.*, 2002, Sánchez-Martínez, e Pérez-Martín, 2001). O AMP cíclico (cAMP) participa como um intermediário na ativação desta via. Em *Y. lipolytica* a exposição a altas concentrações de cAMP (20 e 25 mM) foram eficientes em promover a transição dimórfica, verificando um aumento considerável do número de hifas. Nossos dados apontam que a ativação da via PKA pelo cAMP extracelular modula fortemente a morfogênese de *Y. lipolytica*.

A fim de confirmar o envolvimento da via da PKA na filimentação de *Y. lipolytica*, cultivamos as células dessa levedura na presença de diferentes concentrações do inibidor da PKA. Pudemos observar que tanto a concentração de 50 µM quanto a concentração de 25 µM desse inibidor foram eficientes em bloquear a formação de hifas. Ambos os resultados suportam que a via da PKA é indispensável para a formação de hifas em *Y. lipolytica*, uma

vez que o cAMP estimulou a transição levedura-hifa e o inibidor da PKA bloqueou o dimorfismo.

Para analisar a interdependência entre as vias de MAPK e PKA em desencadear a filamentação em *Y. lipolytica*, cultivamos as células na presença de cAMP, Inibidor da MAPK, cAMP e Inibidor da MAPK conjuntamente e observamos que a adição de cAMP foi eficiente em reverter o efeito bloqueador do dimorfismo causado pelo inibidor da MAPK. Dessa forma, nossa hipótese é que a via da PKA parece ser independente da ativação da cascata da MAPK para a promoção da morfogênese em *Y. lipolytica*.

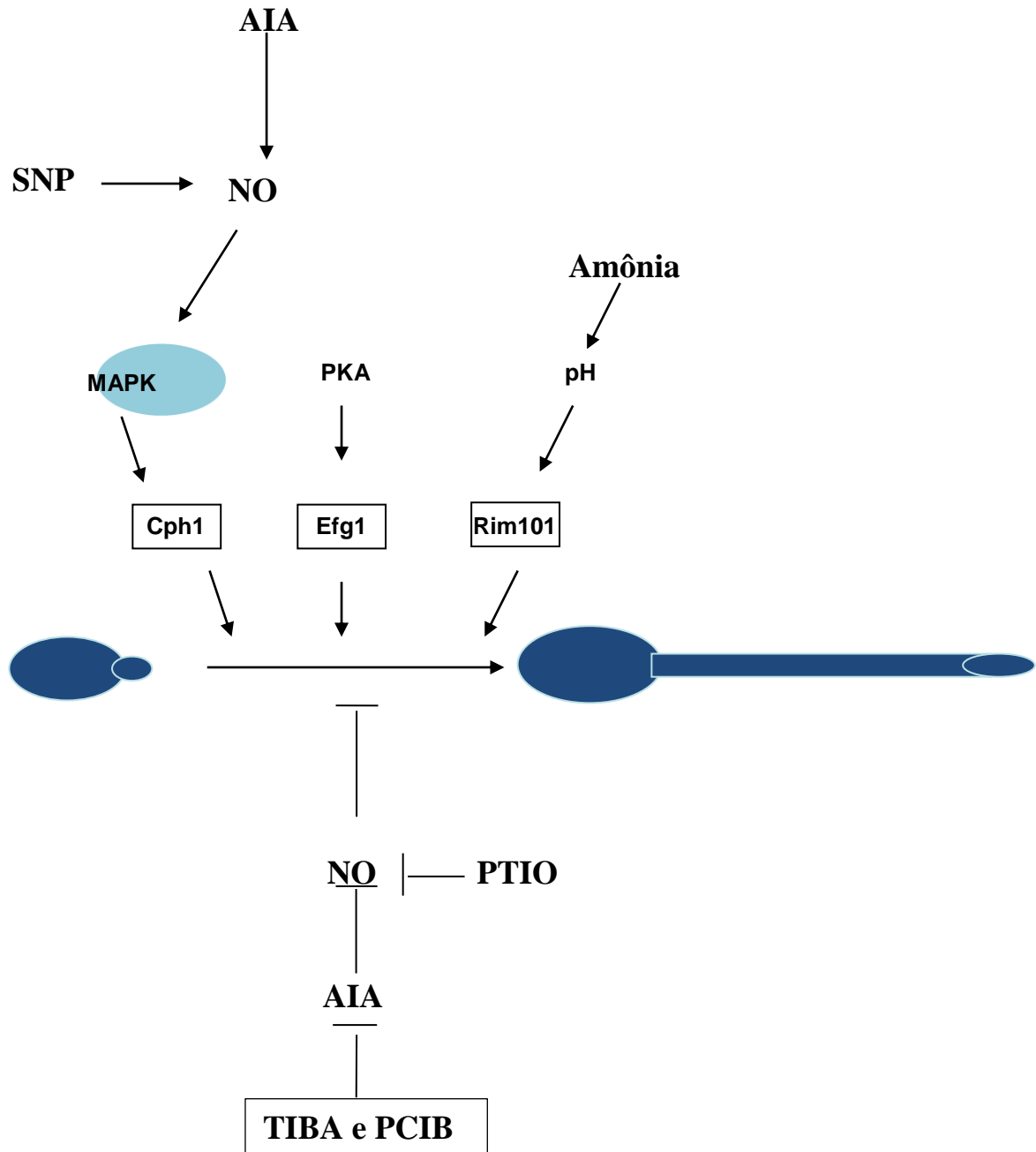
O pH extracelular também foi investigado durante o crescimento polarizado de *Y. lipolytica*. Este microrganismo alcaliniza naturalmente o pH extracelular provavelmente pela excreção de moléculas alcalinas durante seu crescimento, além de possuir o efector Rim101, regulado pela alcalinização do pH extracelular e envolvido na indução do crescimento polarizado das hifas fúngicas (Han *et al.*, 2012). Lobão (2012) determinou aumento de 1,5 a 2,0 vezes no nível de expressão gênica do efector Rim101 durante a morfogênese da *Y. lipolytica*. No presente trabalho, demonstramos que o AIA e seu precursor, Trp, intensificam a alcalinização do meio. O ensaio demonstrou que o meio extracelular inicialmente ácido (pH 4,5) torna-se alcalino de forma mais proeminente na presença dos indutores da filamentação, AIA e Trp. Já na presença dos inibidores do AIA, TIBA e PCIB, a alcalinização extracelular foi atenuada. Palková e colaboradores (2003) também observaram que quando as colônias de *S. cerevisiae* atingem a fase estacionária, estas podem alterar o pH do meio que as envolve passando de pH ácido para alcalino.

