

MODULAÇÃO DA TRANSIÇÃO DIMÓRFICA DE *Yarrowia lipolytica* PELAS
POLIAMINAS VIA TRANSPORTE PRIMÁRIO DE PRÓTONS

ANTÔNIO JESUS DORIGHETTO COGO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL - 2013

MODULAÇÃO DA TRANSIÇÃO DIMÓRFICA DE *Yarrowia lipolytica* PELAS
POLIAMINAS VIA TRANSPORTE PRIMÁRIO DE PRÓTONS

ANTÔNIO JESUS DORIGHETTO COGO

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do Grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Anna Lvovna Okorokova Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL - 2013

MODULAÇÃO DA TRANSIÇÃO DIMÓRFICA DE *Yarrowia lipolytica* PELAS
POLIAMINAS VIA TRANSPORTE PRIMÁRIO DE PRÓTONS

ANTÔNIO JESUS DORIGHETTO COGO

“Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como parte das exigências para
obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia e Biotecnologia.”

Aprovada em 05 de abril de 2013.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc., Produção Vegetal) - UVV

Prof. Dr. Thiago Motta Venancio (D.Sc., Bioinformática) - LQFPP/UENF

Dra. Lívia Marini Palma (D.Sc., Biotecnologia e Biotecnologia) - LFBM/UENF

Profa. Dra. Anna Lvovna Okorokova Façanha (D.Sc., Química Biológica) - UENF

Orientadora

Dedico este trabalho
aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer, primeiramente a Deus, pela saúde no despertar de cada manhã e pelo ânimo de buscar sempre novas fronteiras.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Anna Lvovna Okorokova Façanha, pelo auxílio, sugestões e, principalmente pelas críticas. Considero-as como feitas por alguém que acredita que eu possa ir mais longe, obrigado pela confiança!

Agradeço a UENF e aos órgãos de financiamento (CAPES, CNPq e FAPERJ) que contribuíram diretamente na realização do presente trabalho.

Agradeço aos membros da banca, Prof. Dr. Alessandro, Dra. Lívia e Prof. Dr. Thiago, se dispuseram instantaneamente em participar da avaliação. Muito obrigado!

Devo agradecer também algumas pessoas especiais, decisivas no meu aprendizado, formação e que tornaram esse momento tão mais agradável.

Ao Prof. Dr. Lev A. Okorokov pelos ensinamentos, auxílios, sugestões, artigos e críticas. Obrigado por ensinar um jovem estudante idealista a lidar com um impetuoso, mas brilhante campo da ciência. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha pela revisão da dissertação e por contribuir em meu amadurecimento crítico e filosófico. Obrigado pelas discussões e por apresentar ensinamentos tão envolventes de maneira sábia.

Aos demais professores do PGBB que contribuíram em minha formação.

Aos colegas de laboratório, Luiz Carlos, Noil, Keilla, Larinne, Renan, Camila, Layz, Marcela, Lívia, Suzanna, Viviane, Humberto, Gabriel, Érica, Júlia Soares, Flávia Camila, Maria Elisa, Géssica, Marciele, Layrana, Lídia e Júlia Fardim pela boa convivência e apoio por esses anos.

Aos colegas e técnicos de outros laboratórios, Juliana, Ana Cristina, Brunna, Luís Alfredo, Gideílde, Janaína, Amanda, Josimara, Ingá, Liane e Zila pelas discussões científicas e empréstimos de materiais.

Aos amigos Keilla, Layz e Renan muito obrigado pelo auxílio durante os experimentos e, muito mais que a parceria, eu agradeço pela amizade. Obrigado por permitir que eu participasse de momentos tão importantes na vida de vocês.

A minha família, meus pais e irmãs, meu porto seguro, com quem busco forças para cada desafio. Obrigado por tudo, vocês são meu espelho e fonte de energia.

Aos demais amigos e familiares, sempre preocupados e dispostos a me auxiliar em qualquer situação, sinto-me honrado em tê-los por perto. Obrigado!

*“The next steps, however, may prove painful:
we will, I believe, be compelled to lay aside the illusions
of reductionism and put the cell back in the center.”*

Franklin M. Harold

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Morfogênese celular e o crescimento polarizado.....	15
2.2 Compreendendo o crescimento polarizado.....	16
2.3 Fatores envolvidos no crescimento polarizado de fungos.....	19
2.4 Vias de sinalização da transição dimórfica.....	22
2.5 A <i>Y. lipolytica</i> como organismo modelo de crescimento polarizado.	28
2.6 Poliaminas em células fúngicas e vegetais.....	31
2.6.1 Biossíntese e degradação das poliaminas.....	32
2.6.2 inibidores da síntese de poliaminas.....	35
2.6.3 Transporte das poliaminas.....	36
2.7 As H ⁺ -ATPases e o crescimento polarizado.....	37
2.7.1 As H ⁺ -ATPases, poliaminas e o crescimento polarizado.....	39
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Cepa da levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> utilizada.....	42
4.2 Meios de cultura e manutenção da cepa.....	42
4.3 Preparo do pré-inóculo.....	42
4.4 Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em ensaio líquido na presença de espermidina e espermina.....	43
4.5 Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em ensaio líquido na presença de poliaminas e auxina.....	43
4.6 Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em ensaio líquido na presença de inibidor da síntese de poliaminas.....	43
4.7 Cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em ensaio líquido na presença de inibidores dos hormônios auxínicos.....	44
4.8 Contagem celular em câmara de Neubauer.....	44

4.9 Isolamento de membranas celulares totais de <i>Y. lipolytica</i>	44
4.10 Determinação do conteúdo de proteínas.....	46
4.11 Determinação do transporte de H ⁺	47
4.12 Acompanhamento da morfologia de <i>Y. lipolytica</i>	49
4.13 Acompanhamento do pH extracelular em colônias de <i>Y. lipolytica</i>	50
4.14 Acompanhamento da dinâmica vacuolar em <i>Y. lipolytica</i>	50
4.15 Análise estatística.....	51
5. RESULTADOS.....	52
5.1 Efeito das poliaminas no crescimento celular e na transição levedura-hifa da <i>Y. lipolytica</i>	52
5.2 Efeito do inibidor da síntese das poliaminas, ciclohexilamino (CHA), no dimorfismo de <i>Y. lipolytica</i>	58
5.3 Efeito das poliaminas e do ácido indol-3-acético (IAA) na transição dimórfica da <i>Y. lipolytica</i>	60
5.4 Efeito de poliaminas, ácido indol-3-acético e seus inibidores na transição dimórfica de <i>Y. lipolytica</i>	62
5.5 Atividade das H ⁺ -ATPases durante a morfogênese de <i>Y.</i> <i>lipolytica</i>	65
5.6 Poliaminas e o pH extracelular.....	68
5.7 A dinâmica vacuolar durante o crescimento polarizado.....	71
5.8 A morfologia das colônias.....	75
6. DISCUSSÃO.....	77
6.1 O efeito das poliaminas na transição dimórfica da <i>Y. lipolytica</i>	77
6.2 Efeito das poliaminas e ácido indol-3-acético na morfogênese de <i>Y. lipolytica</i>	81
6.3 Variações no pH ambiental e a atividade da P H ⁺ -ATPase.....	84
6.4 A dinâmica vacuolar e a morfologia colonial.....	87
7. CONCLUSÕES.....	91
8. REFERÊNCIAS.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ACMA	9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina
Al	Alumínio
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase (classe de enzimas que hidrolizam ATP)
CaM	Calmodulina
CHA	Ciclohexilamino
DAB	1,4-Diaminobutanona
DFMA	α -Difluorometilarginina
DFMO	α -Difluorometilornitina
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Guanosina trifosfatase (classe de enzimas que hidrolizam GTP)
IAA	<i>Indole-3-acetic acid</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MOPS	Ácido (3-(N-morfolino) propano sulfônico ácido)
NO	<i>Nitric oxide</i>
PA	Poliamina
PAO	Poliamina oxidase
PCIB	Ácido α -(<i>p</i> -clorofenoxi) isobutírico
Δ pH	Gradiente químico de H ⁺ entre as membranas
PKA	Proteína quinase A
Put	Putrescina
RPM	Rotação por minuto
SNP	Nitroprussiato de sódio
Spd	Espermidina
SPDS	Espermidina sintase
Spm	Espermina
SPMS	Espermina sintase
TIBA	Ácido 2,3,5-triodobenzóico
YED	<i>Yeast extract dextrose</i> (meio de cultivo rico)

RESUMO

A morfogênese celular é o processo pelo qual as células formam, mantêm e reproduzem sua organização espacial, e constitui uma das bases para a compreensão do desenvolvimento de todo organismo vivo. Alterações nos níveis de poliaminas têm sido descritos como um dos fatores que regulam tal processo em células fúngicas. No presente estudo, analisamos os efeitos das poliaminas na morfogênese da levedura *Yarrowia lipolytica*, explorando uma via de sinalização auxina-dependente e ativações diferenciais das bombas de prótons e do gradiente eletroquímico gerado por estas nas membranas celulares como hipótese de um possível mecanismo utilizado pelas hifas fúngicas na modulação do crescimento polarizado. Também analisamos a dinâmica vacuolar durante o crescimento polarizado, assim como a formação de colônias. Os resultados indicam que as poliaminas espermidina e espermina possuem a capacidade de estimular o crescimento hifal em *Y. lipolytica*, sem todavia, alterar o ponto da transição dimórfica, a qual se inicia entre 18 e 20h de cultivo. O inibidor da espermidina sintase (CHA) preveniu a filamentação em até 80% das células, mas este efeito foi revertido por ácido indol-3-acético (IAA, 10 pmol). A participação da via auxínica foi ratificada com o uso dos inibidores PCIB (IAA, sinalização) e TIBA (IAA, transporte), os quais inibiram a filamentação induzida pelas poliaminas com a mesma efetividade obtida com o CHA. A espermina também foi capaz de ativar o efluxo de prótons na membrana plasmática do fungo, durante a morfogênese celular. Às 20 horas de incubação com espermina, no início da transição dimórfica, observamos a maior ativação do transporte de H⁺ vanadato-sensível, indicando um estímulo de 2,5 vezes da H⁺-ATPases tipo P. Esta ativação cai para 1,5 vezes após o estabelecimento do fenômeno, às 26 horas de incubação. Em meio sólido, as colônias tratadas com poliaminas e IAA apresentaram um expressivo estímulo da alcalinização do pH extracelular, fenômeno este também inibido por TIBA e PCIB. Durante a morfogênese, foi possível notar uma conspícua vacuolização ao longo da hifa, com a região apical apresentando segregações vacuolares, características do crescimento polarizado. A análise da morfologia da colônia demonstra que a textura das colônias e o formato das franjas coloniais são alterados na presença de poliaminas. Verificou-se um aumento na rugosidade e no tamanho das franjas

coloniais, na mesma concentração ótima de hifação, 1 mM de espermina ou espermidina. Auxina também induziu características semelhantes, na concentração ótima para hifação de 10 pM de AIA, enquanto a presença dos inibidores TIBA e PCIB previniram a formação de rugosidades, inibiram o crescimento das franjas coloniais e do tamanho das colônias como um todo. Estes resultados em conjunto sugerem uma via de sinalização auxínica para o controle da morfogênese de *Y. lipolytica*, desencadeada por poliaminas. Este processo envolve ativações coordenadas das bombas de H⁺ e alterações na dinâmica vacuolar, influenciando desde o crescimento polarizado das células fúngicas individuais até a morfologia geral das colônias.

Palavras-chave: Morfogênese celular, crescimento polarizado, poliaminas, H⁺-ATPases e *Yarrowia lipolytica*.

ABSTRACT

Cell morphogenesis is the process by which cells form, maintain and reproduce their spatial organization, and is one of the bases for understanding the development of every living organism. Changes in the levels of polyamines have been described as one of the factors that regulate this process in fungal cells. In the present study, we analyzed the effects of polyamines on morphogenesis of the yeast *Yarrowia lipolytica* by exploiting a signaling pathway auxin-dependent and differential activation of the proton pumps, and electrochemical gradient generated in cell membranes, hypothesize a possible mechanism used by fungal hyphae in modulating the polarized growth. We also analyzed the vacuolar dynamics during polarized growth, as well as the formation of colonies. The results indicate that polyamines, spermidine and spermine, they possess the ability to stimulate hyphal growth in *Y. lipolytica* without, however, changing the point on the dimorphic transition which starts between 18 and 20h of cultivation. The inhibitor of spermidine synthase (CHA) prevented filamentation in up to 80% of the cells, but this effect was reversed by indole-3-acetic acid (IAA, 10 pmol). The participation auxin way was ratified by the use of inhibitors PCIB (IAA, signaling) and TIBA (IAA transport), which inhibited filamentation induced by polyamines with the same effectiveness obtained with the CHA. Spermine was also able to activate the efflux of protons in the plasma membrane of the fungus during cell morphogenesis. At 20h of incubation with spermine at the beginning of dimorphic transition, we observed a higher activation of the transport of H⁺ vanadate-sensitive, indicating a 2.5-fold stimulation of the H⁺-ATPase type P. This activation falls to 1.5-fold after establishment of the phenomenon, at 26h incubation. On solid medium, the colonies treated with IAA and polyamines showed a significant stimulation of alkalinization of extracellular pH, a phenomenon also inhibited by TIBA and PCIB. During morphogenesis, it was possible to notice a conspicuous vacuolization along the hypha, with the apical region showing vacuolar segregation, characteristic of polarized growth. Analysis of colony morphology demonstrates that the texture and shape of the colonies of colonial fringes are altered in the presence of polyamines. There was an increase in the roughness and the size of the fringes colonial at a concentration that promotes hyphal growth, 1 mM spermine or spermidine. Auxin also induced similar

characteristics, at a concentration of 10 pM of IAA that promotes hyphal growth, while the presence of inhibitors TIBA and PCIB prevented the formation of roughness, inhibited the growth of colonial fringes and the size of the colonies. These results suggest a signaling pathway auxin to control morphogenesis of *Y. lipolytica*, triggered by polyamines. This process involves coordinated activation pumps of H⁺ and vacuolar changes in the dynamic influencing since the polarized individual growth of fungal cells until colonies general morphology.

Keywords: Cell morphogenesis, polarized growth, polyamines, H⁺-ATPases and *Yarrowia lipolytica*.

1. INTRODUÇÃO

A morfogênese celular é um processo central em todos os grupos de organismos, desde as bactérias (*Streptomyces*) até aos animais superiores, passando pelas algas (*Oomycetes*), fungos e plantas. Este consiste em um processo biológico, relacionado ao controle do crescimento e diferenciação celular. A dinâmica da morfologia celular é fundamental na adaptação e evolução das formas unicelulares, que dependem exclusivamente de sua plasticidade morfológica na propagação, aquisição de nutrientes e sobrevivência em condições adversas. Além de ocorrer até mesmo em organismos multicelulares, que dispõem de mecanismos morfogênicos como forma de desenvolver tecidos, órgãos ou sistemas extremamente complexos e especializados em determinadas funções, como ocorre durante o desenvolvimento de embriões (Liu, 2001; Harris, 2011; Shaw *et al.*, 2011).

A modulação da morfogênese ocorre por uma gama de vias sinalizadoras nos mais diferentes níveis de ação, as quais podem ser ativadas ou reprimidas a fim de gerar informações que traduzem a necessidade de mudança. As cascatas de sinalização juntamente com os mediadores da informação são importantes, pois modulam a homeostase iônica, a expressão gênica e as vias de produção de proteínas que orquestram as transformações nos organismos (Liu, 2001). Aqui, procuramos entender um pouco mais sobre o fenômeno a partir do estudo de moduladores da morfogênese celular em micro-organismos e o possível modo de ação destes sobre a homeostase protônica, a partir da regulação das H⁺-ATPases.

Dentre os moduladores da morfogênese celular, as poliaminas são descritas como moléculas reguladoras do processo em micro-organismos, além de participar de diversos processos metabólicos. Essas moléculas são importantes na vulnerabilidade aos agentes estressores (Herrero *et al.*, 1999), na progressão do ciclo celular (Chattopadhyay *et al.*, 2002), na proteção contra o desenvolvimento de espécies reativas de oxigênio e apoptose (Chattopadhyay *et al.*, 2006), na longevidade celular (Eisenberg *et al.*, 2009), na virulência de fungos dimórficos (Valdés-Santiago *et al.*, 2009), no desenvolvimento normal de fungos micorrízicos (Sarjala *et al.*, 2010) e na transição levedura-hifa (Guevara-Olvera *et al.*, 1993). Aliado a estes fatores, existem as H⁺-ATPases que promovem a sinalização protônica, capazes de atuar em diversas vias, inclusive na modulação do crescimento celular (Zandonadi, 2010; Dutra, 2010; Lobão, 2012).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfogênese celular e o crescimento polarizado

Dentre os fenômenos que regem a morfogênese celular, um dos mais notáveis, mas paradoxalmente um dos menos elucidados é o crescimento polarizado. A morfogênese causada por este processo nada mais é que a formação de pólos celulares e o crescimento pronunciado de um deles por mecanismos peculiares a cada tipo celular. A capacidade de aumentar o alongamento celular não atrai a atenção somente pela curiosidade intrínseca de como o evento permite explorar melhor o ambiente externo e retirar dele todas as vantagens possíveis para a manutenção da sobrevivência da célula, mas pela forma como é conservado e regulado (Hepler *et al.*, 2001).

A morfogênese pelo crescimento polarizado também está presente em todos os grupos de organismo vivos. As plantas utilizam do fenômeno no crescimento de tubos polínicos e pelos radiculares, caracterizadas por células alongadas e cilíndricas. Os tubos polínicos são úteis na reprodução vegetal, pois ele carrega o esperma até ao ovócito para ocorrer a fertilização, enquanto os pelos radiculares propiciam o aumento na área de superfície envolvida na absorção de água e nutrientes pela planta (Hepler *et al.*, 2001). Nos animais superiores o crescimento polarizado também é observado em algumas células, como da formação dos neurônios, transdutores de sinais químicos e elétricos de uma região à outra. Apesar de bactérias (filamentos) e algas (rizóides) também apresentarem o crescimento polarizado de algumas células, provavelmente sejam os fungos, ou melhor, as hifas fúngicas, os modelos de crescimento polarizado mais bem caracterizados, com estudos voltados para o crescimento, desenvolvimento e proliferação das hifas, além da busca pela compreensão dos mecanismos de estabelecimento e manutenção da polaridade celular, alongação, septação, brotamento e diferenciação celular (Riquelme *et al.*, 2011).

Fungos são importantes modelos para estudos morfodinâmicos, pois são capazes de adotar diferentes morfologias a fim de se adaptar e colonizar distintos ambientes (Harris, 2011; Shaw *et al.*, 2011). O crescimento polarizado em fungos provavelmente tenha sido selecionado como a solução para os problemas de aquisição de nutrientes e sobrevivência em condições adversas (Szabo e

Stofaniková, 2002; Ruiz-Herrera e Sentandreu, 2002). Kawasse e colaboradores (2003) mostram que hifas são formadas justamente quando as leveduras são submetidas ao estresse térmico ou oxidativo.

A morfogênese via crescimento polarizado em fungos patogênicos é um fator essencial na virulência (Lo *et al.*, 1997; Berman e Sudbery, 2002). Em *Candida albicans*, por exemplo, a célula leveduriforme é importante na disseminação pelo sistema circulatório e adesão aos epitélios endoteliais. A forma filamentosa, por sua vez, é importante na invasão tecidual e resistência aos neutrófilos e fagocitose dos macrófagos, pois a levedura engolfada pode destruir a célula se ocorrer o crescimento filamentoso (Han *et al.*, 2011). Apesar da *C. albicans* provavelmente ser o fungo dimórfico mais estudado, outras espécies patogênicas humanas que também desenvolvem hifas tem recebido atenção, como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporotrix schenckii* (Morales-Vargas *et al.*, 2012), além dos fitopatógenos, como *Ustilago maydis* (Valdés-Santiago *et al.*, 2009) e *Mucor racemosus* (Orlowski, 1991).

Outro emprego importante do crescimento polarizado em hifas fúngicas ocorre na associação simbiótica entre fungos micorrízicos e plantas. O crescimento polarizado de fungos simbiontes permite o direcionamento dos micro-organismos para as raízes hospedeiras nos estágios iniciais da associação e durante o desenvolvimento da rizosfera após o estabelecimento da colônia (Ramos *et al.*, 2008a, 2009a). Portanto, a morfogênese em fungos é importante por promover diferentes tipos de associações, seja patogênica ou simbiótica. Dessa forma, a compreensão do fenômeno seria útil tanto para evitar a transição dimórfica em fungos virulentos, quanto para estimular o crescimento polarizado em hifas micorrízicas.

2.2 Compreendendo o crescimento polarizado

Tomando os fungos como modelo de estudo, existem muitas informações disponíveis sobre o processo de crescimento polarizado na célula. A formação de hifas em fungos é uma característica evolutiva ancestral, pois a maioria das leveduras é de linhagens que perderam a morfogênese hifal durante a evolução. Ainda existem controvérsias sobre o assunto, mas acredita-se que o crescimento de hifas foi perdido sob certas condições ambientais em que a morfologia leveduriforme

seria mais vantajosa. As leveduras possuem ótima razão superfície-volume, útil por prevenir a dessecação ou evitar respostas imunológicas em relações simbióticas. Dessa forma, a maioria dos nichos ocupados por leveduras são seletivos contra o crescimento de hifas (Harris, 2011).

Todavia, o crescimento hifal se perpetuou em muitas linhagens fúngicas e é mantido, principalmente pelo crescimento polarizado. A polarização celular em fungos possui diferentes finalidades, desde a formação de brotos em leveduras até a transição dimórfica. No momento em que ocorre a transição levedura-hifa, o crescimento unipolar é observado nas células, fenômeno acompanhado pela polaridade de praticamente todas as vesículas citoplasmáticas (Kawasse *et al.*, 2003; Harris, 2011). O citoesqueleto é uma das estruturas responsáveis por controlar o fenômeno, pois funciona como guia. Os filamentos de actina crescem em direção ao córtex celular e servem como trilhos para que outras proteínas, como miosinas, dineínas, dinactinas e cinesinas, atuem como motores protéicos no transporte de vesículas secretoras, RNA mensageiros, vacúolos, mitocôndrias e outras organelas celulares (Pruyne e Bretscher, 2000a,b; Riquelme *et al.*, 2011).

A actina polarizada é direcionada para a região do crescimento, formando a projeção e o crescimento seletivo da região (Chant, 1999). Os microtúbulos também apresentam função crucial no crescimento de hifas. A ruptura dos microtúbulos não previne o estabelecimento da polaridade, contudo causa a formação de hifas morfologicamente aberrantes (Harris e Momany, 2004). O transporte de vesículas e organelas pelo citoesqueleto é necessário para a alteração celular, pois essas organelas contêm proteínas indispensáveis para o enfraquecimento e síntese de uma nova parede celular e para a inserção de uma nova membrana plasmática durante o alongamento celular. A partir do uso organizado de todas as ferramentas disponibilizadas pelo citoesqueleto, o crescimento polarizado ocorre normalmente na formação das hifas (Pruyne e Bretscher, 2000a,b; Riquelme *et al.*, 2011).

Em fungos dimórficos existem estruturas que auxiliam o crescimento polarizado. Em *C. albicans*, por exemplo, o crescimento promovido pela dinâmica do citoesqueleto possui duas entidades quem mantêm o fenômeno: o Spitzenkörper e o polarissoma. O Spitzenkörper é um corpúsculo opaco localizado na ponta apical das células filamentosas e sua função é justamente dirigir o crescimento hifal. O polarissoma, por sua vez, é formado por um complexo de proteínas também

envolvidas na polarização, contudo está presente apenas nas células leveduriformes e em pseudohifas e são corpúsculos mais estáveis que o Spitzenkörper (Banuett *et al.*, 2008; Harris, 2011).

Estudos relatam que o Spitzenkörper é um componente pleomórfico, altamente dinâmico e formado por macro e microvesículas secretoras, ribossomos e componentes do citoesqueleto. A presença de ribossomos indica a síntese de proteínas, contudo não há estudos indicando quais são essas proteínas, apesar das proteínas marcadoras da polaridade celular representarem potenciais candidatas (Riquelme *et al.*, 2011). O conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na promoção e manutenção da polaridade celular também são escassos, pois ainda não é compreendido, por exemplo, como ocorre a escolha do local de polarização (Brand e Gow, 2009; Harris, 2011).

Em contrapartida, a localização dos polarissomas é definida pelo complexo protéico GTP dependente. As GTPases funcionam como interruptores moleculares na polaridade, morfogênese e divisão celular. O complexo Cdc42-GDP, por exemplo, é recrutado pela Cdc24 que o ativa pela troca de GDP por GTP. O GTP-Cdc42, por sua vez, recruta o adaptador de proteína Bem1 que estabiliza Cdc24 no sítio de polarização e traduz o sinal para múltiplos efetores que repassam o sinal para o citoesqueleto de actina. Enquanto isso, um grupo de GTPases (GAPs) estimula a hidrólise do GTP, resultando na inativação do Cdc42 e finalização do crescimento polarizado (Harris e Momany, 2004; Harris, 2011). A levedura do pão, *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, possui cinco pequenas GTPases, pertencente a família das proteínas Rho, todas requeridas no estabelecimento e manutenção da polaridade (Banuett *et al.*, 2008).

Além das vias descritas anteriormente, existem outras que também demonstram importância na manutenção da polaridade. Os campos elétricos formados a partir do influxo de cálcio gerado pela abertura dos transportadores Mid1-Cch1 na membrana plasmática também são capazes de sinalizar e orientar o crescimento hifal pela ativação de proteínas envolvidas na morfogênese celular, como Rsr1/Bud1 (Brand e Gow, 2009). Estudos também demonstram que o fluxo de outros íons, como H⁺ e Cl⁻, também são capazes de regular o crescimento polarizado, pois existem diferenças espaciais e temporais no fluxo desses íons nas

regiões de crescimento, além de alterações no gradiente de pH intra e extracelular (Hepler *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2008a,b, 2009a)

Estudos realizados em *Aspergillus nidulans*, por exemplo, também apontam correlação entre o crescimento normal das hifas com os processos de endocitose, também regulado pelas GTPases do tipo Rac1 (Hervás-Aguilar *et al.*, 2010). Os sítios de endocitose estão presentes na região subapical de hifas e tubos germinativos. Acredita-se que esses sítios estejam associados ao crescimento hifal por meio da reciclagem do material polarizado encontrado nas pontas das hifas. Essa “reciclagem apical” ocorre pelo balanço preciso entre endocitose e exocitose, capaz de auxiliar o crescimento hifal e o formato celular (Shaw *et al.*, 2011).

O crescimento polarizado em hifas fúngicas também é caracterizado pela formação de, pelo menos, quatro regiões distintas na célula. Os primeiros micrômetros da hifa contêm o Spitzenkörper, mitocôndrias e, ocasionalmente, retículo endoplasmático. A segunda região é formada por mitocôndrias, cisternas do retículo endoplasmático e outras organelas maiores, incluindo o núcleo. A terceira região, que se estende até o primeiro septo, possui a coleção completa de organelas celulares. Por fim, a região distal do septo, que corresponde ao segmento mais velho da hifa, também possui todas as organelas, contudo a estrutura e abundância são diferentes das observadas na região apical e subapical (Riquelme *et al.*, 2011).

A orientação do crescimento polarizado, portanto, envolve um conjunto de sistemas celulares promovidos pela sinalização do cálcio, ATPases, GTPases e proteínas que coordenam o sítio de recrutamento do citoesqueleto. Todo esse aparato torna o crescimento eficaz e distribui de maneira ordenada as organelas pela célula, seja na formação de brotos ou hifas (Chant, 1999; Banuett *et al.*, 2008).

2.3 Fatores envolvidos no crescimento polarizado de fungos

Os fatores envolvidos no crescimento polarizado são, na realidade, efetores que carregam consigo a mensagem de iniciar o processo de crescimento polarizado. Antes de apresentá-los, é necessário dizer que as células fúngicas são exigentes e requerem condições mínimas para permitir que a transição levedura-hifa ocorra normalmente. Os fungos necessitam de quantidades adequadas de nutrientes, seja fonte de carbono ou nitrogênio, aminoácidos e oxigênio para obter condições que permitam a formação de hifas (Szabo e Stofaníková, 2002; Mansour *et al.*, 2009;

Walther *et al.*, 2011a,b). Alguns autores sugerem inclusive, que a matriz extracelular, formada por essas condições, são por si efetores do crescimento polarizado (Barth e Gaillardin, 1997; Kim *et al.*, 2000; Cervantes-Chávez e Ruiz-Herrera, 2006).

Os hormônios ou ferormônios, como chamado por alguns, provavelmente tenham sido os primeiros efetores descritos como moduladores do crescimento polarizado. A presença de hormônios auxínicos no crescimento de fungos, por exemplo, foram descritos nas décadas de 1940 e 1950, exatamente a mesma época em que era descrito em plantas. Contudo, seus estudos se intensificaram em células vegetais, tanto que passou a ser conhecido como fitormônio (Robinson e Stier, 1941; Yanagishima e Shimoda, 1968).

Apesar disso, estudos recentes têm procurado estabelecer a importância da auxina no desenvolvimento de hifas fúngicas. Prusty e colaboradores (2004) demonstraram que concentrações altas (250 μM) de ácido indol-3-acético (AIA), um tipo predominante de auxina e biologicamente mais ativa, inibem o crescimento celular, enquanto baixas concentrações (120 μM) induzem a formação de filamentos pseudohifais e a adesão celular em *S. cerevisiae*. Lobão (2012) demonstrou que concentrações ainda mais baixas de auxina (pMol e fMol) são suficientes na promoção do crescimento polarizado em *Y. lipolytica*. Além disso, o trabalho demonstrou o comportamento sinoidal das concentrações de auxina na promoção do dimorfismo, ou seja, o composto realmente possui modo de ação semelhante a hormônios nas células fúngicas. Esses resultados indicam a existência de uma possível via de transição levedura-hifa dependente de auxina.

Também existem outras moléculas do *quorum sensing* envolvidas em promover ou prevenir a mudança morfológica. Esses compostos são produzidos e eliminados naturalmente pelas células eucarióticas, atuando sobre as demais células da população. Quanto maior a densidade da população, maior será o acúmulo dessas moléculas capazes de gerar informações. As moléculas *quorum sensing* mais estudadas são aquelas produzidas pela *C. albicans*, como o triptofol, álcool feniletíl, farnesol, tirosol e ácido farnesóico (Han *et al.*, 2011).

As moléculas triptofol, álcool feniletíl e o farnesol estão relacionadas à inibição do crescimento e à prevenção na filamentação, enquanto o tirosol acelera a transição dimórfica em baixa densidade de células. Desses, o farnesol é a molécula mais bem caracterizada por ser mais ativa que as demais e por agir como

bloqueador da transição levedura-hifa em alta densidade de células, até mesmo na presença de efetores que induzem a filamentação em *C. albicans*, como soro, prolina ou N-acetilglicosamina (Han *et al.*, 2011).

A homeostase de Ca^{2+} também está relacionada na manutenção do crescimento polarizado. Em *N. crassa*, os canais de Ca^{2+} ativados por inositol 1,4,5-trifosfato são fundamentais no crescimento filamentosos (Silverman-Gavrila e Lew, 2003; Riquelme *et al.*, 2011). As células de *C. albicans* cultivadas em meio pobre em Ca^{2+} ou com os canais de Ca^{2+} bloqueados apresentam inibição no crescimento polarizado (Brand *et al.*, 2007). Células de *S. pombe* mutantes para a Cta4 ATPase localizada no retículo endoplasmático, proporciona o aumento no nível de Ca^{2+} nuclear e citoplasmático e na atividade da fosfatase Ca^{2+} /CaM-dependente calcineurina e, como consequência, na morfologia celular e na organização dos microtúbulos (Okorokova-Façanha *et al.*, 2002; Lustoza *et al.*, 2011).

A homeostase de H^+ também está relacionada ao crescimento filamentosos. Ramos e colaboradores (2009a) demonstraram que a sinalização por prótons é importante no crescimento polarizado de células hifais. Os autores encontraram oscilações espaciais e temporais no fluxo de H^+ ao longo das células de fungos micorrízicos, representados pela *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum*, durante os eventos iniciais da associação simbiótica planta e fungo. Os autores sugeriram que a sinalização protônica é promovida pelas H^+ -ATPases e isoformas distribuídas assimetricamente ao longo dos filamentos hifais e ativadas pela disponibilidade de nutrientes e exsudados do sistema radicular da planta hospedeira.

Concomitante ao fluxo de prótons, o gradiente de pH entre as membranas também é importante indutor na morfogênese, pois alguns fungos dimórficos, como *Y. lipolytica* e *C. albicans*, crescem preferencialmente como leveduras em pH ácido, enquanto o crescimento de hifas é favorecido em meios cujo pH está próximo da neutralidade ou seja básico (Ruiz-Herrera e Sentandreu, 2002). Todavia, essa característica não é regra para todos os fungos, pois *U. maydis* se comporta de maneira inversa, formando hifas mais facilmente em pH ácido (Kim *et al.*, 2000). A mudança do pH extracelular mediada pela excreção de amônia, por exemplo, desempenha função crucial na comunicação entre colônias de leveduras, influenciando na forma e na taxa de crescimento celular (Palková *et al.*, 1997; Palková *et al.*, 2002).

Espécies reativas de oxigênio (ERO), em particular, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), também são reconhecidas como possíveis moléculas sinalizadoras em organismos eucarióticos, apesar do pouco conhecimento sobre sua regulação. Em *C. albicans*, as ERO possuem efeito semelhante ao farnesol, pois inibe o crescimento de hifas, regula o desenvolvimento de biofilmes, promove a morte celular programada, além de induzir a variabilidade genética pela incorporação de DNA extracelular proveniente de células mortas aos cromossomos de células competentes (Cáp *et al.*, 2012). Dentre as ERO, outra molécula tem chamado a atenção, o óxido nítrico (NO). Esse composto parece desempenhar função importante na sinalização do crescimento filamentosos em micro-organismos. Em *Y. lipolytica*, pequenas concentrações (25 μM) de doadores de NO (SNP) estimulam a morfogênese celular, enquanto altas concentrações (100 μM) bloqueiam a transição dimórfica e inibem o crescimento da células (Dutra, 2010).

Apesar disso, a presença de NO em fungos ainda é um assunto controverso, devido à ausência de genes ortólogos às enzimas de síntese, apesar de recentes relatos da possível atividade da NO sintase em leveduras (Almeida *et al.*, 2007; Kig e Temizkam, 2009). O NO é apontado como um possível intermediário na cascata de sinalização regulada pela auxina (Correa-Aragunde *et al.*, 2006). Zandonadi e colaboradores (2010) demonstram que doadores de NO (SNP ou GSNO) promovem o crescimento radicular em milho mediado por 20 $mg L^{-1}$ de ácido húmico ou 100 pmol de AIA.

Outro grupo de moléculas apontadas como possíveis efetores do crescimento polarizado em hifas são as poliaminas. Estudos demonstram que variações nos níveis dessas moléculas causam a transição levedura-hifa em *Y. lipolytica* (Guevara-Olvera *et al.*, 1993), *P. brasiliensis* (San-Blas *et al.*, 1997) e *C. albicans* (Ueno *et al.*, 2004). Essas moléculas serão melhor discutidas mais adiante.