Apesar do AIA estimular as H⁺-ATPases, a alcalinização extracelular ocorre normalmente. Supomos que a alcalinização da matriz extracelular acompanhada pelo aumento na atividade de prótons deve estar relacionada à sobrevivência de *Y. lipolytica*, uma vez que a quantidade de compostos alcalinos excretados pela célula deve ativar a extrusão de H⁺ a fim de manter as diferenças eletroquímicas entre as membranas. Possivelmente, os H⁺ transportados pela bomba se concentram no microambiente, no periplasma, entre a membrana e a parede celular, enquanto o produto alcalino é eliminado para a matriz extracelular.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam a importância do pH como sinalizador no crescimento polarizado de hifas, uma vez que nas condições cujo meio permanece ácido, não ocorre a morfogênese da levedura. Foi proposto que o aumento do pH do meio de cultura é devido a liberação de amônia pelas colônias de maneira conjunta, atuando de forma semelhante a um “Quorum sensing” que culmina alterando o pH do meio (Palková *et al.*, 1997).

Para analisarmos se a alcalinização do microambiente em torno das colônias de *Y. lipolytica* é promovida pela liberação de amônia, quantificamos a secreção deste composto por células da levedura em conjunto com a morfogênese. Observamos que as culturas de *Y. lipolytica* que possuíam mais células na forma de levedura (15h de crescimento) apresentavam uma menor liberação de amônia em comparação com a cultura que exibia uma mistura de células na forma de pseudohifas e hifas e constatamos que a secreção de amônia por células de *Y. lipolytica* se eleva conforme é dado o envelhecimento da cultura e conseqüente aumento das formas filamentosas. Assim os resultados apontam que a alcalinização do microambiente em torno das colônias de *Y. lipolytica* é realmente devido a secreção de amônia por células desta levedura.

Com os resultados obtidos neste trabalho propomos os possíveis modos de ação:



7. CONCLUSÕES

- Sinalização de auxina é essencial para a transição levedura-hifa de *Y. lipolytica*;
- Atividade de H⁺-ATPases de membrana plasmática é regulada durante transição dimórfica pela auxina endógena;
- *Y. lipolytica* produz NO;
- Produção de NO é requerida para transição levedura–hifa e ativação da H⁺-ATPase;
- Sinalização por MAPK é fundamental para morfogenese de *Y. lipolytica*;
- Atividade de H⁺-ATPase é regulada via cascada da MAPK durante a filamentação;
- Sinalização de AIA é dependente da via da MAPK;
- Via da PKA é requerida para a filamentação;
- Secreção de amônia aumenta durante a transição levedura-hifa de *Y. lipolytica*.

8. BIBLIOGRAFIA

- Agarwal P.K., Agarwal P., Custers JBM, Liu C-M., Bhojwani S.S.** 2006. PCB na antiauxin enhances microspore embryogenesis in microspore culture of *Brassica juncea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 86:201–210
- Ahn S.J., Sivaguro M., Osawa H., Chung G.C., Matsumoto H.** 2001. Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiol.* 126: 1381-1390.
- Alkan N., Espeso E.A., Prusky D.** 2013. Virulence regulation of phytopathogenic fungi by pH. *Antioxid Redox Signal* 19:1012–1025.
- Almeida B., Buttner S., Ohlmeier S., Silva A., Mesquita A., Sampaio-Marques B., Osório N. S., Kollau A., Mayer B., Leão C., Laranjinha J., Rodrigues F., Madeo F., Ludovico P.** 2007. NO-mediated apoptosis in yeast. *Journal of Cell Science* 120, 3279-3288.
- Alves, O. T.** 2006. Estudo dos transportadores de H⁺ e Ca²⁺ em vesículas secretórias do mutante *sec6-4* da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 81p.
- Aniol A.** 1990. Genetics of tolerance to aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell). *Plant Soil*, 123:223-227.
- Anoop V.M., Basu U., Mccammon M.T., Mcalister-Henn L., Taylor G.J.** 2003. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol*, 132: 2205-2217.
- Astuti R.I., Watanable D., Takagi H.** 2015. Nitric oxide signaling and its role in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nitric Oxide*. 52: 29-40.
- Avery S.V.** 2001. Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv Appl Microbiol.* 49:111-42.
- Bankar A.V; Kumar A.R; Zinjarde S.S** 2009. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 84(5):847–865.
- Bala Gupta V., Anitha S., Hegde M.L., Zecca L., Garruto R.M., Ravid R., Shankar S.K., Stein R., Shanmugavelu P., Jagannatha Rao K.S.** 2004.

Aluminium in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad? *Cell. Mol. Life Sci.* 62:143-158.

Banuett F. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* 29:179–208.

Banuett F. 1998. Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 249–274.

Bardwell L. 2005. A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* 26: 339–350.

Barth G., Gaillardin C. 1996. *Yarrowia lipolytica*. In: Wolf K (ed) *Nonconventional yeasts in biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 313-388.

Barth G., Gaillardin C. 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev*, 19: 219-237.

Baptista-Filho, M.; da Silva, M.G.; Sthel, M.S.; Schramm, D.U.; Vargas, H.; Miklos, A.; Hess, P. 2006. Ammonia detection using quantum-cascade laser photoacoustic spectroscopy. *Applied Optics*, 45: 4966-4971.

Beligni M.V, Lamattina L. 1999. Is nitric oxide toxic or protective. *Trends in Plant Science*; 4:299-300

Beligni M V., Lamattina L. 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 215 – 221.

Bennett M.J., Marchant A., Green H.G., May S.T., Ward S.P., Millner P.A., Walker A.R., Schulz B., Feldmann K.A. 1996. *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, 273: 948-950.

Besson-Bard A., Pugin A., Wendehenne D. New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. *Plant Biol.* 2008. 59:21–39.

Berman J., Sudbery P.E. 2002. *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat. Rev. Genet.*, 3:918–930.

Beyenbach, K. W., Wieczorek, H. 2006. The V-type H⁺-ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *The Journal of Experimental Biology* 209: 577-589 (Review).

Blancaflor E.B., Jones D.L., Gilroy S. 1998. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol*, 118: 159-172.

Bolan N.S., Hedley M.J. 2003. Role of Carbon, Nitrogen, and Sulfur Cycles in Soil Acidification. *In*: Rengel Z, ed. Handbook of soil acidity. New York, NY, USA: Marcel Dekker, 29-56.

Braun B.R., Head W.S., Wang M.X., e Johnson A.D. 2000. Identification, and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics*, 156, 31-44.

Brunton A.H., Gadd G.M. 1989. The effect of exogenously-supplied nucleosides and nucleotides and the involvement of adenosine 3-5-monophosphate (cyclic AMP) in the yeast mycelium transition of *Ceratocystis (Ophistomaulmi)*. *FEMS Microbiol Lett* 60:49–53.

Canellas L.P., Olivares F.L., Okorokova-façanha, A.L., Façanha A.R. 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPases activity in maize roots. *Plant Physiology* 130, 1951-1957.

Cervantes-Chavez J.A., Ruiz-Herrera J. 2006. STE11 disruption reveals the central role of a MAPK pathway indimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS YeastRes* 6: 801–815.

Cho T., Hamatake H., Kaminishi H., Hagihara Y., Watanabe K. 1992. The relationship between cyclic adenosine 3-5-monophosphate and morphology in exponential phase *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 30:35–42.

Cleland R. E. 1995. Auxin and cell elongation. *In* *Plant hormones and their role in the plant growth development*, (ed. P. J. Davies), pp.214-227. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.

Cornet M., Gaillardin C. 2014. pH Signaling in Human Fungal Pathogens: a New Target for Antifungal Strategies. *Eukaryotic Cell* p. 342–352.