2.4 Vias de sinalização da transição dimórfica

Após citar alguns efetores do crescimento polarizado, é importante conhecer as vias de sinalização que regem a sinfonia do crescimento polarizado em hifas. Apesar dos fungos terem divergido evolutivamente de um ancestral comum aos animais multicelulares entre 800 e 1.000 milhões de anos atrás, por isso possuem cascatas de sinalização mais semelhantes às células de mamíferos do que plantas, algas,

bactérias ou arqueobactérias. A *S. cerevisiae*, por exemplo, expressa, pelo menos, três membros da proteína G e possui a cascata das MAP quinases (MAPK) que são proteínas altamente conservadas em células de mamíferos. Além disso, muitos componentes de transdução de sinais são mantidos desde leveduras a humanos. Assim, o estudo da sinalização em fungos também promete revelar mecanismos conservados aos organismos superiores, principalmente no que diz respeito a transdução de sinal (Lengeler *et al.*, 2000).

A morfogênese celular em fungos pode ser regulada por diversas vias que levam ao crescimento polarizado das hifas, dentre elas, duas cascatas de amplificação são altamente conservadas: a cascata das MAPK e a cascata da proteína quinase A (PKA), ambas ativadas pelas GTPases (Han *et al.*, 2011).

A via da PKA envolve a enzima adenilato ciclase e a proteína quinase A dependentes de AMP cíclico, as quais ativam os fatores de transcrição que induzem ou reprimem a expressão de genes do crescimento hifal (HWP1, HYR1 e ALS1) (Cervantes-Chávez e Ruiz-Herrera, 2006). A MAPK inicia a sinalização quando um fator de crescimento se liga ao seu receptor na membrana plasmática. A seguir, a proteína adaptadora Grb2 é recrutada: essa proteína possui um domínio SH₂, que reconhece um resíduo de tirosina (Tyr) fosforilado no receptor ativado. A outra extremidade da Grb2 liga-se ao Sos, um fator de permuta de nucleotídeos de guanina. Este, por sua vez, liga-se à proteína Ras, localizada na superfície interna da membrana celular. Ras é uma GTPase pequena, que possui uma conformação quando ligada a GTP e outra quando ligada a molécula de GDP. A interação Grb2 e Sos estimula Ras a alterar sua ligação de GDP para GTP, causando alteração conformacional (Downward, 1997; Yamazaki *et al.*, 2002). A nova conformação de Ras ativa a quinase inicial das MAPK. A primeira quinase dessa cascata é a MAP-quinase da quinase da quinase, quando ativada fosforila os resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr) da quinase seguinte, a MAP-quinase da quinase. Essa segunda proteína ativada, por sua vez, fosforila e ativa a MAP-quinase que fosforila vários substratos, incluindo ativadores da transição dimórfica (Han *et al.*, 2011; Cervantes-Chávez e Ruiz-Herrera, 2006).

Em *S. cerevisiae*, apesar de não ocorrer formação de hifas verdadeiras, ambas as cascatas de amplificação são encontradas e ativadas durante a transição de leveduras para pseudohifas. As MAPK são ativadas por fatores externos e a

cascata atua em sequência até chegar ao complexo Fus3/Kss1 (**Figura 1**). A proteína Fus3 inibe o crescimento filamentososo, enquanto Kss1 ativa a formação de pseudohifas. Dependendo da resposta que chega ao complexo, se a interação entre as proteínas similares Rst1/Rst2 com o fator de transcrição Ste12 for quebrada após a fosforilação, ocorre a expressão gênica de interesse (Liu *et al.*, 1993; Tedford *et al.*, 1997; Madhani *et al.*, 1997).

Recentemente, vias homólogas ao Fus3/Kss1 das MAPK também tem sido identificada em outros fungos, como *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae*, *Puccinia striiformes* (Guo *et al.*, 2011) e *Fusarium proliferatum* (Zhao *et al.*, 2011). Em todos esses casos, a sinalização gerada por essa cascata é considerada importante na formação de apressórios, no crescimento de hifas fúngicas e na patogênese de fungos, além de regular o crescimento e os processos de diferenciação celular (Xu, 2000). A via da PKA, por sua vez, é formada pelas proteínas G (Gpa2 e Ras2), adenilil ciclase (AC), AMP cíclico (cAMP) e proteínas quinases dependentes de AMP cíclico. A subunidade catalítica de Tpk2 regula positivamente a filamentação por regular o fator de transcrição Flo11 (**Figura 1**).

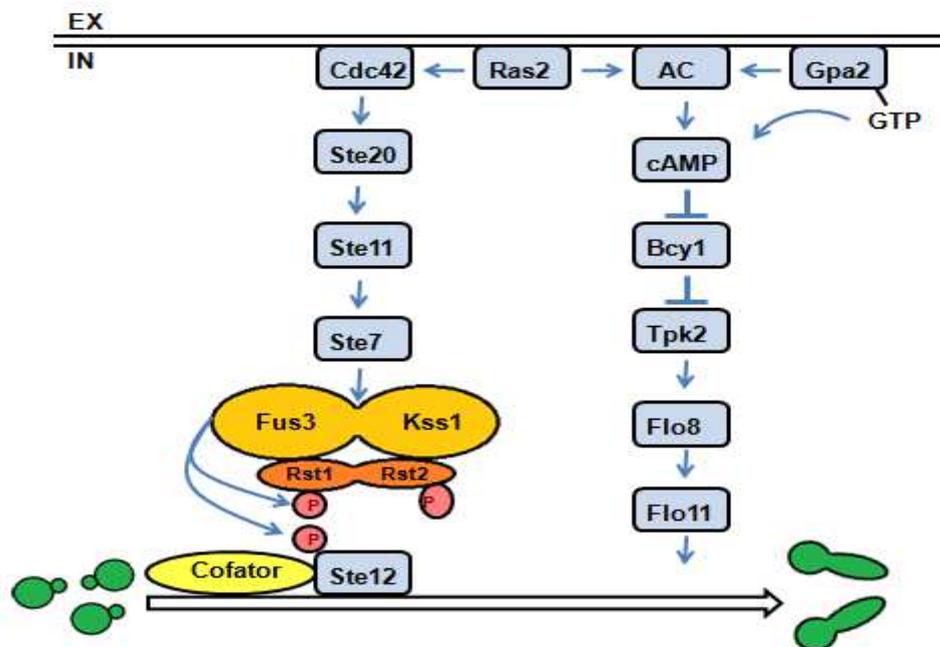


FIGURA 1. Vias de sinalização da transição dimórfica em *S. cerevisiae*. Duas cascatas de sinalização regulatórias do crescimento de pseudohifas em *S. cerevisiae*: a cascata das MAPK e a via da PKA. Na via das MAPK, a proteína Fus3 desfosforila e Kss1 fosforila as proteínas Rst1/Rst2. A fosforilação ativa o fator de transcrição Ste12 e promove a transição levedura-pseudohifa. Na via da PKA, a amplificação inicia com a produção de AMP cíclico pela adenilil ciclase (AC) e se propaga até chegar ao fator de expressão Flo11, que também promove o crescimento polarizado de pseudohifas. FONTE: Adaptado de Tedford *et al.* (1997) e Lengeler *et al.* (2000).

Em *C. albicans*, as GTPases, formadas por Gpa2, Ras1 e Cdc42, ativam a via das MAPK e a PKA. As MAPK regulam o fator de transcrição Cph1, enquanto a PKA regula o fator Efg1, ambos reguladores positivos do crescimento filamentoso. A amplificação da cascata MAPK ocorre por sucessivas fosforizações das proteínas Cst20, Hst7 e Cek1, enquanto a PKA é ativada pelo AMP cíclico produzido pela adenilato ciclase (Cdc35) (Whiteway, 2000; Liu, 2001). A adenilato ciclase pode ser ativada pelas proteínas G (Gpr1 e Gpa2), as quais respondem pela deficiência de glicose ou presença de metionina no meio de cultivo, além de atuar como sensores dos níveis de CO₂ e peptidoglicano, enquanto a deficiência de nitrogênio ativa a MAPK e PKA via amônio permease (Mep2) (Figura 2)(Han *et al.*, 2011).

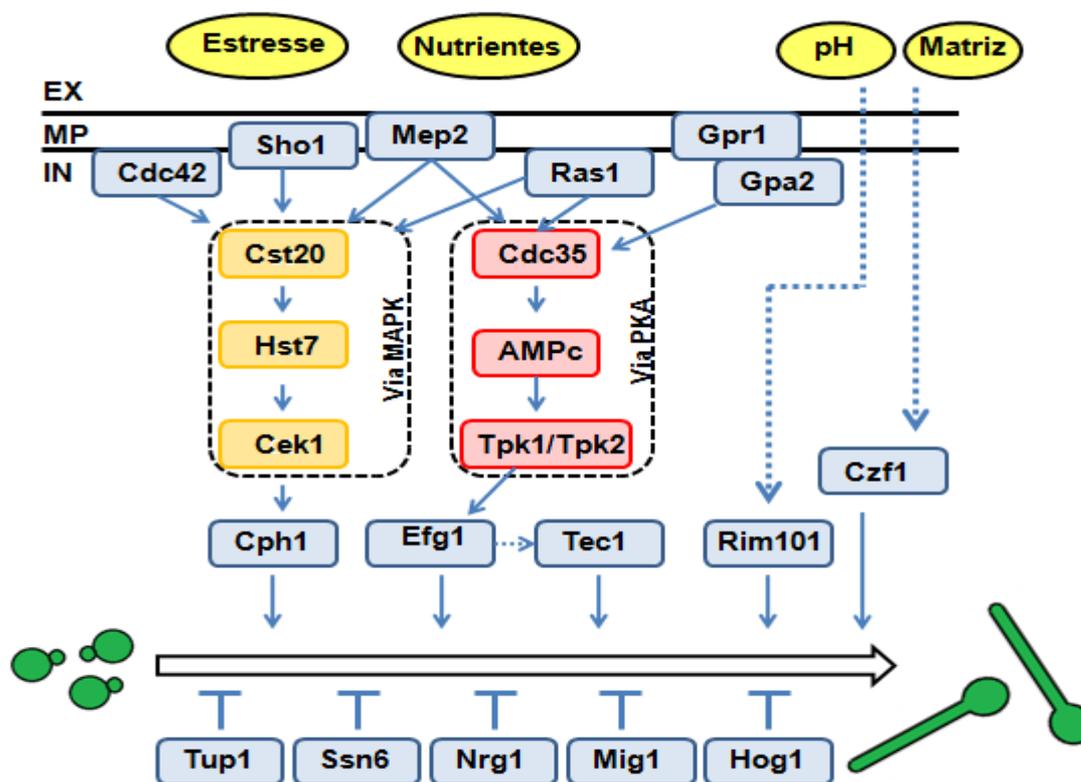


FIGURA 2. Via de sinalização da transição dimórfica em *C. albicans*. As GTPases (Cdc42, Ras1, Gpa2) ativam duas vias de sinalização: a MAPK e a via da PKA dependente de AMP cíclico, os quais ativam os fatores de transcrição Cph1 e Efg1, respectivamente, ambos promotores do crescimento filamentosos. A cascata da MAPK é ativada por sucessivas fosforizações das proteínas Cst20, Hst7 e Cek1, enquanto a via da PKA é ativado pela adenilato ciclase (Cdc35) e o complexo Tpk1/Tpk2 dependente da presença de AMP cíclico. A falta de nitrogênio ativa MAPK e PKA via amônio permease (Mep2). A adenilato ciclase também é ativada pela proteína G (Gpr1 e Gpa2), ativados pela deficiência de glicose e metionina, além de atuar como sensor para CO₂ e peptidoglicanos. Existem outros fatores de transcrição do crescimento filamentosos independentes da cascata das MAPK e PKA, como Czf1 e Rim101, ativados pela presença de ágar ou alcalinidade do pH extracelular, respectivamente. As proteínas Tup1, Ssn6, Nrg1, Mig1 e Hog1, por sua vez, quando ativadas evitam a transição dimórfica do organismo. (EX) Extracelular; (MP) Membrana plasmática; (IN) Intracelular. FONTE: Adaptado de Han; Cannon e Villas-Bôas (2011).

Quando os fatores Cph1 e Efg1 são deletados, as células leveduriformes de *C. albicans* são defeituosas e incapazes de formar hifas (Lo *et al.*, 1997). A deleção dos genes Cts20 ou Hst7 da cascata das MAPK também inibe a transição, entretanto, a superexpressão de Hst7 complementa a deleção de Cts20 e permite a transição dimórfica do organismo. Os resultados indicam a presença de diversas vias capazes de regular o crescimento hifal em *C. albicans* (Madhani e Fink, 1998).

Outros efetores também são ativados independentemente da via das MAPK e PKA, como Czf1 e Rim101, que respondem pela presença de ágar ou pela alcalinidade do pH extracelular, respectivamente. As proteínas Tup1, Ssn6, Nrg1, Mig1 e Hog1 representam os reguladores negativos do crescimento filamentosos no micro-organismo (**Figura 2**) (Han *et al.*, 2011).

Apesar das disparidades nas sinalizações de cada organismo, existem evidências de similaridades entre o crescimento de pseudohifas de *S. cerevisiae* e o crescimento hifal de *C. albicans*. O gene Ste12 em *S. cerevisiae* é homólogo ao gene Cph1 em *C. albicans* (Whiteway, 2000). Os genes Ste20, Ste7 e Kss1 de *S. cerevisiae* também apresentam os homólogos Cst20, Hst7 e Cek1 em *C. albicans*, respectivamente. Praticamente todos esses genes apresentam a mesma função e estão ligados à transição dimórfica (Leberer *et al.*, 1996; Madhani e Fink, 1998).

Na *Y. lipolytica*, a sinalização para ocorrer a morfogênese inicia na membrana da célula, pela interação entre fatores externos com os receptores fosfatidilinositol e fosfatidilcolina. Cepas mutantes, nocauteadas para o gene Sec14, responsável pelo código das transferases de fosfatidilinositol e fosfatidilcolina na membrana, são incapazes de promover a diferenciação de leveduras para hifas (Lopes *et al.*, 1994). A sinalização prossegue no interior celular com as cascatas das MAPK e da PKA, que atuam em conjunto na regulação da transição dimórfica, além de outros efetores, como Rim101 ativado pelo pH extracelular e que não passam por essas vias, como observado na **Figura 3** (Cervantes-Chávez e Ruiz-Herrera, 2006, 2007).

A adição de AMP cíclico exógeno, mensageiro da PKA, é capaz de inibir a transição dimórfica em *Y. lipolytica* (Ruiz-Herrera e Sentandreu, 2002). A PKA é formada por dois dímeros, quando a concentração de AMP cíclico aumenta pela atividade da adenilato ciclase ou pela entrada desse nucleotídeo na célula, essas moléculas se ligam a cada uma das subunidades da PKA (Rak1), tornando-a apta a fosforizar as proteínas alvos nos resíduos de serina e treonina. Todavia, a ativação

da PKA previne a transição levedura-hifa em *Y. lipolytica* (Cervantes-Chávez e Ruiz-Herrera, 2007).

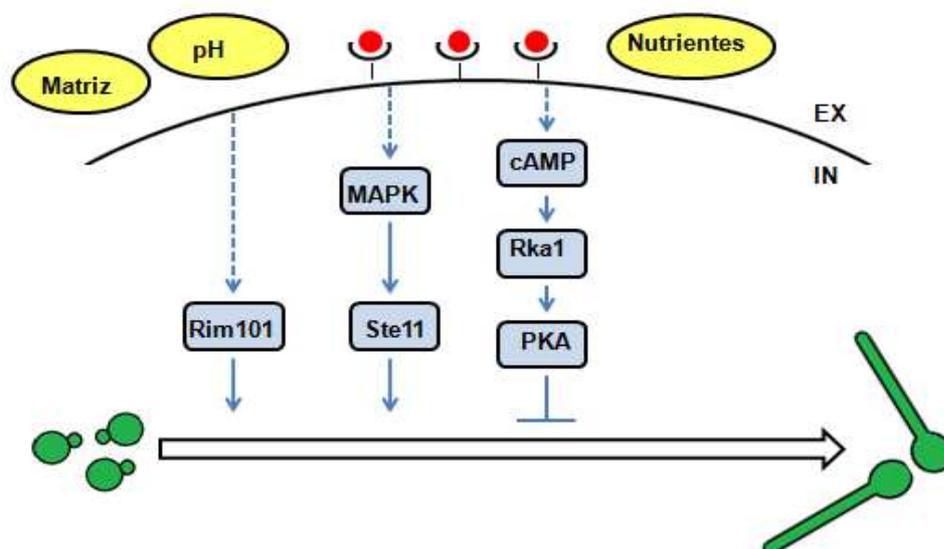


FIGURA 3. Sinalização para a transição dimórfica em *Y. lipolytica*. A sinalização inicia pela ligação de fatores externos aos receptores de membrana e a sinalização prossegue para o interior da célula. A sinalização desencadeada pela cascata das MAPK promove o crescimento filamentoso do fungo, pela ativação do fator de transcrição Ste11. A via da PKA, ativada pela atividade da adenilato ciclase ou pela entrada de AMP cíclico, ativa a PKA, que previne a formação de hifas verdadeiras. O fator de transcrição Rim101, ativado pela alcalinidade do pH extracelular, também promove o crescimento de hifas em *Y. lipolytica*. (EX) Extracelular; (IN) Intracelular.
 FONTE: Adaptado de Cervantes-Chávez e Ruiz-Herrera (2006 e 2007).

A cascata das MAPK formada pelas proteínas Cst20 e Hst7 amplifica a sinalização até a resposta chegar ao fator de transição, denominado Ste11, iniciador da transição dimórfica em *Y. lipolytica*. A deleção do gene que codifica a proteína Ste11p resulta em cepas mutantes incapazes de responder a fatores que normalmente induzem a transição. Além disso, o gene é expresso somente em condições em que o crescimento hifal é observado (Cervantes-Chávez e Ruiz-Herrera, 2006).