Correa-Aragunde N., Graziano M., Lamattina L 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218: 900–905.

Correa-Aragunde N., Lanteri M.L., Garcí'a-Mata C., ten Have A, Laxalt A.M., Graziano M., Lamattina L. 2007. Nitric oxide functions as intermediate in auxin, abscisic acid and lipid signaling pathways. *In* L Lamattina, J Polacco, eds, *Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology*, Series *Plant Cell Monographs*, Vol 6. Springer, Berlin, pp

- Crawford N.M.** 2006. Plant nitric oxide syntase: back to square one. Trends Plant Sci. 11, 526-527
- Davis D., Wilson R.B., e Mitchell A.P.** 2000. *RIM101*-Dependent and -Independent Pathways Govern pH Responses in *Candida albicans*. Mol. Cell. Biol. 20: 971-978.
- Dean R.A.** 1997. Signal pathways and appressorium morphogenesis. Annu Rev Phytopathol 35:211–234.
- Degenhardt J., Larsen P.B., Howell S.H.** 1998. Aluminum Resistance in the Arabidopsis Mutant *alr-104* Is Caused by an Aluminum-Induced Increase in Rhizosphere pH. Plant Physiol, 117: 19-27.
- Dickman M.B., Yarden O.** 1999. Serine/threonine kinases and phosphatases in filamentous fungi. Fung Genet Biol 26:99–117
- Dominguez A., Ferminan E., Gaillardin C.** 2000. *Yarrowia lipolytica*: na organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in human pathogenic and apathogenic yeasts. Karger, Basel, pp 151-172 control of morphogenesis. Microbiology, 146: 1763-1774.
- Dujon B., Sherman D., Fischer G.** e 64 outros autores. 2004. Genome evolution in yeast. Nature 430, 35-44.
- Dutra R.K.** 2008. Transição Dimórfica do Fungo *Yarrowia lipolytica*: Efeito da auxina e alumínio. Monografia desenvolvida no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- Exley C.A.** 1999. Molecular Mechanisms of aluminum-induced Alzheimer's disease ? J. inorg. Biochem. 76: 133-140.
- Ezaki B., Gardner R.C., Ezaki Y., Konodo H., e Matsumoto H.** 1998. Protective roles of two aluminum (Al) induced genes, HSP150 and SED1 of *Sacharomyces cerevisiae*, in Al and oxidative stresses. FEMS Microbiol. Lett., 159: 99-105.
- Façanha A.R., Façanha A.L.O., Olivares F.L., Guridi F., Santos G.A., Velloso, A.C.X., Rumjanek V.M., Brasil F., Schripsema J., Braz-filho R., Oliveira M.A. e Canellas L.P.** 2002. Bioatividade de ácidos húmicos: efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. Pesquisa Agropecuária Brasileira 37, 1301-1310.

Fagundes A.A.S.A., Carvalho M.TM., Ferreira LG., Silveira AP.C., Nadai T.R., Capellini V.K., Evora PR.B., Celotto A.C. 2013. Effects of NO/cGMP inhibitors in a rat model of anaphylactoid shock. *FASEB Journal*;27:920.7.

Fernandes L., Rodrigues-Pousada, C., Struhl, K., 1997. Mol cell. Bio. 17, 6982-6993.

Fickers P., Benetti P.-H., Wache Y., Marty AMauersberger. S.M.S., Smit Nicaud J.-M. 2004. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research* 5 : 527–543

Foy C.D., Chaney R.L., White M.C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Annu Rev Plant Physiol*, 29: 511-56.

Frías I., Caldeira M.T., Perez C.J.R., Navaro A.J.P., Culienez M.F.A., Kuppinger O, Stransky H., Pages M., Hager A., Serrano R.1996. A major isoform of the maize plasma membrane H⁺ ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant cell*8: 1533-1544.

Gälweiler L., Guan C., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A. e Palme K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226-2230.

Gaxiola R.A; Sanchez C.A; PaezvalenciaJ.j; Ayre B.G; Elser J.J. 2012. Genetic manipulation of a vacuolar H⁺-PPase: from salt tolerance to yield enhancement under phosphorus-deficient soils. *Plant Physiology* 159: 3-11.

Gimeno C.J., Ljungdah P.O., Styles C.A., Fink G.R. 1992. Unipolar cell divisions in yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth regulation by starvation and RAS. *Cell* 68:1077–1090.

Gow A.J., Ischiropoulos H.J. 2001. *Cell Physiol* 187: 27-282.

Gray W.M., e Estelle M. 2000. Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *Trends Biochem. Sci.*, 25: 133-138.

Groenewald M; Boekhout T; Neuvéglise C; Gaillardin C; van Dijck PWM, Wyss M. 2014. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit Rev Microbiol* 40(3):187–206

Hagen G., Guilfoyle T. 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.*, 49: 373-385.