Os estudos em diferentes fungos dimórficos revelam a existência de pelo menos duas vias de sinalização capazes de regular a morfogênese que são conservadas, a cascata das MAPK e a via da PKA, não só nesses três fungos citados aqui, mas em outros também (Lengeler *et al.*, 2000). Todavia, é possível perceber a flexibilidade na via que regula a transição dimórfica, podendo ocorrer

alterações de acordo com as variações ambientais. Esse tipo de estudo tem ensinado sobre os princípios da conservação na transdução de sinal mantidos até aos vertebrados superiores. Além disso, estas vias representam excelentes alvos no desenvolvimento de drogas anti-fúngicas (Lengeler *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2011).

2.5 A *Y. lipolytica* como organismo modelo de crescimento polarizado

Desde a década de 1960, a *Y. lipolytica* é continuamente estudada, principalmente após a descoberta da capacidade em produzir metabólitos como ácido cítrico e ácido α -cetoglutarato em escala comercial. Além disso, o fungo pode ser utilizado na produção de alimentos agroindustriais, produtos farmacêuticos e proteínas heterólogas como proteases, lipases, fosfatases, RNAses e esterases, na biotransformação de esteróis, no tratamento de resíduos (Fickers *et al.*, 2005) e na produção de biodiesel microbiológico (Tsigie *et al.*, 2011). A *Y. lipolytica* também é utilizada como agente biorremediador de solos e águas contaminadas por derramamento de petróleo ou contaminadas por 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), além de detoxificar ambientes com excesso de metais pesados, como cobre, alumínio, selênio, níquel, cobalto, cádmio e zinco. Os metais ficam aderidos à parede celular da levedura ou são internalizados para o citosol e armazenados nos vacúolos (Bankar *et al.*, 2009; Nicaud, 2012).

Desde a sua descoberta, em 1945 nos Estados Unidos da América, em um frasco de rejeitos de fibras de milho, a *Y. lipolytica* foi isolada em diferentes substratos, desde queijos e salsichas até em solos, esgotos e ambientes poluídos por óleos (Fickers *et al.*, 2005). A notória plasticidade aliada ao fato de produzir compostos de alto valor agregado a partir de fontes baratas e abundantes, despertaram cedo o interesse da indústria pelo fungo. A *Y. lipolytica* é capaz de crescer em parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho, óleo de algodão (Cirigliano e Carmam, 1984), óleo de canola (Sarubbo *et al.*, 2007), outros alcanos, alcenos, ácidos graxos ou triacilgliceróis (Barth e Gaillardin, 1997; Beopoulos *et al.*, 2009), além de meio contendo ácido acético (Augstein *et al.*, 2003) ou etanol (Chernyavskaya *et al.*, 2000).

A ocorrência dessa levedura “não-convencional” está relacionada a sua atividade lipolítica e proteolítica, além de crescer normalmente entre 5 e 10° C e em pHs ácidos (Szabo e Stofaníková, 2002; Fickers *et al.*, 2011). O crescimento da *Y.*

lipolytica é limitado apenas pela presença de oxigênio e temperaturas amenas, pois são aeróbicas obrigatórias e não crescem em temperaturas acima de 32° C (Fickers *et al.*, 2005; Christen e Sauer, 2010).

A assimilação dos substratos hidrofóbicos se inicia pela formação de pequenas gotículas dos compostos na superfície celular, que posteriormente são internalizadas, por via ainda desconhecida. Alguns autores sugerem que esses compostos se aderem à parede celular, são solubilizados e difundem-se para o interior (Barth e Gaillardin, 1997; Fickers *et al.*, 2005). Depois de entrar, essas substâncias são hidrolisadas pela citocromo P-450 monooxigenase, localizada na membrana do retículo endoplasmático. O álcool formado pode ser oxidado pela álcool oxidase nos peroxissomos ou reduzido pela álcool desidrogenase no retículo endoplasmático. Os ácidos graxos formados podem, então, ser ativados pela ácido graxo acil-CoA sintetase I, no retículo endoplasmático, ou pela ácido graxo acil-CoA sintetase II, localizada nos peroxissomos, para entrar na via da β -oxidação, na formação de acetil-CoA e propionil-CoA, que prosseguem para o ciclo do ácido cítrico ou do glioxilato. Além disso, os ácidos graxos podem ser estocados como triacilgliceróis ou ésteres em corpos lipídicos (Fickers *et al.*, 2005).

Em termos taxonômicos, a *Y. lipolytica* pertence ao Filo Ascomycota, subclasse Hemiascomycota. Inicialmente, a espécie foi nomeada *Candida lipolytica*, posteriormente passou a ser conhecida como *Endomycopsis lipolytica* ou *Saccharomycopsis lipolytica*, e finalmente, após a descoberta do ciclo de vida completo, passou a ser *Y. lipolytica* (Barth e Gaillardin, 1997). Apesar dos desacordos, muitos taxonomistas definem a espécie como membro do clado *Metschnikowia/Stephanoascus*, também formado pela *Arxula* e *Candida*. A decisão foi tomada a partir da análise na sequência dos domínios D1/D2 da subunidade 26S do RNA ribossômico dos ascomicetos (Fickers *et al.*, 2005).

O ciclo de vida da *Y. lipolytica* é caracterizado por uma fase haplóide e outra diplóide, dito ciclo de vida haplo-diplóide, ambas de similar importância para o fungo. As fases podem ser distinguidas durante a divisão celular, as células haplóides possuem um padrão axial de divisão, em que células mãe e filha formam seus brotos na adjacência do sítio de separação. As células diplóides possuem um padrão bipolar de divisão, células mãe e filha realizam o brotamento nos pólos de suas células elipsóides, em lados opostos (Chant, 1999).

A espécie em questão possui o cariótipo formado por seis cromossomos, algumas cepas tiveram toda a sequência de nucleotídeos determinada por Dujon e colaboradores em 2004 e estão disponíveis em bancos gênicos (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/> ou <http://www-sequence.stanford.edu/group/>). A análise comparativa revelou baixa similaridade com outras leveduras. O índice de semelhança nas sequências de aminoácidos, por exemplo, ficou entre 50 e 60% com *S. cerevisiae* e *C. albicans*, respectivamente. A *Y. lipolytica* aparenta possuir divergência evolutiva prematura das leveduras mais estudadas atualmente. O fungo possui genoma grande e redundante, com tendências para a dispersão, com genes parálogos e que não codificam RNA. As demais leveduras possuem um genoma restrito, com repetições em tandem, número reduzido de íntrons e capacidade de duplicar seus genes de maneira ordenada (Dujon *et al.*, 2004).

A *Y. lipolytica* é tida como modelo de estudo no metabolismo de alcanos e ácidos graxos, na dinâmica dos peroxissomos, na secreção de proteínas e no estudo do complexo mitocondrial I (Mauersberger *et al.*, 2001; Beopoulos *et al.*, 2009; Fickers *et al.*, 2011; Nicaud, 2012). Esse fungo também tem se destacado na geração de conhecimentos básicos, pois a *Y. lipolytica* possui campos emergentes de pesquisa, como organismo modelo na biogênese de corpos lipídicos e homeostase lipídica, no estudo do processamento dos íntrons, assim como no processamento alternativo, além de modelo para estudos voltados a evoluções adaptativas e genômicas (Nicaud, 2012).

Todavia, o maior interesse, no presente momento, é a oportunidade de utilizar a *Y. lipolytica* como modelo no dimorfismo celular em fungos. Apesar de existirem outros modelos, como *N. crassa* (Riquelme *et al.*, 2011), *C. albicans* (Brown e Gow, 1999; Herrero *et al.*, 1999; Whiteway, 2000; Liu, 2001; Ueno *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2011) e outros (Ocampo *et al.*, 2009), a *Y. lipolytica*, mostra-se outra opção de estudo (Kim *et al.*, 2000; Jiménez-Bremont *et al.*, 2001; Cervantes-Chávez e Ruiz-Herrera, 2006, 2007; Morales-Vargas *et al.*, 2012).

Outras leveduras apresentam restrições no estudo da morfogênese celular, pois a *C. albicans* representa um modelo difícil na análise genética, por possuir genoma diplóide e *S. cerevisiae* não forma hifa verdadeira e, mesmo o desenvolvimento de pseudohifas, ocorre em condições limitadas. Por esse motivo,

as pesquisas envolvendo o dimorfismo celular estão encaminhando para o uso da *Y. lipolytica* (Herrero *et al.*, 1999; Kawasse *et al.*, 2003).

A *Y. lipolytica* apresenta naturalmente as duas morfogêneses predominantes nos fungos: o crescimento leveduriforme e o crescimento hifal (Harris, 2011; Nicaud, 2012). Além disso, o micro-organismo possui eficiente sistema genético de transformação, com morfologias facilmente distinguidas, e similaridades com o dimorfismo de *C. albicans*, principal fungo patogênico humano (Kawasse *et al.*, 2003; Nicaud, 2012). Apesar de não ser patogênica, a *Y. lipolytica* pode ser encontrada nas formas de leveduras, pseudohifas ou hifas verdadeiras (**Figura 4**). As leveduras são células ovóides e individualizadas. As pseudohifas são células mais alongadas, elipsóide e células-mãe e filha unidas nos septos. As hifas verdadeiras são facilmente identificadas, pois são longas e possuem padrão de ramificação caracterizado pelo crescimento polarizado (Berman e Sudbery, 2002). Os verdadeiros micélios são formados por hifas septadas de tamanhos variados e apenas um núcleo por septo (Barth e Gaillardin, 1997).

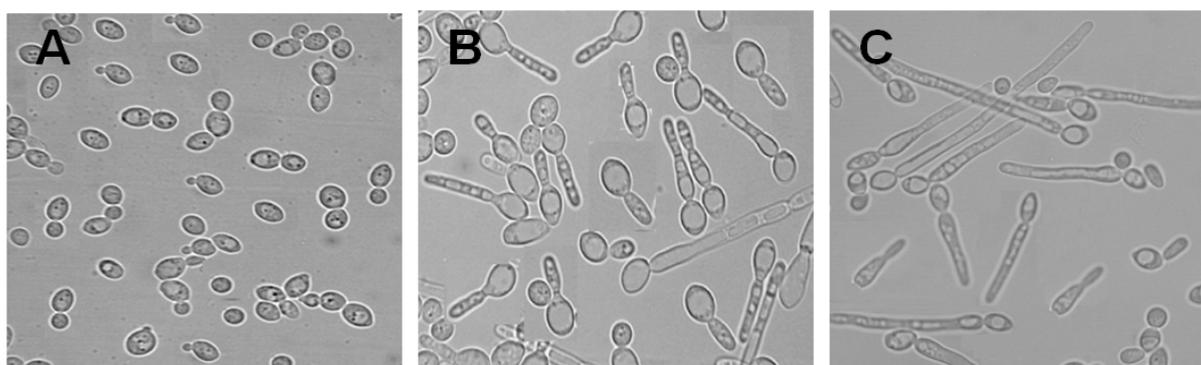


FIGURA 4. Morfologia das células de *Y. lipolytica*. Células leveduriformes (A), em forma de pseudohifas (B) e em formato de hifas (C). Células de *Y. lipolytica* crescidas em meio complexo líquido rico em glicose (YED) a 30° C e 250 rpm de rotação orbital.

2.6 Poliaminas em células fúngicas e vegetais

As poliaminas, como dito anteriormente, são apontadas como possíveis moléculas efetoras da morfogênese celular em fungos (Guevara-Olvera *et al.*, 1993; Herrero *et al.*, 1999). Essas pequenas moléculas são policatiônicas, possuindo dois ou mais grupo amino (NH_3^+), presentes em todos os organismos e capazes de atuar em vários processos fisiológicos. As poliaminas são encontradas em praticamente todos os compartimentos celulares, apesar de ocorrerem variações em espécie,

tecido, órgão e no estágio de desenvolvimento. Estudos determinaram a presença de pequenas frações dessas substâncias na parede celular, vacúolo, mitocôndria, cloroplastos e, inclusive, no núcleo em células vegetais (Kaur-Sawhney *et al.*, 2003).

As poliaminas são requeridas no crescimento e diferenciação celular, conferindo estabilidade à cromatina, membranas e canais iônicos, participando na expressão gênica, transcrição e transdução de sinais, regulação do ciclo celular, proliferação e sequestro de radicais livres em micro-organismos (Tabor e Tabor, 1985; Kuznetsov e Shevyakova, 2007). Em plantas, as poliaminas ainda participam na senescência, resposta ao estresse ambiental, infecções por vírus e fungos, embriogênese, rizogênese, tuberização, desenvolvimento floral e dos frutos (Galston *et al.*, 1997; Bais e Ravishankar, 2002; Silveira *et al.*, 2006; Carone *et al.*, 2010). Alguns estudos também demonstram que as poliaminas poderiam participar na produção de NO (Tun *et al.*, 2006; Yamasaki e Cohen, 2006). Além disso, os níveis de poliaminas variam durante o crescimento e desenvolvimento das células vegetais, assim como ocorre com auxina (Dias *et al.*, 2009). Todavia, a concentração de poliaminas (10^{-9} a 10^{-5} M) é muito superior aos fitormônios (10^{-13} a 10^{-7} M). Dessa forma, as poliaminas atuam como possíveis mediadores intracelulares (Kuznetsov e Shevyakova, 2007).

A atividade biológica das poliaminas ocorre devido à natureza catiônica, pois podem interagir com macromoléculas carregadas negativamente, como ácidos nucléicos, fosfolipídeos e proteínas. Essa interação reversível auxilia na estabilização do DNA, RNA transportador, membranas celulares e algumas proteínas (Kuznetsov e Shevyakova, 2007). As principais poliaminas são putrescina (put), espermidina (spd) e espermina (spm), carregadas com duas, três e quatro grupos aminos, respectivamente. As poliaminas mais comuns são putrescina e espermidina, presentes em todos os organismos. Espermina não está presente em bactérias e alguns fungos (Tabor e Tabor, 1984, 1985; Kaur-Sawhney *et al.*, 2003; Kuznetsov e Shevyakova, 2007).

2.6.1 Biossíntese e degradação das poliaminas

As poliaminas podem apresentar variações na via biossintética, dependendo do grupo de organismo. Contudo, a primeira poliamina produzida em qualquer um dos casos será a putrescina, ela servirá como substrato para a produção da

espermidina, a qual será utilizada para produzir a espermina (Tabor e Tabor, 1985; Kuznetsov e Shevyakova, 2007). A putrescina é produzida diretamente em todos os organismos vivos a partir da ornitina pela atividade da ornitina descarboxilase (ODC, EC 4.1.1.17). Outros organismos, principalmente bactérias e plantas, também podem utilizar uma via secundária, a partir da arginina, pela arginina descarboxilase (ADC, EC 4.1.1.19). Nesse caso, a arginina é transformada em agmatina (Agm).

A conversão da agmatina a putrescina requer duas enzimas distintas: a agmatina iminohidrolase (AIH, EC 3.5.3.12) que produz N-carbamoilputrescina e a N-carbamoilputrescina amidohidrolase (NCPAH, EC 3.5.1) que origina putrescina (Tabor e Tabor, 1984; Kuznetsov e Shevyakova, 2007). A produção de putrescina a partir da arginina, geralmente, está envolvida com respostas a agentes estressores, como drogas, salinidade, hipertermia, deficiência de potássio ou sulfatos. A via da ornitina descarboxilase normalmente é mais ativa (Kuznetsov e Shevyakova, 2007).

Algumas evidências sugerem que as enzimas arginina descarboxilase, agmatina iminohidrolase e N-carbamoilputrescina amidohidrolase foram inseridas por uma cianobactéria ancestral ao cloroplasto, por esse motivo a via é característica de bactérias e plantas (Illingworth *et al.*, 2003). Apesar dessa hipótese, a via também pode ser encontrada em alguns poucos fungos, como na micorriza arbuscular *Gigaspora rosea* (Sannazzaro *et al.*, 2004).

Espermidina e espermina são sintetizadas por sucessivas adições de um grupamento aminopropil à putrescina. Essas reações são catalisadas pelas aminopropiltransferases. A adição do primeiro grupo origina a espermidina, por ação da espermidina sintase (SPDS, EC 2.5.1.16), a adição do segundo grupo é catalisada pela espermina sintase (SPMS, EC 2.5.1.22). O grupo aminopropil é formado a partir da descarboxilação da S-adenosilmetionina (SAM) pela S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC, EC 4.1.1.50), a qual possui um tempo de vida relativamente curto e, por isso, é a enzima reguladora da síntese de espermidina e espermina. S-adenosilmetionina é produzido a partir da metionina, pela S-adenosilmetionina sintetase (SAMS, EC 2.5.1.6) e atua como doador do grupo aminopropil, observe **Figura 5** (Tabor e Tabor, 1985; Kuznetsov e Shevyakova, 2007).

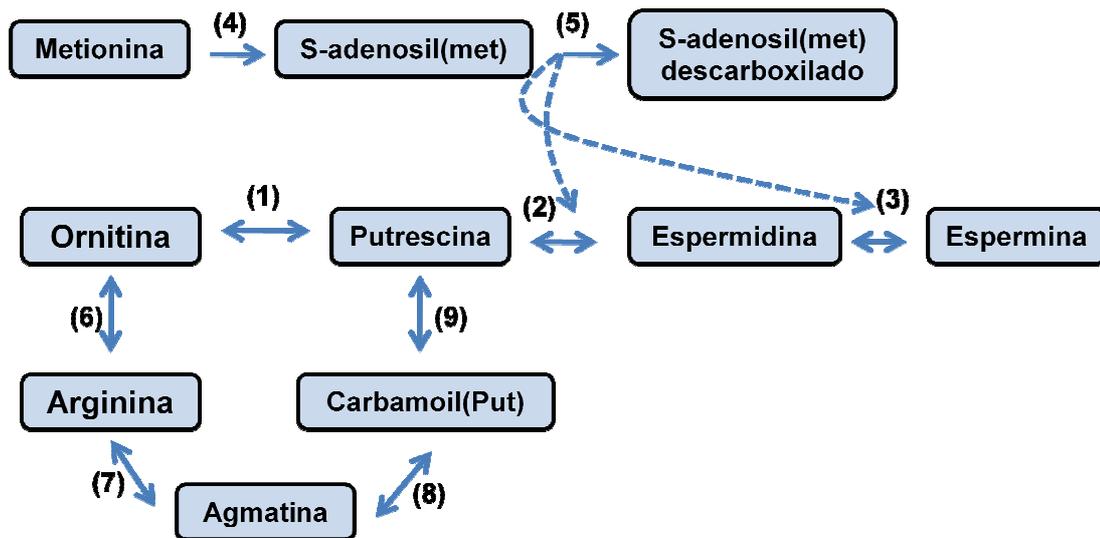


FIGURA 5. Biossíntese das poliaminas. As enzimas envolvidas na síntese de poliaminas são (1) ornitina descarboxilase, (2) espermidina sintase, (3) espermina sintase, (4) S-adenosilmetionina sintetase, (5) S-adenosilmetionina descarboxilase, (6) arginase, (7) arginina descarboxilase, (8) agmatina iminohidrolase e (9) N-carbamoilputrescina amidohidrolase.
 FONTE: Adaptado de Tabor & Tabor (1985) e Kuznetsov & Shevyakova (2007).