- Hager A., Debus G., Edel H.G., Stransky H., Serrano R.** 1991. Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPases. *Plant* 185: 527-537.
- Harman T.L.** 2006. Development of quantum-cascade laser based biosensor technology. ISSO Annual Report – p. 85-87.
- Heinisch J.J., Lorberg A., Schmitz H.P & Jacoby J.J.** 1999. The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 32: 671–680.
- Henry Y.A., Ducastel B., Guissni A.** 1997. Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides. *Nitric oxide research from chemistry to biology*. Landes Company. 15-46.
- Hirano Y., Walthert L., Brunner I.** 2006. Callose in root apices of European chestnut seedlings: a physiological indicator of aluminum stress. *Tree Physiology*, 26:431–440.
- Hopkins, W.G.** 1999. *Introduction to Plant Physiology* (John Wiley & Sons, New York City, New York) 340-347.
- Horemans N., Foyer C.H., Asard H.** 2000. Transport and action of ascorbate at the plasma membrane. *Trends in Plant Science*. 5, 263-267.
- Hull A.K., Vij R., Celenza J.L.** 2000. *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Feb 29;97(5):2379-84*.
- Hurtado C.A.R., e Rachubinski R.A.** 2002. Isolation and characterization of *YIBEM1*, a gene required for cell polarization and differentiation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Eukaryot. Cell* 1: 526-537.
- Jang D.H., Nelson L.S., Hoffman R.S.** Methylene Blue for Distributive Shock: A Potential New Use of an Old Antidote. 2013. *J. Med. Toxicol*, 9:242–249.
- Jiménez-Bremont J.F., Rodríguez-Hernández A.A & Rodríguez- Kessler M.** 2012. Development and dimorphism of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Dimorphic Fungi: Their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis*, Vol. 1 (Ruiz-Herrera J, ed.), pp. 58–66. Bentham Science Publishers, Oak Park, IL
- Johnson D.A., Akamine P., Radzio-Andzelm E., Madhusudan, Taylor S.S.** 2001. Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* 101: 2243–2270.

- Jones A.M., Savka M.A., Wu M.J., De Witt N.G., Shillito R., Binns A.N.** 1998. Auxin-dependent cell expansion mediated by over expressed auxin-binding protein 1. *Science*, 282:1114–1117.
- Jongbloed R.H., Borstpauwels G.W.F.H.** 1992. Effects of aluminum and pH on growth and potassium uptake by ectomycorrhizal fungi in liquid culture. *Plant Soil*, 140: 157-163.
- Kadosh D., e Johnson A.D.** 2005. Induction of the *Candida albicans* Filamentous Growth Program by Relief of Transcriptional Repression: A Genome-wide Analysis. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 2903-2912.
- Kamzolova S.V, Morgunov I.G.** 2013. alpha-Ketoglutaric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(12):5517–5525.
- Kepinski, S, Leyser, O.** 2005. Plant development; auxin in loops. *Curr.Bio* 15, 208-210.
- Kig C., e Temizkan G.** 2009. Nitric oxide as a signaling molecule in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Protoplasma*, 238:59–66.
- Kinraide, T.B.** 1993. Aluminum enhancement of plant-growth in acid rooting media – a case of reciprocal alleviation of toxicity by 2 toxic cations. *Physiol Plant* 88: 619-625.
- Klein B. S., e Tebbets B.**2007. Dimorphism and virulence in fungi. *Current Opinion in Microbiology*. 10:314-319.
- Klionsky, D. J., Herman, P. K., E. M. R. S. D.** 1990. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 54: 266 –292.
- Kochian L.V., Hoekenga O.A., Pineros M.A.** 2004. How Do Crop Plants Tolerate Acid Soils? Mechanisms of Aluminum Tolerance and Phosphorous Efficiency. *Annu Rev Plant Biol*, 55:459-93.
- Koegl, F., Kstermans, D.G. F. R,** 1994. Heteroauxina als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher organismen. Isolierung aus Hefe. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*288,113-121.
- Kosterev, A. A., Titel.** 2002. Chemical sensors based on quantum cascade LASERs. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 38: 582-591.