A atividade da primeira enzima da via biossintética das poliaminas, a ornitina descarboxilase é controlada pela quantidade de poliaminas presentes na célula. A enzima é regulada por retroalimentação negativa, ou seja, quanto maior a quantidade de produto formado, menor será a atividade da ornitina descarboxilase (Tabor e Tabor, 1985). A degradação das poliaminas em leveduras ocorre via poliamina oxidase (PAO), capaz de oxidar poliaminas acetiladas ou não, como espermina, N-acetilespermina e N-acetilespermidina. O produto final dessa reação é a ornitina, a mesma molécula que inicia a síntese das poliaminas, ou seja, a degradação das poliaminas produz o substrato original (Polticelli *et al.*, 2012).

A superexpressão dos cDNA heterólogos da ornitina descarboxilase ou da arginina descarboxilase causam o aumento na produção de putrescina, contudo, na maioria dos casos, ocorrem pequenas variações nos níveis de espermidina e espermina. Todavia, a superexpressão dos genes que codificam as enzimas SPDS e SPMS aumenta os níveis de espermidina ou espermina ou ambos. Esses resultados sugerem que as enzimas SPDS e SPMS participam mais ativamente na regulação homeostática desses compostos (Kaur-Sawhney *et al.*, 2003).

Testes também demonstraram a conservação da síntese de poliaminas no decorrer da evolução, pois o gene que codifica a ornitina descarboxilase (Spe1) do inseto *Spodoptera litura* (Noctuidae; Lepidoptera) possui 71% de similaridade com o

gene do verme *Bombyx mori*, além da funcionalidade mesmo depois de inserido em células mutantes de *S. cerevisiae*. Nesse caso, a levedura passou a produzir uma quantidade de enzima superior à cepa selvagem, a hipótese para explicar o fato seria a ausência do mecanismo regulador da transcrição e funcionamento do gene na levedura (Choi *et al.*, 2009).

2.6.2 Inibidores da síntese de poliaminas

A síntese de putrescina pela ornitina descarboxilase, por exemplo, pode ser regulada pela adição de análogos da putrescina ou da ornitina, como potenciais inibidores competitivos. Outra forma de regular a síntese é pela utilização de inibidores específicos, moléculas capazes de interagir irreversivelmente com os cofatores ou com a própria enzima. Os inibidores reversíveis são formados por análogos do produto ou do substrato (Walters, 1995). A α -metilornitina, por exemplo, compete pelo sítio do substrato, enquanto (E)-dehidroputrescina é um análogo do produto. Outros exemplos são α -hidrazinoornitina, 1-aminooxi-4-aminobutano e 1,4-diaminobutanona (DAB), todos inibidores competitivos da ornitina descarboxilase (Martinez *et al.*, 1990). Exemplos de inibidores irreversíveis da ornitina descarboxilase são α -difluorometilornitina (DFMO), α -metilornitina (MO) e dehidromonofluorometilornitina (Δ MFMO) (Walters, 1995).

Alguns α -fluorometil também foram sintetizados para prevenir a atividade da arginina descarboxilase em bactérias. Como exemplo, é possível citar a α -difluorometilarginina (DFMA), que atua de maneira semelhante ao DFMO. Contudo, a arginase pode, eventualmente, converter DFMA em DFMO e, assim causar a inibição da ornitina descarboxilase (Walters, 1995).

A síntese de espermidina e espermina pode ser regulada pela inibição da S-adenosilmetionina descarboxilase. O composto metilglioxal bis(guanilhidrazona) (MGBG) é um exemplo de inibidor competitivo dessa enzima. Todavia, o MGBG é capaz de produzir efeitos adversos, como inibir a oxidação de ácidos graxos e causar eventuais danos mitocondriais. Por esse motivo, o análogo etilmetilglioxal bis(guanilhidrazona) (EMGBG) foi desenvolvido, mas com efeitos mais específicos (Walters, 1995). Também existem outros inibidores específicos que inativam diretamente a espermidina sintase e, conseqüentemente a produção de espermina, como o ciclohexilamino (CHA) (Walters, 1995). Em *Gigaspora rosea*, o CHA diminui

a taxa de germinação dos esporos, o crescimento filamentosos e o número de brotos por esporo germinado, enquanto DFMO e DFMA não alteraram significativamente esses parâmetros (Sannazzaro *et al.*, 2004).

2.6.3 Transporte das poliaminas

Os níveis de poliaminas nas células são regulados pela biossíntese, degradação e transporte. Em *Escherichia coli*, aproximadamente 0,6% do número total de genes estão relacionados à homeostase das poliaminas. Nesse procarionte, os transportadores de poliaminas são formados por um sistema putrescina específico (PotFGHI) e outro espermidina preferencial (PotABCD). Ambos são transportadores do tipo ABC, formado por uma proteína substrato específica localizada no periplasma, duas proteínas canais e uma ATPase associada à membrana envolvida no suprimento energético. Este procarionte também possui o transportador PotE ativado pelo potencial eletroquímico e relacionada ao efluxo da putrescina (Igarashi e Kashiwagi, 1999).

Em micro-organismos eucarióticos, como *S. cerevisiae*, existem quatro tipos de proteínas envolvidas na homeostase de poliaminas (Dur3, Sam3, Gap1 e Agp2). Os transportadores Sam3 e Dur3 são os mais ativos (Uemura *et al.*, 2007). Nesse micro-organismo, existem também cinco proteínas envolvidas no efluxo das poliaminas (Tpo1, Tpo2, Tpo3, Tpo4 e Tpo5). Tpo1 e Tpo5 são os transportadores mais ativos (Igarashi e Kashiwagi, 2010), além de um transportador, Uga4, localizado na membrana vacuolar (Kashiwagi e Igarashi, 2011). Os transportadores Dur3 e Tpo1 são regulados pela fosforilação nos resíduos de serina e treonina (Uemura *et al.*, 2007), provavelmente envolvido com a via das MAPK ou PKA.

Alguns estudos também estão relacionando o transporte de poliaminas com a atividade das bombas do tipo P-ATPase. Essas bombas são transportadores de membrana e foram classificadas em cinco subfamílias P1-P5. O íon transportado pela P5-ATPase ainda não é conhecido, mas alguns estudos sugerem a relação das poliaminas com a bomba P5B-ATPase (Heinick *et al.*, 2010; De La Hera *et al.*, 2013). Apesar da maior parte dessas bombas transportar cátions metálicos, as P5-ATPases são mais semelhantes às P4-ATPases, que transportam fosfolipídeos, portanto o transporte de poliaminas não deve ser descartado (Graham, 2004).

Estudos conduzidos em células de roedores demonstram que o aumento da expressão gênica de genes pertencentes ao grupo destas bombas (ATP13A2) eleva o acúmulo de espermidina na célula, suportando a ideia de que as P5B-ATPases estão envolvidas na absorção de poliaminas (De La Hera *et al.*, 2013). A absorção de poliaminas também foi investigado no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Os resultados também sugerem que a proteína transportadora (CATP-5) pertencente ao grupo das P5B-ATPases representa um componente essencial no sistema de transporte de poliaminas, pois são capazes de alterar a quantidade de poliamina intracelular (Heinick *et al.*, 2010).

2.7 As H⁺-ATPases e o crescimento polarizado

As H⁺-ATPases representam uma grande família de enzimas eletrogênicas capazes de transportar carga elétrica (positiva) em forma de H⁺, através das membranas, utilizando a energia da hidrólise do ATP. Essas enzimas, também denominadas bombas protônicas, criam uma diferença de cargas elétricas entre as membranas e, simultaneamente, uma diferença nos níveis químicos de H⁺. O potencial de membrana (E_m) e o gradiente de concentração de prótons (ΔpH) são importantes fatores na manutenção da atividade celular em diversos níveis de ação (Pedersen e Carafoli, 1987; Nelson, 1992).

As H⁺-ATPases, especificamente as ATPases tipo P, fazem parte da “Teoria do Crescimento Ácido”, criada para explicar o crescimento polarizado em raízes vegetais pelos hormônios auxínicos. Essa teoria postula que bombas H⁺-ATPases, localizadas na membrana plasmática, são ativadas pelas auxinas e, em consequência, aumentam a extrusão de prótons para o meio apoplástico (entre a parede celular e a membrana plasmática de plantas). A acidificação da parede celular ativa enzimas que degradam e sintetizam novas paredes e, assim, permite o alongamento celular (Hager *et al.*, 1971; Rayle e Cleland, 1970; 1972). Apesar de a teoria ter sido desenvolvida em plantas, é possível especular que também ocorra no crescimento polarizado de fungos, devido ao compartilhamento de semelhanças entre células vegetais e fúngicas, inclusive na regulação das H⁺-ATPases que apresentam um padrão espaço-temporal diferencial de ativação em ambos os organismos (Gaxiola *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2008a,b; Zandonadi *et al.*, 2010).

Os hormônios auxínicos além de ativadores enzimáticos, também atuam como efetores genéticos. A acidificação causada pela H⁺-ATPase em resposta a auxina ativa uma cascata de eventos, pois além de ativar H⁺-ATPases pré-existentes, a auxina atua como mensageiro secundário na síntese de novas H⁺-ATPases, assim como a síntese de proteínas que catalisam o afrouxamento da parede celular, como as expansinas que clivam as ligações de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose e hemicelulose (Rayle e Cleland, 1992). A extensão celular é resultante da atividade de hidrolases específicas acionadas pelo pH ácido, como celulasas, hemicelulasas, glucanases e pectinases, pela absorção de água e nutrientes e pela atividade de enzimas da biossíntese da parede celular (Cosgrove, 1997).

Zandonadi e colaboradores (2010) corroboraram a teoria do crescimento ácido, pois determinaram aumento em até três vezes na atividade das H⁺-ATPases em raízes de milho na presença de 100 pmol de AIA ou 20 mg L⁻¹ de ácido húmico, utilizando os doadores de NO (SNP e GSNO) como possíveis mediadores da sinalização. Além disso, a expressão gênica das H⁺-ATPases aumenta durante o crescimento de tubos polínicos em *Nicotiana plumbaginifolia* (Riquelme *et al.* 2011). Lobão (2012) estendeu a teoria para os micro-organismos, quando determinou que concentrações de 10 pmol de AIA, ativam em 4-5 vezes o transporte de H⁺ e a expressão gênica das H⁺-ATPases em *Y. lipolytica* durante o crescimento hifal.

As principais bombas protônicas envolvidas na manutenção do crescimento são as H⁺-ATPases tipo P, encontradas funcionalmente ativas desde o retículo endoplasmático até a membrana plasmática, passando por todas as vesículas secretórias de leveduras, fungos e plantas (Samarão, 2003; Shan *et al.*, 2006; Gaxiola *et al.*, 2007; Duby e Boutry, 2009; Samarão *et al.*, 2009). Contudo, outra bomba protônica que também deve ser mencionada é a H⁺-ATPase tipo V ou ATPases vacuolares. Essas bombas foram inicialmente caracterizadas em membranas vacuolares (Pedersen e Carafoli, 1987; Bowman e Bowman, 1988), mas podem ser encontradas em todas as células eucarióticas, nas membranas intracelulares, vesículas sinápticas, tonoplastos, Golgi e vesículas derivadas do Golgi (Bowman e Bowman, 2002; Saroussi e Nelson, 2009; Samarrão *et al.*, 2009). As H⁺-ATPase tipo V também mantém o crescimento polarizado, pois a inativação do gene da subunidade Vma-1 dessa bomba interfere na morfologia e desenvolvimento de *N. crassa* e *C. albicans* (Bowman *et al.*, 2000; Poltermann *et al.*, 2005).

2.7.1 As H⁺-ATPases, poliaminas e o crescimento polarizado

O conhecimento sobre os efeitos das poliaminas na atividade das bombas de H⁺-ATPases ainda são escassos. Estudos conduzidos em plantas revelaram que poliaminas aumentam aproximadamente duas vezes a atividade das H⁺-ATPases tipo P, além de induzir o aumento na associação da proteína reguladora 14-3-3 com o domínio C-terminal não fosforilado da bomba de prótons de células vegetais. A adição dos inibidores da síntese de poliaminas (DFMO, CHA e MGBG), por sua vez, decresce significativamente a atividade das bombas, indicando um possível efeito das poliaminas na regulação da atividade da H⁺-ATPase (Garufi *et al.*, 2007).

Inicialmente, as poliaminas foram associadas com a capacidade de prevenir a metilação do DNA durante a replicação e diferenciação celular de fungos, promovendo a transição dimórfica (Cano *et al.*, 1988). Posteriormente, com auxílio de técnicas moleculares, foi observado que a citosina-DNA metilase é inibida pelas poliaminas (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995) e a ausência de poliaminas impede o desenvolvimento de hifas (Martinez *et al.*, 1990; Reyna-López e Ruiz-Herrera, 2004).

Em *Y. lipolytica*, o nível de poliaminas aumenta consideravelmente nas células durante o processo de transição, seja na forma livre ou conjugada. Além disso, os inibidores DAB e DFMO previnem a transição levedura-hifa. A célula volta a transitar somente pela adição de 0,75 mM de putrescina exógena (Guevara-Olvera *et al.*, 1993). A ausência de poliaminas também é responsável por causar efeito pleiotrófico na transição, pois a adição do inibidor DAB em *C. albicans*, além de decrescer a quantidade de poliaminas e diminuir a formação de hifas, também diminui a expressão das proteínas envolvidas na transição morfogênica, como ALS1, ALS3 e ALS8 (Ueno *et al.*, 2004). O fungo patogênico *P. brasiliensis* também possui alterações nos níveis de suas poliaminas durante a transição. Neste organismo, apenas putrescina e espermidina são detectadas. Os níveis de putrescina são maiores antes da morfogênese, contudo a quantidade de espermidina torna-se superior aos níveis de putrescina após a transição dimórfica (San-Blas *et al.*, 1997).

Recentemente, outro trabalho demonstrou a relação das poliaminas e as H⁺-ATPases em células vegetais, durante a embriogênese de *Araucaria angustifolia*. Após 24 horas de incubação, 1 mM de putrescina aumentou em 100% a atividade da H⁺-ATPases tipo P, enquanto 1 mM de espermidina e espermina reduziu em 31% e 51%, respectivamente. As H⁺-ATPases tipo V, também foram estimuladas pela

putrescina e inibida pela espermidina e espermina. As H⁺-PPases também tiveram a atividade reduzida pela espermidina e espermina, enquanto a putrescina não causou efeito (Dutra *et al.*, 2012). Apesar destes estudos, ainda não é conhecido o efeito de poliaminas e bombas protônicas na transição dimórfica em micro-organismos.

A hipótese do presente trabalho está na possível relação entre as poliaminas e as H⁺-ATPases tipo P via auxina dependente no crescimento polarizado de hifas fúngicas. O crescimento celular promovido pelas poliaminas poderia estar ocorrendo pela sinalização auxínica, promovendo a ativação de cascatas de sinalização, como MAPK e PKA, que induziriam os efetores de genes relacionados à transição levedura-hifa (**Figura 6**). A atividade das bombas de prótons, assim como descrito na teoria do crescimento ácido em células vegetais, também poderia ser induzida durante a promoção do crescimento polarizado em hifas fúngicas. Conseqüentemente, as alterações provocadas pela excreção de prótons poderiam ativar sinalizações que modulariam a morfogênese celular, como a atuação na dinâmica de vesículas citoplasmáticas que poderiam alterar o formato da colônia.

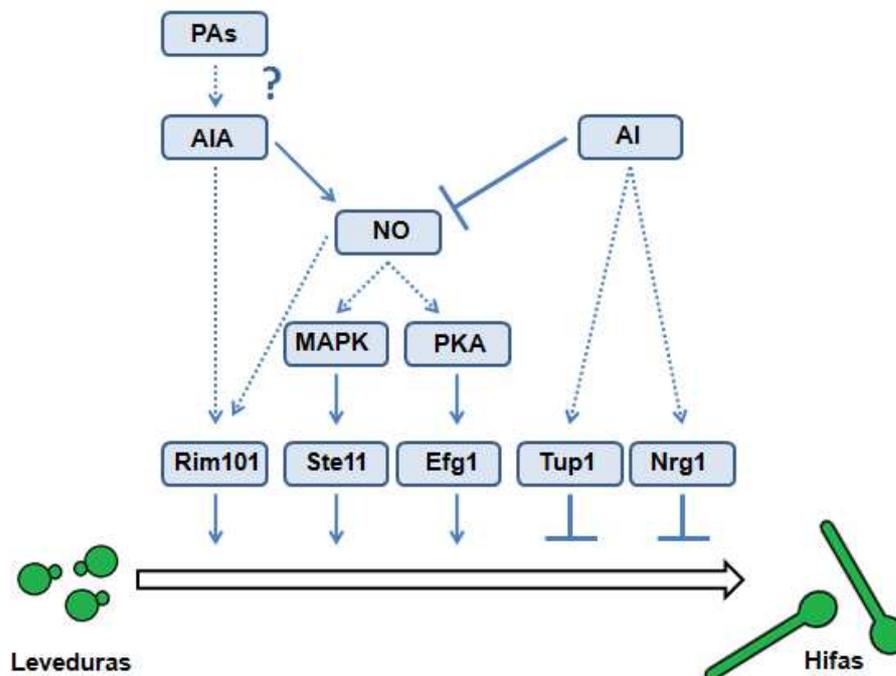


Figura 6. Modelo hipotético do modo de ação das poliaminas na morfogênese de *Y. lipolytica*. Esquema apresentando possível modelo de regulação da cascata de sinalização durante a morfogênese levedura-hifa em *Y. lipolytica* desencadeada pelas poliaminas (PAs), alumínio (Al) e ácido indol-3-acético (AIA), mediada por óxido nítrico (NO). As setas contínuas apontam vias de ativação durante a morfogênese. As setas descontinuas apontam possíveis cascatas relacionadas à transição levedura-hifa. Os traços representam a inibição causada pelo alumínio e efetores negativos da morfogênese celular (Tup1/Nrg1).