- Kulka R.G.** 2008. Hormonal control of root development on epiphyllous plantlets of *Bryophyllum (Kalanchoe) marnierianum*: role of auxin and ethylene. *Jornal Exp. Bot.* 59(9):2361-70.
- Lamattina L., Garcia-Mata C., Graziano M., Pagnussat G.** 2003. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology.* 54, 109-136.
- Laskowski M.J., Williams M.E., Nusbaum H.C., Sussex I. M.** 1995. Formation of lateral root-meristems is a 2-stage. *Process. Develop.* 121: 3303-3310.
- Leberer E., Harcus D., Broadbent I.D., Clark K.L., Dignard D., Ziegelbauer K., Schmidt A., Gow N.A.R., Brown A.J.P., Thomas D.Y.** 1996. Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13217–13222.
- Lengeler K.B., Davidson R.C., D'Souza C., Harashima T., Shen W.C., Li W., Mitchell A.P.** 1997. Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics*, 145:63–73.
- Lengeler K.B., Davidson R.C., D'souza C., Harashima T., Shen W.C., Wang P., Pan X., Waugh M & Heitman J.** 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 746–785.
- Litcher A., Mills D.** 1997. Fill, a G-protein alpha-subunit that acts upstream of cAMP and is essential for dimorphic switching in haploid cells of *Ustilago hordei*. *Mol Gen Genet* 256:426–435.
- Liu H., Styles G.R., e Fink G.R.** 1993. Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science*, 262: 1741-1744.
- Lobão F.A.** 2007. Utilização da levedura *Yarrowia lipolytica* como Modelo de Estudos dos Mecanismos de Tolerância e Fitotoxicidade do Alumínio. tese de Mestrado. Desenvolvida no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

- Lobão FA.** 2005. Efeito do Alumínio na acumulação de Ca^{2+} , no crescimento de células de levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* e clonagem do gene YC2.1, indicador de Ca^{2+} , em vetor de expressão em levedura. Monografia desenvolvida no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- Lomax T.L., Muday G.K., Rubery P.H.** 1995. Auxin transport. In PJ Davis, (ed.) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 509-530
- Lombardo M.C., Graziano M., Polacco J., Lamattina L** 2006. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behav* 1: 28–33
- Luschnig C., Gaxiola R.A., Grisafi P., Fink G.R.** 1998. EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 12: 2175-2187.
- Macdiarmid C.W., Gardner R.C.** 1996. Al toxicity in yeast – A role for Mg? *Plant Physiol.* 112: 1101-1109.
- Macdiarmid C.W., Gardner R.C.** 1998. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J Biol Chem.* 273: 1727-1732.
- Martínez-Espinoza A.D., García-Pedrajas M.D., Gold S.E.** 2002. The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* 35: 1–20.
- Martinez-Espinoza A.D., Herrera J. R., Ramírez C.G.L., Gold S.E.** 2004. MAP Kinase and cAMP Signaling Pathways Modulate the pH-Induced Yeast-to-Mycelium Dimorphic Transition in the Corn Smut Fungus *Ustilago maydis*. *Current Microbiology*. Vol 49, pp. 274-281
- Matsumoto H., Devi S.R., Yamamoto Y.** 2003. An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. *J Inorg Biochem*, 97: 59-68
- Medoff G., Kobayashi G.S., Painter A., Travis S.** 1987. Morphogenesis and pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 55:1355–1358.
- Merzendorfer, H., Gräf. R.; Huss. M.; Harvey. W. R., Wiczorek. H.** 1997. Regulation of proton-translocating V-ATPases. *The Journal of Experimental Biology* 200: 225–235.

- Neill S.J., Desikan R., Hancock J.T.** 2003. nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*. 159, 11-35.
- Nelson N.** 1992. The vacuolar H⁺-ATPase – one of the most fundamental ion pumps in nature. *The Journal of Experimental Biology* 172: 19-27.
- Nelson N., Harvey, W. R.** 1999. Vacuolar and plasma membrane proton-adenosine triphosphatases. *Physiological Reviews* 79(2): 361-385.
- Okorokv A.L., e Lehle L.** 1998. Ca²⁺-ATPases of *Saccharomyces cerevisiae* are equipped with Ca²⁺-ATPases. *FEMS Microbiol. Lett*, 162: 83-91
- Okorokv L.O., e Lichko L.P.** 1983. The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. ATPase is electrogenic H⁺-translocase. *FEBS Lett.* 155: 102-106.
- Orlowsky M.** 1991. *Mucor* dimorphism. *Microbiol Rev* 55:234–258.
- Paciorek T., Friml J.** 2006. Auxin signaling. *Cell Science*. 119, 1199-1202
- Paciorek T., Zazimalová E., Ruthardt N., Petrásek J., Stierhof Y.D., Kleinvehn J., Morris D.A., Emans N., Juergens G., Geldner N.** 2005. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cell. *Nature* 435, 1251-1256.
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L** 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol* 129: 954–956.
- Pagnussat G.C., Lanteri M.L., Lamattina L.** 2003. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol* 132: 1241–1248.
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lombardo MC, Lamattina L.** 2004. Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogenactivated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol* 135: 279–286

Palande AS, Kulkarni SV, León-Ramírez C, Campos-Góngora E, Ruiz-Herrera J, Deshpande MV. 2014. Dimorphism and hydrocarbon metabolism in *Yarrowia lipolytica* var. *indica*. *Archives of Microbiology* 8: 545-556.

Palková Z., Janderová B., Gabriel J., Zikánová B., Pospíšek M. and Forstová J. 1997. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 532-536.

Pan X., Harashima T., Heitman J. 2000. Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* 3: 567–572.

Pedersen. P. L., Carafoli E. 1987. Ion motive ATPases. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends in Biochemical Sciences* 12: 146-150.

Pérez-Campo, F.M., Domínguez A. 2001. Factors Affecting the Morphogenetic Switch in *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology*, 43:429–433.

Phan Q.T., Belanger P.H., Filler S.G. 2000. Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect. and Imm.* 68: 3485–3490.

Pharmawatia M., Maryanib M. M., Nikolakopoulos T., Gehring C. A., Irving H.R. 2001. Cyclic GMP modulates stomatal opening induced by natriuretic peptides and immunoreactive analogues. *Plant Physiol. Biochem.* 39. 385–394.

Poltermann S., Nguyen M., Gunther J., Wendland J., Hartl A., Kunkel 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. *Microbiol.* 5:1645-55.

Prusty R.P., Grisafi, G.R. Fink R.. 2004. The Plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. 4153-4157.

Ramos A.C., Martins M.A., Façanha A.R. 2005. Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microssomos de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. *Rev. Brasileira Ciências do Solo*, 29:207-213, 2005.

Rayle D.L., Cleland R. 1972. In vitro acid-growth response-relation to in-vitro growth responses and auxin. *Planta.* 104: 282-296.

Rayle D.L., Cleland R. 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99:1271-1274

- Rengel Z., Ma F., Kuo J.** 2002. Aluminium toxicity in rye (*Secale cereale*): root growth and dynamics of cytoplasmic Ca^{2+} in intact root tips. *Annu. Botany*, 89: 241-244.
- Robinson T.W., Stier T.J.B.** 1941. Formation of auxin in yeast cultures. *General Physiology*.
- Rodríguez-Kessler M., Baeza-Montanez L., García-Pedrajas M.D., Tapia-Moreno A., Gold S., Jiménez-Bremont J.F & Ruiz-Herrera J.** 2012. Isolation of UmRm75, a gene involved in dimorphism and virulence of *Ustilago maydis*. *Microbiol Res* 167: 270–282.
- Ruiz-Herrera J., Sentandreu R.** 2002. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiol*, 178:477-83.
- Ruiz-Herrera J., Morales-Vargas A.T., Domínguez A. 2012. Identification of dimorphism-involved genes of *Yarrowia lipolytica* by means of microarray analysis. *Research in Microbiology* 163 (2012) 378e387
- Saito H., Tatebayashi K.** 2004. Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem (Tokyo)* 136: 267–272.
- Samarão S. S.** 2003. *Caracterização das atividades das $V H^{+}$ -ATPases e $P H^{+}$ -ATPase nas organelas de via secretória de levedura e regulação destas enzimas pela glicose extracelular.* tese (doutor em biociências e biotecnologia) – campos dos goytacazes – rj, universidade estadual do norte fluminense – uenf, 101p.
- Samarão, S., Teodoro C. E. S., Silva F. E., Ribeiro C., Granato, T. M., Bernardes, N., Retamal, C. M., Facanha, A. R.; Okorokova-Façanha, A. L., Okorokov, L. A.** 2009. $V H^{+}$ -ATPase along the yeast secretory pathway: Energization of the ER and Golgi membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1788: 303-313.
- Sánchez-Martínez C., Péres-Martín J.** 2001. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* — similar inputs, different outputs. *Current opinion in Microbiology* ,4:214-221.
- Schaekel A., Desai P.R., Ernst J.F.** 2013. Morphogenesis-regulated localization of protein kinase A to genomic sites in *Candida albicans*. *BMC Genomics* 2013, 14:842.
- Shen H., He L.F., Sasaki T., Yamamoto Y., Zheng S.J., Ligaba A., Yan, X.L., Ahn S.J., Yamaguchi M., Sasakawa H., Matsumoto H.** 2005. Citrate secretion

coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 138: 287–296.

Sanchez-Martinez, C. & Perez-Martin, J. 2001. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* – similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* 4, 214-221.

Schott E.J., Gardner R.C. 1997. Aluminum-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 254: 63-72, 1997.

Serrano R. 1983. *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Letters* 156: 11-14.

Serrano R. 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. R Serrano - *Int Rev Cytol*, 165:1-52.

Shrivastava S., D'Souza S.F., Desai P. D. 2008. production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (*kitasatospora sp.*) for soil applications. *Current Science*, vol.94, NO.12,25

Staudohar M., Bencina M., van de Vondervoort P.,J.,I., Panneman H., Legisa M., Visser J., Ruijter G.J.G. 2002. Cyclic AMP-dependent protein kinase is involved in morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Microbiology* 148, 2635–2645.