FONTE: Adaptado de Liu (2001) e Garcia-Sanchez *et al.*, (2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ❖ Auxiliar na elucidação dos mecanismos primários de controle da morfogênese em *Y. lipolytica* modulados por poliaminas e oscilações de pH intra e extracelular via ativação das bombas de prótons.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Determinar as concentrações de espermina e espermidina mais efetivas na indução da transição dimórfica em *Y. lipolytica*;
- ❖ Determinar efeitos e concentrações do inibidor CHA na transição dimórfica em *Y. lipolytica*;
- ❖ Analisar a morfologia celular em ensaios concomitante de AIA e poliaminas, AIA e CHA ou poliaminas e os inibidores de AIA (PCIB e TIBA) na transição dimórfica em *Y. lipolytica*;
- ❖ Analisar arquitetura de colônias em diferentes condições (poliaminas, AIA, CHA, PCIB, TIBA e conjugados);
- ❖ Aferir a atividade das H⁺-ATPases de membrana plasmática isoladas de células incubadas em poliaminas;
- ❖ Avaliar o perfil de alteração do pH ambiental;
- ❖ Observar a dinâmica de vacúolos em células leveduriformes e hifais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepa da levedura *Y. lipolytica* utilizada

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

4.2 Meios de cultura e manutenção da cepa

O cultivo foi realizado em meio complexo rico em glicose (YED), contendo 1% de extrato de levedura e 1% de glicose, suplementado com lisina, leucina e uracila. O pH do meio de cultura foi ajustado para 4,5 com ácido clorídrico (HCl). O ajuste do pH ocorreu nos tratamentos desenvolvidos com o alumínio (Al^{3+}), afim de torná-lo disponível, o ajuste do pH foi mantido para os demais ensaios para que permitissem a comparação. O meio sólido foi acrescido com 2,5% de ágar ao volume final. A esterilização do meio de cultura líquido ou sólido ocorreu em autoclave, a uma pressão de 1 atm, por um período de 15 minutos. O meio sólido foi vertido em placas de Petri (esterilizadas) no fluxo laminar e posteriormente, as placas foram mantidas em estufa a 30°C por 24 horas, como forma de controle da esterilidade.

A manutenção da cepa foi realizada a cada três meses. Parte da colônia de *Y. lipolytica* era semeada em outra placa contendo meio sólido, formando estrias contínuas. As células foram propagadas e incubadas a 30° C durante 3 dias em estufa incubadora para o crescimento das colônias. Após o surgimento das colônias, as placas foram estocadas em geladeira a 7°C.

4.3 Preparo do pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado em 10 mL de meio líquido YED, pH 4,5, a partir da placa, a fim de adaptar previamente as células às condições de cultivo em meio líquido. Uma alíquota da pré-cultura foi adicionada aos erlenmeyers dos tratamentos de modo que a densidade óptica inicial da cultura correspondesse a $Absorbância_{600nm}=0,01$ em espectrofotômetro (BEL photonics LGS53). O volume do meio de cultura nos erlenmeyers foi mantido numa relação 1:5, a fim de garantir a máxima aeração. O pré-inóculo foi crescido a 30° C em agitador orbital Inova 4300 (New Brunswick Scientific) em 250 rpm até o cultivo atingir o crescimento exponencial.

4.4 Cultivo de *Y. lipolytica* em meio líquido na presença de espermidina e espermina

O cultivo das células foi realizado em YED pH 4,5, com a adição de concentrações crescentes das poliaminas espermidina ou espermina (10^{-9} M; 10^{-6} M; 10^{-3} M; 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM; 0,5 mM; 0,6 mM; 0,7 mM; 0,8 mM; 0,9 mM; 1,0 mM e 2,0 mM) em ensaios independentes, a fim de varrer a melhor concentração utilizada nos ensaios seguintes. O crescimento das células ocorreu a 30° C em agitador orbital Inova 4300 (New Brunswick Scientific) em 250 rpm até 36 horas de incubação, quando o cultivo atinge o platô de crescimento e inicia o decréscimo. O crescimento das células foi acompanhado em espectrofotômetro (BEL photonics LGS53), com leituras realizadas no intervalo de duas horas em comprimento de onda de $\lambda = 600$ nm. As leituras que ultrapassaram 0,200 unidades, foram diluídas em água. Paralelamente, observações morfológicas e a contagem das células foram realizadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico, modelo JENAMED2 (ausJENA) em aumento de 400 vezes (40 vezes da objetiva e 10 vezes da ocular).

4.5 Cultivo de *Y. lipolytica* em meio líquido na presença de poliaminas e auxina

As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em YED pH 4,5, contendo concentrações concomitantes de poliaminas (0,1 mM; 0,5 mM e 1,0 mM) e ácido indol-3-acético (AIA - 10 pmol). As concentrações de poliaminas foram definidas previamente pelo ensaio de varredura, enquanto a concentração de AIA foi definida a partir da concentração capaz de ativar a transição dimórfica no micro-organismo (Dutra, 2010; Lobão, 2012). As condições de cultivo e a leitura dos dados foram semelhantes aos procedimentos descritos acima, no item 4.3.

4.6 Cultivo de *Y. lipolytica* em meio líquido na presença de inibidor da síntese de poliaminas

A *Y. lipolytica* foi cultivada em meio YED pH 4,5, contendo concentrações crescentes do inibidor ciclohexilamino (CHA - 0,1 mM; 0,5 mM; 1,0 mM; 2,0 mM e 4,0 mM), em ensaios independentes. As células também foram crescidas em ensaios contendo concentrações concomitantes de CHA (2,0 mM), AIA (10 pmol) ou poliaminas (0,5 e 1,0 mM). As condições de cultivo e a leitura dos dados foram semelhantes aos procedimentos descritos no item 4.3.

4.7 Cultivo de *Y. lipolytica* em meio líquido na presença de inibidores dos hormônios auxínicos

O cultivo ocorreu em meio YED pH 4,5, contendo concentrações concomitantes de ácido α -(*p*-clorofenoxi) isobutírico (PCIB - 100 μ m) ou ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA - 100 μ m) e as poliaminas (1,0 mM), em ensaios independentes. As concentrações dos inibidores PCIB e TIBA foram definidas por concentrações capazes de inibir a transição e não alterar o crescimento celular do micro-organismo (Dutra, 2010). As condições de cultivo e a leitura dos dados foram semelhantes aos procedimentos descritos no item 4.3.

4.8 Contagem celular em câmara de Neubauer

O número de células em forma de leveduras foi contado a intervalos de duas horas em câmara de Neubauer. As leveduras foram consideradas as células isoladas em formato ovóide, com ou sem pequenos brotos. O número total de células nesse formato foram contadas em 10 campos da câmara de Neubauer, utilizando o microscópio óptico, modelo JENAMED2 (ausJENA) em aumento de 400 vezes. Os ensaios com grandes quantidades de células foram diluídos em água a fim de permitir a leitura em microscópio. O total de células/mL foi considerado como o número de células contadas dentro dos 10 campos de observação $\times 2,5 \times$ diluição $\times 10^4$. O valor máximo de células na cultura controle foi considerado 100% da quantidade de leveduras obtidas no ensaio.

4.9 Isolamento de membranas celulares totais de *Y. lipolytica*

As células foram incubadas em meio líquido YED pH 4,5 em agitador orbital Inova 4300 (New Brunswick Scientific) em 250 rpm a 30° C na presença ou ausência de espermina (1,0 mM) por 14, 20 e 26 horas. O tempo de incubação foi previamente definido como o momento antes de iniciar o processo de transição (14 horas), a partir do dimorfismo celular (20 horas) e após o estabelecimento do fenômeno (26 horas). Após o período de incubação as células foram centrifugadas a $3.500 \times g$ por 5 min e a massa úmida determinada. O isolamento de esferoplastos e a obtenção de membranas celulares foram realizadas de acordo com a técnica adaptada e descrita por Okorokov e Lehle (1998). Sucintamente, as células foram ressuspensas antes da quebra da parede celular. Para cada grama de célula,

foram adicionados 5 mL de tampão de esferoplastos (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris, pH 7,4), 4 mg de complexo de enzimas líticas (*Lyticase*) e 12,5 μ L de β -mercaptoetanol (concentração final de 30 mM). A suspensão celular foi incubada a 37° C sob fraca agitação. A formação dos esferoplastos foi monitorada pelo decaimento na absorbância ($\lambda = 600$ nm) em espectrofotômetro (BEL photonics LGS53), misturando 10 μ L dessa suspensão celular e 990 μ L de água. O monitoramento foi realizado a cada 5 ou 10 min a partir do tempo 0 (zero) de incubação até o tempo máximo de 50 min ou até que a absorbância chegasse ao valor entre 20 a 10% do inicial. A seguir, os tubos da suspensão de esferoplastos foi transferida para o gelo e a reação de hidrólise da parede celular foi paralisada pela adição de tampão de parada (“stop solution”), nas concentrações finais de 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4 e 1 mM de EDTA (solução estoque 20 vezes concentrada: Sorbitol 1,2 M, Tris-HCl 200 mM pH 7,4, EDTA 20 mM), 1 mM de benzamidina (200 mM estoque) e 1 mM de PMSF (200 mM estoque).

A suspensão de esferoplastos (~15 mL) foi adicionada sobre 30 mL de solução de Sorbitol 1,4 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,4 em tubo de centrífuga levemente inclinado. Com o auxílio de pipetas, a suspensão foi adicionada cuidadosamente a fim de evitar a mistura dos esferoplastos com a solução colchão. O material foi centrifugado a 4.000 x g por 6 min a 4° C. Esse passo do procedimento foi realizado a fim de eliminar os resíduos de enzimas líticas. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as paredes dos tubos foram secadas com papel filtro a fim de evitar que possíveis enzimas líticas atuem nos esferoplastos.

Os esferoplastos foram incubados a 30° C por 10 min com 20 mL de solução de incubação contendo glicose (glicose 100 mM, Sorbitol 1,2 M, Tris-HCl 50 mM, KH_2PO_4 10 mM, MgSO_4 3 mM pH 7,2). Após a incubação, os esferoplastos foram centrifugados a 4.000 x g por 6 min a 4° C.

O sedimento obtido foi ressuscitado em 20 mL de tampão de lise (sacarose 12,5%, MOPS-KOH 20 mM pH 7,6), Dithiotreitol (DTT) 1 mM (1 μ g/mL), coquetel de inibidores de proteases (solução estoque do coquetel de inibidores é composto de quimiostatina, pepstatina, antipaina, leupeptina e aprotinina na concentração de 1 mg/mL cada um), glicose 100 mM, Benzamidina 1 mM (200 mM estoque), PMSF 1 mM (200 mM estoque) e albumina sérica bovina 0,3%. A ressuspensão foi homogeneizada em homogeneizador de vidro com pistilo de teflon (“potter”), com 21

ciclos completos (“strokes”). O homogeneizado foi misturado a 3,51 g de glicerol e centrifugado a 4.000 x g por 6 min a 4° C. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 45.000 x g por 45 min a 4° C.

O sedimento (membranas totais) foi ressuscitado em, aproximadamente 1,5 mL (dependendo do conteúdo de membranas) de solução de ressuspensão (10 mL de tampão de lise, 1,17 g de glicerol, 10 µL de coquetel de inibidores de proteases (1 mg/mL), 25 µL de Benzamidina 200 mM, 25 µL de PMSF 200 mM e 4 µL de DTT 500 mM). A ressuspensão de membranas totais foi homogeneizada em homogeneizador de vidro com pistilo de teflon (“potter”) com 15 ciclos completos (“strokes”). Em seguida, a suspensão de membranas totais foi distribuída em tubos cônicos (“ependorfs”), sendo colocada 100 µL de suspensão de membrana em cada tubo, as frações de membranas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no freezer a -70° C para análises posteriores.

4.10 Determinação do conteúdo de proteína

A determinação do conteúdo de proteína total foi realizada pelo método descrito por Bradford e colaboradores (1976). O reagente de Bradford é composto por 28 mg de Comassie Brilliant Blue G 90%, 12 mL de etanol absoluto e 25 mL de ácido ortofosfórico (85%), para um volume final de 250 mL. O Comassie é misturado ao etanol em um Becker, devidamente envolvido em papel alumínio, a fim de evitar a entrada de luz. A mistura é deixada em agitação por 1 hora a temperatura ambiente (25-30° C). Em seguida é adicionado o ácido ortofosfórico e homogeneizado por 5 min e o volume ajustado em balão volumétrico. A solução é filtrada em papel de filtro por três vezes e armazenada em vidro âmbar.

A curva padrão foi obtida a partir de albumina sérica bovina na concentração de 1 mg/mL, armazenada em 0° C. Volumes de 2 µL a 20 µL da solução de albumina 1 mg/mL são medidos e completados para o volume final de 100 µL com água destilada. Em seguida, 1 mL da solução de Bradford é adicionada a cada volume em intervalos regulares. Após 10 minutos, à temperatura ambiente, as leituras são realizadas em espectrofotômetro a $\lambda = 595$ nm, obedecendo ao intervalo utilizado anteriormente.

O conteúdo de proteína total é determinado utilizando 10 µL de suspensão de membranas devidamente diluída, completando o volume para 100 µL com água

destilada e 1 mL da solução de Bradford. Aguardam-se novamente exatos 10 minutos, à temperatura ambiente, e as leituras são realizadas em espectrofotômetro a 595 nm obedecendo ao mesmo intervalo de tempo utilizado anteriormente. Os valores obtidos nas dosagens devem ficar, preferencialmente, entre os valores médios estabelecidos na curva padrão. Para valores do conteúdo de proteína que ficaram fora da faixa de linearidade, ou seja, nas extremidades da curva padrão, os seguintes procedimentos foram adotados: (1) o conteúdo de proteínas foi aumentado ou (2) as membranas foram diluídas em água destilada.

4.11 Determinação do transporte de H⁺

O ensaio de determinação do transporte de H⁺ em membranas de levedura foi realizado segundo protocolo adaptado por Okorokov e Lichko (1983). A formação do Δ pH ocorre através das membranas a partir do transporte de H⁺ realizado pelas V H⁺-ATPases ou P H⁺-ATPases. O gradiente de H⁺ foi monitorado pelo decréscimo da fluorescência da sonda 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada por um feixe de $\lambda = 415$ nm e a emissão captada por 485 nm com abertura de 5 nm/10 nm em fluorímetro (Shimadzu RF 5301 PC). O ACMA contém o grupamento amina que funciona como base fraca, o composto é capaz de atravessar livremente a bicamada lipídica das membranas quando não está protonado. A sonda distribui-se através da membrana em função da diferença do pH no interior e exterior das vesículas. O pH dentro das vesículas favorece a protonação do grupo amina da sonda fluorescente, limitando sua capacidade de movimentar-se entre as membranas. O aumento de sondas protonadas no interior das vesículas causa o decaimento da fluorescência, quanto maior o gradiente eletroquímico das vesículas, maior o decaimento (**Figura 7**). O transporte é determinado em tampão de incubação contendo KCl 20 mM, MgSO₄ 2,5 mM, MOPS-KOH (sacarose 12,5 %, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) em quantidade necessária para completar 2 mL, 3 μ L de ACMA 1 mM (dissolvido em etanol) e a suspensão de membranas com volume variando entre 20 e 90 μ L, dependendo da atividade apresentada, de modo que a amplitude máxima ($F_{m\acute{a}x}$) não ultrapasse 50 %.

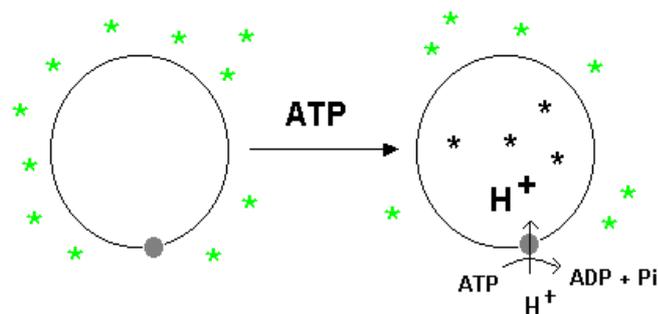


FIGURA 7: Representação esquemática explicando o decaimento da fluorescência. A protonação do ACMA (representado por asteriscos) no interior das vesículas impede sua saída. Assim, as concentrações de ACMA no exterior da célula se tornam menores, resultando no decaimento da fluorescência.

Após três minutos de incubação (ou tempo necessário para estabilização da fluorescência) acrescenta-se ATP 1 mM pH 7,2 e observa a cinética da extinção da fluorescência causada pela atividade enzimática. Após um tempo aproximado de 600 segundos (ou suficiente para atingir o equilíbrio entre efluxo e influxo de prótons) adiciona-se 2,0 M de NH_4Cl a fim de parar a reação, desfazendo o gradiente protônico estabelecido. A identificação do transporte de H^+ mediado pela H^+ -ATPase tipo V ou P são realizados pela utilização de inibidores específicos. A concanamicina A 110 μM inibe a atividade da ATPase tipo V, enquanto o ortovanadato de sódio 200 μM , inibe a atividade da ATPase tipo P.