Stevens T. H.; Forgac, M. 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar H⁺-ATPase. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 779-808.

Stoldt V.R., Sonnenborn A., Leuker C.E., e Ernst J.F. 1997. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans* is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* 16: 1982–1991.

Szabo R., Štofániková V. 2002. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Lett*, 206:45-50.

Szaniszlo P.J., kang M.S., Cabib E. 1985. Stimulation of beta(1----3)glucan synthetase of various fungi by nucleoside triphosphates: generalized regulatory mechanism for cell wall biosynthesis. *Journal of bacteriology*. 161(3):1188-94.

Taiz L., Zeiger E. 2006. *Plant physiology* California: The Benjamin/Cummings Publishings Company

- Tamas L., Huttova J., Mistrik I., Simonovicova M., Siroka B.** 2006. Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots. *J Plant Physiol*, 163:781-784.
- Taylor S.S., Yang J., Wu J., Haste N.M., Radzio-Andzelm E., Anand G.** 2004. PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1697: 259–269.
- Taylor S.S., Kim C., Vigil D., Haste N.M., Yang J., Wu J., Anand G.S.** 2005. dynamics of signaling by pka. *Biochim Biophys Acta* 1754: 25–37.
- Teale W.D., Paponov I.A., Palme K.** 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biol.*, 7, 847-859.
- Tillmann A., Gow N.A.R., Brown A.J.P.** 2011. Nitric oxide nitrosative stress tolerance In yeast. *Biochem Soc Trans.* 39: 219-223.
- Tiwari S.B., Wang X.J., Hagen G., Guilfoyle, T.J.** 2001. Aux/IAA proteins are active repressors and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell*, in press.
- Tang C., Rengel Z.** 2003. Role of plant cation/anion uptake ratio in soil acidification. *In: Rengel Z, ed. Handbook of soil acidity.* NY, USA: Marcel Dekker, 57-81.
- Todd R.B., Greenhalgh J.R., Hynes M.J., Andrianopoulos A.** 2008. *TupA*, the *Penicillium marneffeii* *Tup1p* homologue, represses both Yeast and spore development. *Proteome Sci*, 6-17
- True W. Robinson T.J.B. Stier.** 1941. formation of Auxin In yeast Cultures. 765-769
- Vander Walt J.P., Van Arx J.A.** 1980. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 46: 517-521.
- Turrion-Gomez JL, Benito EP.** 2011. Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant. *Molecular Plant Pathology*;12:606-616.
- Vassilev N., Vassileva M., Azcon R., Medina, A.** 2001. Preparation of gel-entrapped mycorrhizal inoculum in the presence or absence of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett*, 23: 907–909.
- von Uexküll H.R., Mutert E.** 1995. Global extent, development and economic impact of acid soils. *In: Plant-Soil Interactions at Low pH: Principles and Management*, ed. RA Date, NJ Grundon, GE Raymet, ME Probert, pp. 5–19. Dordrecht, The Neth: Kluwer Academic

- Wang P., et al.** 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 746–785.
- Wang P., Heitman J.** 1999. Signal transduction cascades regulating mating, filamentation and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol* 2:358–362.
- Went E.W., e Thimann K.V.** 1937. *Phytohormones*. Macmillan, New York.
- Wieczorek, H., Brown, D., Grinstein, S.; Ehreufeld, J., Harvey, W. R.** 1999. Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *Bioessays* 21: 637-648.
- Whiteway M., Bachewich C.** 2007. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:529-53
- Widmann C., Gibson S., Jarpe M.B., Johnson G.L.** 1999. Mitogenactivated protein kinase: conservation of a three-kinasemodule from yeast to human. *Physiol Rev* 79: 143–180.
- Wolff A. M., Appel, K. F., Breum, J., Poulsen, U. & Arnau, J.** 2002. Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides*. *FEMS Yeast Res* 2, 203–213.
- Yang J.L., Zheng S.J., H.e. Y.F., Matsumoto H.** 2005. Aluminium resistance requires resistance to acid stress: a case study with spinach that exudes oxalate rapidly when exposed to Al stress. *J. Exp. Bot.*, 56: 1197-1203.
- Yokel R.A.** 2000, the toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology*, 21:813-28.
- Zandonadi D.B.** 2006. Bioatividade de Substâncias Húmicas: Promoção do Desenvolvimento Radicular e Atividades de Bombas de H⁺. Dissertação de Mestrado. LSOL/CCTA/UENF.
- Zandonadi D.B., Canellas L.P., Façanha A.R.** 2007. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta.*, 225: 1583-1595.
- 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⁺-ATPase activation. *Planta.* 231: 1025-1036.

Zatta P., Lucchini R., Van Rensburg S.J., Taylor A. 2003. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res. Bull.*, 62: 15-28.