Para calcular a densidade relativa de fluorescência, a fórmula (1) foi utilizada e para determinar a V_0 , a fórmula (2) foi utilizada (**Figura 8**), onde:

$$(1): \Delta F_{\text{máx}} = F_{\text{eq}} / F_{\text{máx}} * 100;$$

$$(2): V_0 = [F_0 / (F_{\text{máx}} * T)] * 100.$$

V_0 : velocidade inicial de formação do ΔpH ;

F_0 : fluorescência dependente de V_0 , num tempo "T", determinada pela extrapolação de uma reta tangente à maior inclinação inicial para o eixo do tempo;

$F_{\text{máx}}$: fluorescência máxima (total);

T: tempo em minutos;

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

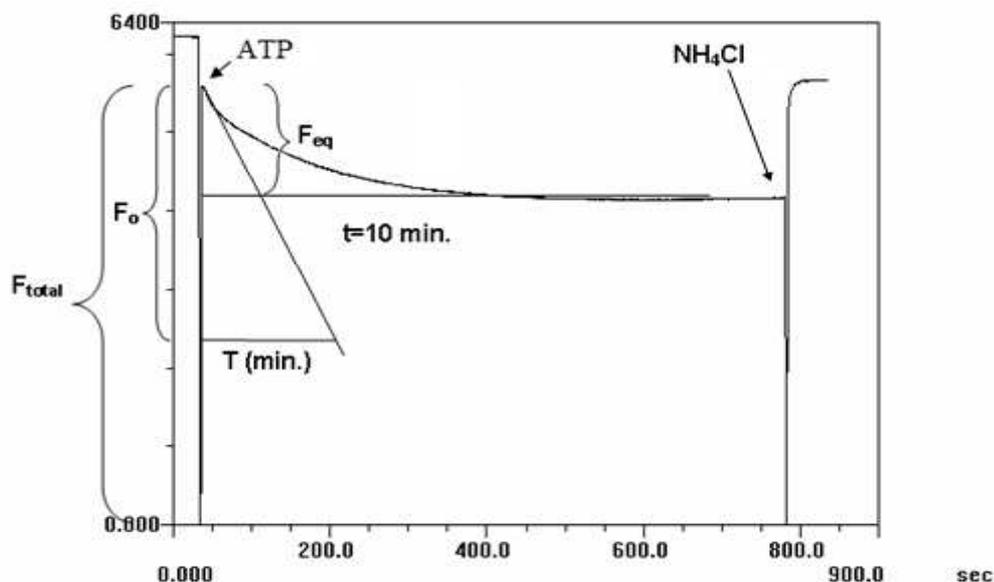


FIGURA 8: Determinação da velocidade inicial e amplitude máxima de transporte de H⁺ em membranas de *Y. lipolytica*, cepa JM-12. Velocidade inicial ($V_0 = [F_0 / (F_{m\acute{a}x} * T)] * 100$); amplitude máxima ($\Delta F_{m\acute{a}x} = F_{eq} / F_{m\acute{a}x} * 100$).

Na presença de ATP, a fluorescência diminui demonstrando o transporte de prótons e a formação de gradiente de H⁺ nas vesículas de membranas. Ao atingir a fluorescência máxima e o equilíbrio, o NH₄Cl é adicionado a fim de desfazer o gradiente protônico.

4.12 Acompanhamento da morfologia de *Y. lipolytica*

Células de *Y. lipolytica* foram cultivadas em meio sólido, contendo poliaminas, auxina, inibidores de poliaminas e auxinas nas concentrações citadas nos ensaios anteriores. Posteriormente, as placas foram mantidas em estufa incubadora a 30° C por 5 dias. Após o crescimento, a morfologia das células foram verificadas em microscópio óptico invertido Zeiss Axio Observer A.1, equipado com AxioCam MRc5 e software AxionVision nos aumentos de 5x, 10x e 20x e microscópio óptico de contraste de fase, Zeiss Axio Imager A.2, equipado com AxioCam MRc5 e software AxioVision no aumento de 400 vezes. As colônias também foram registradas em câmera digital (Fujifilm, Finepix S4080).

4.13 Acompanhamento do pH extracelular em culturas de *Y. lipolytica*

A alteração do pH extracelular foi aferida em meio líquido e sólido durante o crescimento das culturas celulares. Em meio líquido a leitura foi realizada em alíquotas de 500 µL dos cultivos crescidos nas condições acima citadas em intervalos de duas horas em pHmêtro (Quimis Q400A). Em meio sólido, as células de *Y. lipolytica* foram crescidas em meio sólido sob as mesmas concentrações citadas anteriormente. As placas foram mantidas em estufa incubadora a 30° C por 48, 60 e 72 horas. Após o crescimento, agarose contendo o indicador de pH púrpura de bromocresol (0,015%) foi adicionado sobre as colônias. As regiões mais alcalinas do cultivo alteram a coloração para lilás, enquanto regiões ácidas mantinham-se amarelas. Os resultados foram registrados em câmera digital (Fujifilm, Finepix S4080).

4.14 Acompanhamento da dinâmica vacuolar em *Y. lipolytica*

A dinâmica vacuolar foi verificada após o início da transição dimórfica (20 horas) em células crescidas em meio YED líquido a 30° C e 250 rpm em agitador orbital. O formato e distribuição dos vacúolos em células leveduriformes ou hifais foram acompanhados pelo uso de marcadores fluorescentes do kit “Yeast Vacuole Marker Sampler” (Molecular Probes - Y-7531). O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante. O kit é composto por cinco componentes: (A) Carboxy-DCFDA (5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate); (B) CellTraker Blue CMAC (7-amino-4-chloromethyl-coumarin); (C) CMAC-Arg (7-amino-4-chloromethylcoumarin, L-arginine amide); (D) CMAC-Ala-Pro (7-amino-4-chloromethylcoumarin, L-alanyl-L-proline amide); (E) Yeast vacuole membrane marker MDY-64. Os componentes A, B, C e D são marcadores fluorescentes para o lúmen vacuolar de células leveduriformes, enquanto o componente E, representa um marcador para a membrana vacuolar.

As células presentes em 500 µL de meio YED líquido foram utilizadas nos ensaios com o componente A (Carboxy-DCFDA), previamente, ressuspendidas em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0, contendo 2% de glicose. Em seguida, o carboxy-DCFDA foi adicionado até atingir a concentração final de 10 µM e incubados a temperatura ambiente por 15-30 min. Posteriormente, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager A.2 HB 100, equipado com AxioCam MRc5 e AxioVision software.

As células utilizadas nos ensaios com os componentes B (CellTraker Blue CMAC), C (CMAC-Arg), D (CMAC-Ala-Pro) e E (MDY-64) foram obtidas de 500 μ L de meio YED líquido e ressuspensas em tampão HEPES 10 mM, pH 7,4, contendo 5% de glicose. Em seguida, um dos componentes foi adicionado até chegar a concentração final de 100 μ M dos derivados CMAC ou 10 μ M de MDY-64. As células incubadas com os componentes B, C e D foram mantidas a temperatura ambiente por 15-30 min e posteriormente, visualizadas em microscópio fluorescente. As células incubadas com o componente E foram mantidas, no máximo, por 3-5 min em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas por tampão HEPES 10 mM, pH 7,4 fresco, contendo 5% de glicose, e visualizadas em microscópio fluorescente Zeiss Axio Imager A.2 HB 100, equipado com AxioCam MRc5 e AxioVision software.

4.15 Análise estatística

A normalidade foi verificada pelo teste K_2 , baseado nos momentos de curtose e simetria (Zarr, 1999). Os valores representam a média de quatro experimentos realizados independentemente ($n=4$). Assumindo a premissa da normalidade, as taxas de transição levedura-hifa em diferentes concentrações de poliaminas foram analisadas pela regressão linear simples. A porcentagem de células leveduriformes foi utilizada como variável dependente e as concentrações de poliaminas como variável independente. As diferenças estatísticas entre os tratamentos com poliaminas, auxinas ou inibidores, além da razão entre as atividades de transporte de H^+ foram analisadas por one-way ANOVA ($p \leq 0,05$), e posteriormente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas no programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Efeito das poliaminas no crescimento celular e na transição levedura-hifa da *Y. lipolytica*

O efeito de poliaminas exógenas foi realizado com a finalidade de identificar os mecanismos de ação de espermidina e espermina no crescimento polarizado das hifas. Inicialmente, realizamos ensaios de varredura das concentrações de poliaminas para identificar concentrações capazes de alterar a morfologia e o crescimento de *Y. lipolytica*.

Nas condições normais (controle) de crescimento (meio YED, pH 4,5, 30° C e 250 rpm), a *Y. lipolytica* possui fase de adaptação (*lag*) é de aproximadamente 12 horas, durante este intervalo, não ocorre crescimento celular, a cultura permanece estável. Após este momento, as células iniciam a fase logarítmica (*log*), caracterizada por sucessivas multiplicações, pelo aumento gradual no crescimento celular e consumo máximo de substratos. Esta fase de crescimento celular ocorre em um intervalo de 6 a 8 horas.

A transição morfogênica ocorre justamente nesta fase de intensa atividade celular, a partir das 18 horas, com o surgimento das primeiras pseudohifas. Após 20 horas, podem ser observadas as primeiras hifas verdadeiras. Por volta de 22 horas, a cultura atinge o platô de crescimento, caracterizado pela grande quantidade de células e pouca ou nenhuma variação no crescimento celular, representa o momento em que as condições do meio suprem as necessidades energéticas das células (**Figura 9**). Após 36 horas de incubação, o cultivo está completamente saturado e normalmente ocorre o processo de declínio ou morte celular.

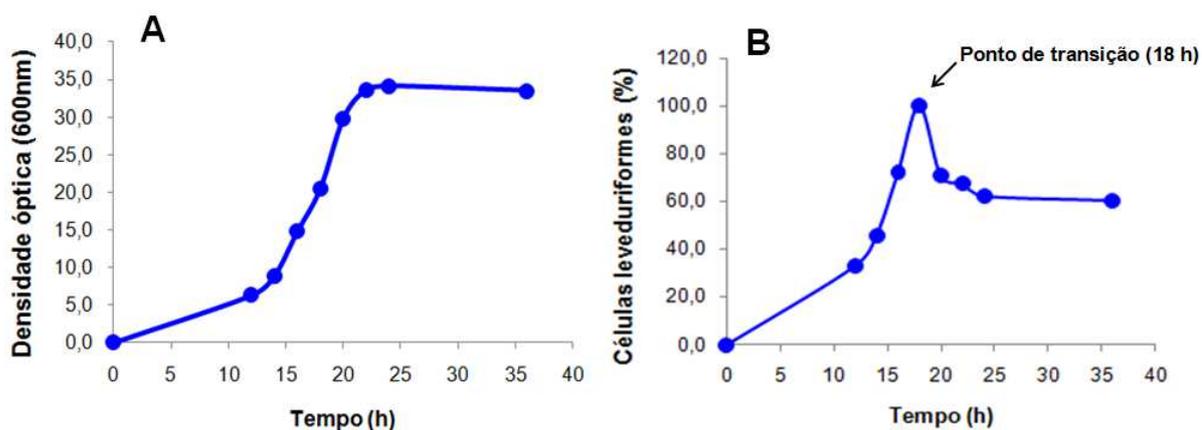


FIGURA 9. Perfil de transição dimórfica e crescimento celular da cepa *Y. lipolytica* JM-12. (A) Curva de crescimento celular, a fase de adaptação (fase *lag*) se estende até 12 horas de cultivo, entre 14 e 20 horas ocorre a fase de crescimento celular (fase *logarítmica*) e após 22 horas, o cultivo atinge o platô de crescimento. (B) Curva de transição levedura-hifa, ponto de inflexão ocorre em 18 horas, com o surgimento das primeiras pseudohifas. Meio YED (1% de extrato de levedura e 1% de glicose), pH 4,5, temperatura de 30° C e 250 rpm de agitação orbital. Leitura realizada a cada duas horas entre 12 e 24 horas de incubação.

A partir dessas características, os ensaios com as poliaminas foram elaborados. Os resultados demonstram que em baixas concentrações de poliaminas, como 10^{-9} M e 10^{-6} M, não ocorrem variações no processo de transição ou crescimento celular (dados não mostrados). Contudo, a leitura em concentrações mais elevadas, superiores a 0,5 mM de espermina e espermidina, influencia significativamente a transição dimórfica da levedura. O efeito pode ser observado desde o momento da transição, a partir de 18 horas. O controle (sem poliaminas) está com 100% de suas células em forma de leveduras, enquanto os tratamentos na presença de concentrações superiores a 0,7 mM de espermidina (**Figuras 10A**) ou 0,5 mM de espermina (**Figura 11A**) possuem quantidades significativas ($p \leq 0,05$) de células não leveduriformes. Nos ensaios com as maiores concentrações de poliaminas foi possível identificar quantidades entre 15 e 20% de células não leveduriformes.

Além disso, nos cultivos com concentrações entre 0,8 mM e 1,0 mM de poliaminas é possível observar células leveduriformes elípticas, característica de células prontas para a diferenciação em pseudohifas. Diferentemente, os demais cultivos possuíam apenas células arredondadas, caracterizadas pelo crescimento isotrópico. O teste de regressão linear simples revelou consistência nos resultados obtidos nos ensaios com espermina ($R^2 = 0,9586$) e espermidina ($R^2 = 0,9802$), após

18 horas de incubação. O teste auxilia a estimar o valor esperado dos resultados, quanto maior o número, maior a consistência dos dados.

Após 20 horas de crescimento, o cultivo ausente de poliaminas possui aproximadamente 82% de suas células em forma de leveduras, enquanto esse número tende a diminuir à medida que se eleva a concentração de poliaminas (**Figura 10B** e **11B**). O ensaio com a concentração de 0,5 mM de espermina está com 74,5% das células em forma de leveduras, o valor diminui para 68% em 0,6 mM. As concentrações 0,7 mM, 0,8 mM e 0,9 mM de espermina possuem quantidades decrescentes de leveduras, 64%, 60% e 58%, respectivamente. A concentração de 1 mM possui a menor quantidade de células leveduriformes, aproximadamente 54% (**Figura 11B**).

Os ensaios realizados com espermidina apresentaram o mesmo perfil. A análise estatística pelo teste de Tukey revelou que a partir da concentração de 0,7 mM de espermidina (**Figura 10A**), os ensaios apresentam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$), enquanto em espermina, estas diferenças são observadas a partir da concentração de 0,6 mM (**Figura 11B**). O teste de regressão linear simples também revelou consistência nos resultados obtidos nos ensaios com espermina ($R^2 = 0,9452$) e espermidina ($R^2 = 0,8930$), após 20 horas de incubação.

Após 22 horas de incubação, as diferenças entre os tratamentos na presença ou ausência de poliaminas são mantidos, assim como a diferença entre as poliaminas espermina e espermidina. O cultivo ausente de poliaminas possui aproximadamente 74% das células em forma de leveduras, enquanto 1 mM de espermidina possui 58% (**Figura 10C**). Esse número é menor em 1 mM de espermina, pois aproximadamente 43% das células ainda estão na forma de leveduras (**Figura 11C**). Apesar disso, a transição dimórfica mostra-se significativamente diferente ($p \leq 0,05$) a partir da concentração de 0,7 mM para ambas as poliaminas (**Figura 10C** e **11C**).

Ao final de 36 horas de incubação, aproximadamente 60% das células estão no formato de leveduras no cultivo controle, no entanto, diminuiu para cerca de 43% no tratamento com 1 mM de espermidina e, em torno de 32%, no cultivo com a mesma concentração de espermina (**Figura 10D** e **11D**). Apesar disso, as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são mantidas a partir da concentração de 0,7 mM, tanto de espermidina como de espermina, como mostra. O teste de regressão linear simples

demonstra novamente consistência dos dados obtidos após 36 horas de incubação em ensaios realizados na presença de espermina ($R^2= 0,9307$) ou espermidina ($R^2= 0,8631$) (Figura 10D e 11D).

Apesar do efeito positivo na transição dimórfica, as poliaminas não alteram o crescimento celular até a concentração de 1 mM, as culturas celulares apresentaram praticamente a mesma densidade óptica. Outra característica observada foi a presença precoce de pseudohifas e hifas, até mesmo antes de 18 horas de incubação, nos cultivos que possuem concentrações próximas a 1 mM de poliaminas. Apesar disso, o ponto de inflexão na transição dimórfica manteve-se em torno de 18 horas, devido às divisões exponenciais das células leveduriformes de *Y. lipolytica* nas diferentes condições analisadas.

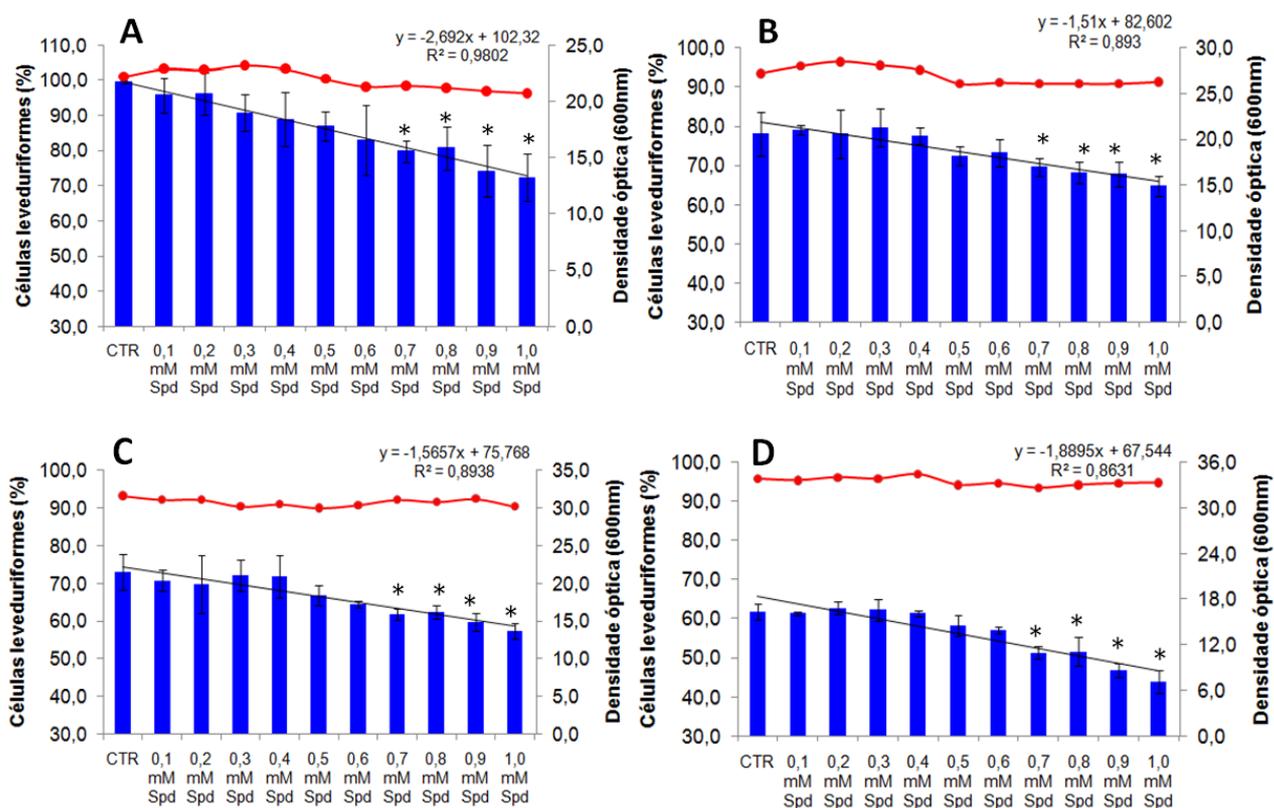


FIGURA 10. Efeito da espermidina (Spd) na transição levedura-hifa e crescimento celular de *Y. lipolytica*. (A) - 18 horas de cultivo; (B) - 20 horas de cultivo; (C) - 22 horas de cultivo e (D) - 36 horas de cultivo. Gráficos em barras (azul) representam células leveduriformes no cultivo (%). Gráficos em linha (vermelho) representam a densidade óptica da cultura. Células foram crescidas em meio YED pH 4,5, 30° C e 250 rpm de agitação orbital. Dados representativos de três ensaios independentes (n=3). (*) Representam diferenças significativas em relação ao controle (CTR) pelo teste Tukey (p≤0,05). A consistência dos dados foi determinada por regressão linear simples.

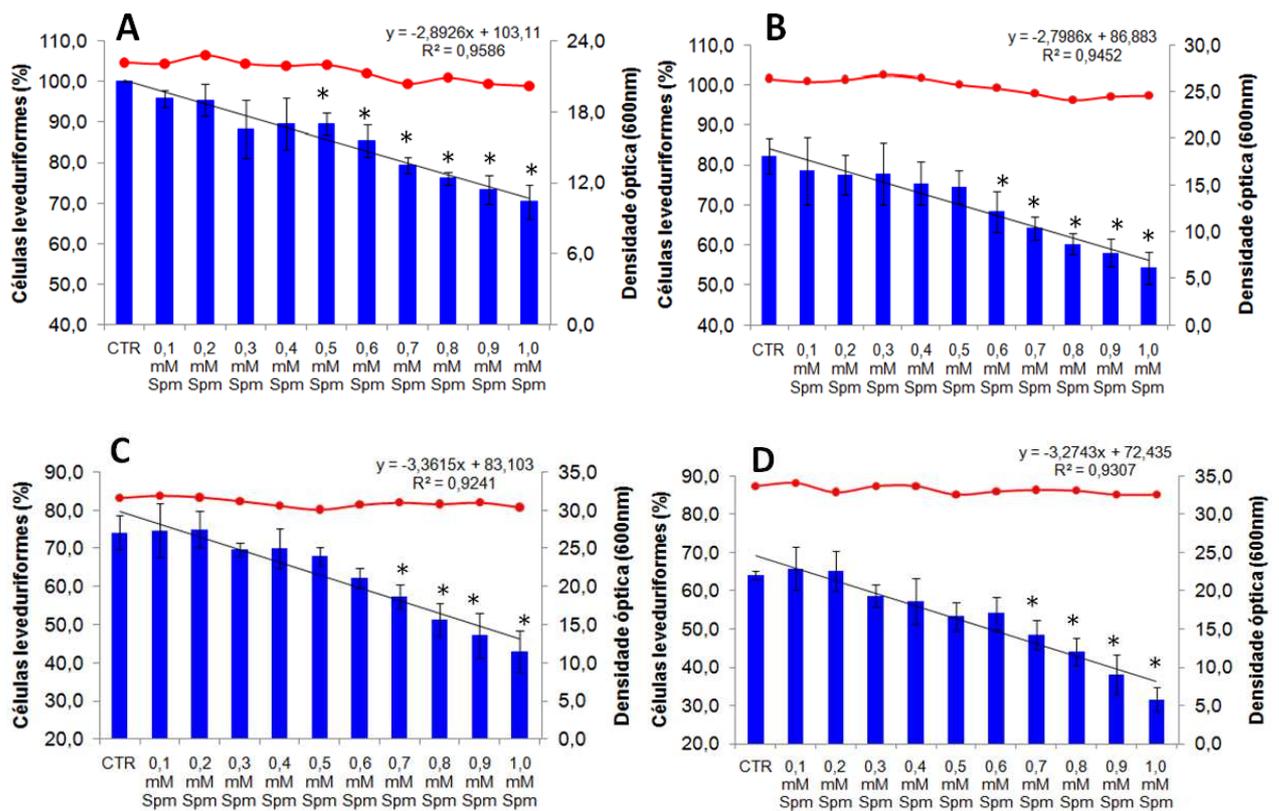


FIGURA 11. Efeito da espermina (Spm) na transição levedura-hifa e crescimento celular de *Y. lipolytica*. (A) - 18 horas de cultivo; (B) - 20 horas de cultivo; (C) - 22 horas de cultivo e (D) - 36 horas de cultivo. Gráficos em barras (azul) representam células leveduriformes no cultivo (%). Gráficos em linha (vermelho) representam a densidade óptica da cultura. Células crescidas em meio YED pH 4,5, 30° C e 250 rpm de agitação orbital. Dados representativos de três ensaios independentes (n=3). (*) Representam diferenças significativas em relação ao cultivo controle (CTR) pelo teste Tukey (p<0,05). A consistência dos dados foi determinada por regressão linear simples.

Na **Figura 12** é possível observar as células de *Y. lipolytica* na presença de poliaminas. A micrografia demonstra o aumento na quantidade de células hifais ou de pseudohifas nos ensaios realizados na presença de 1 mM espermidina ou espermina. Desde 18 horas, os cultivos suplementados com poliaminas possuem células não leveduriformes e esta diferença tende a se manter durante o crescimento, mesmo após a transição do cultivo controle. Os dados demonstram a necessidade de altas concentrações de poliaminas (acima de 0,7 mM) para alterar significativamente o perfil de transição morfogênica. O efeito máximo na morfogênese obtido pela adição de poliaminas foi encontrado na concentração de 1 mM de ambas as poliaminas, espermidina ou espermina. Após 36 horas de incubação, as culturas possuíam 43 e 32% de células leveduriformes, respectivamente (**Figura 10D e 11D**).

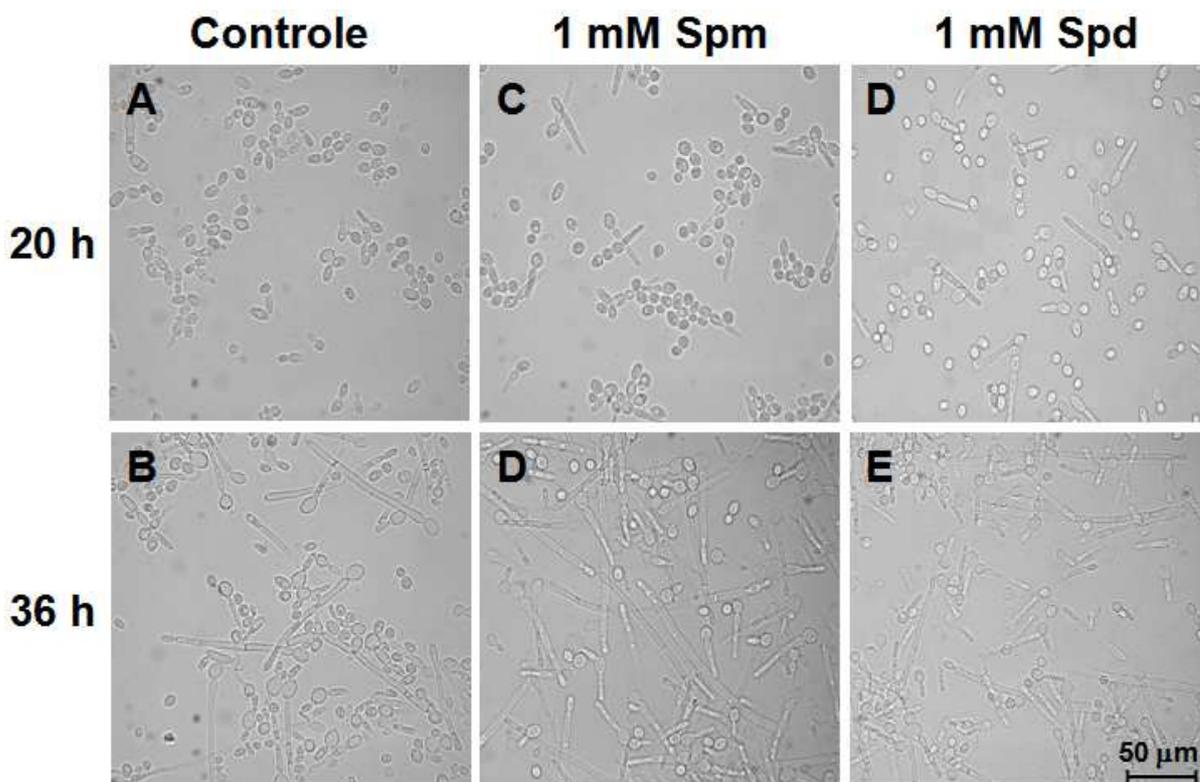


FIGURA 12. Efeito de espermina (Spm) e espermidina (Spd) na morfologia das células de *Y. lipolytica*. Micrografias A e B são células de *Y. lipolytica* incubadas na ausência de poliaminas; C e D são células crescidas em 1 mM de espermina (Spm); E e F incubadas em 1 mM de espermidina (Spd) após 20 e 36 horas de incubação, respectivamente. Cultivo realizado em meio líquido YED, pH 4,5, 30°C e 250 rpm de rotação orbital. Microscopia óptica de contraste de fase, aumento de 400x, barra representa 50 μm.

Uso de concentrações mais elevadas das poliaminas demonstrou que a concentração de 2 mM de espermina apresentou efeito negativo sob a cultura de *Y. lipolytica*, pois o crescimento celular foi reduzido em aproximadamente 25% resultou no surgimento de células aberrantes na morfologia e polaridade (**Figura 13**). Por esse motivo, a concentração de 1 mM das poliaminas mostrou-se a mais promissora para os ensaios posteriores, por não afetar o crescimento celular e induzir efetivamente a transição dimórfica da levedura.

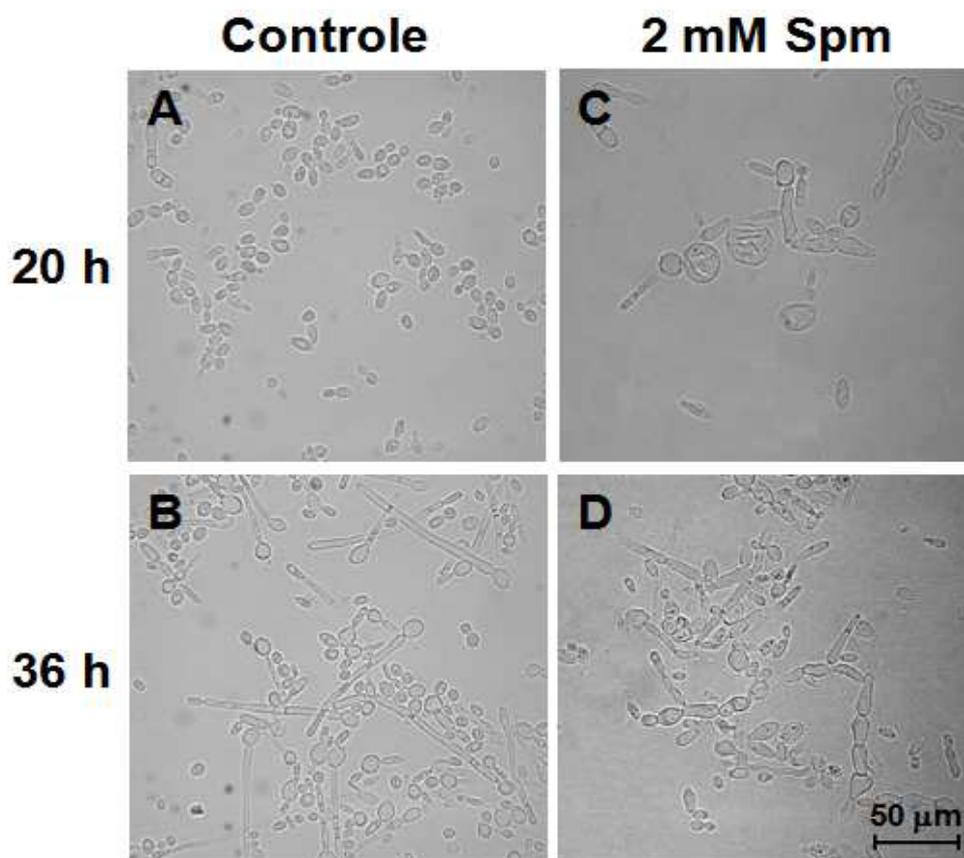


FIGURA 13. Efeito tóxico de espermina em *Y. lipolytica*. Efeito tóxico de 2 mM de espermina na formação de leveduras (C) e hifas (D) de *Y. lipolytica* comparada às células normais (A e B). As micrografias do controle foram realizadas a partir da diluição de 10x do cultivo. As células foram incubadas em meio líquido YED, pH 4,5, 30° C e 250 rpm de rotação orbital. Microscopia óptica de contraste de fase, aumento de 400x, barra representa 50 µm.

5.2 Efeito do inibidor da síntese das poliaminas, ciclohexilamino (CHA), no dimorfismo de *Y. lipolytica*

O efeito das poliaminas na transição dimórfica da *Y. lipolytica* também foi analisado com o inibidor específico da síntese dessas moléculas. O composto ciclohexilamino (CHA) é capaz de inibir especificamente a enzima espermidina sintase, ou seja, previne a síntese de espermidina e, conseqüentemente, de espermina (Walthers, 1995). Ensaio utilizando concentrações entre 0,1 mM e 4 mM de CHA, demonstraram que a maior concentração (4 mM) foi capaz de influenciar o crescimento celular, por inibir em até 25% o crescimento da cultura, enquanto as demais concentrações não influenciaram (**Figura 14**).

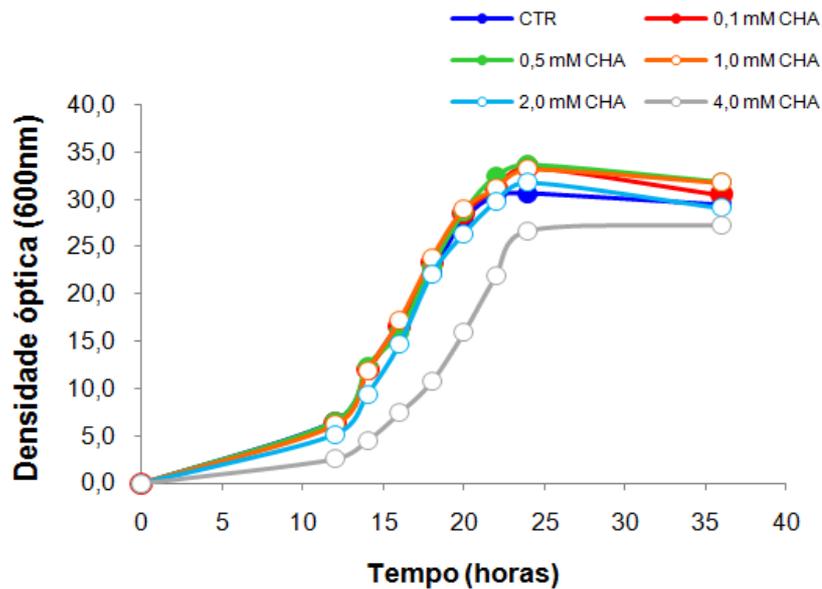


FIGURA 14. Efeito do inibidor ciclohexilamino (CHA) no crescimento celular de *Y. lipolytica*. Densidade óptica da cultura celular incubada na ausência (CTR) ou na presença de CHA (0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM e 4 mM). Células foram crescidas em meio YED pH 4,5, à 30° C e 250 rpm de agitação orbital.

O ensaio demonstrou ainda que concentrações superiores a 1 mM de CHA foram suficientes para inibir a morfogênese da cultura, confirmando a importância de espermidina e espermina na transição levedura-hifa da *Y. lipolytica*. Após 36 horas de incubação, o cultivo na ausência do inibidor apresentava, aproximadamente, 60% de suas células em forma de leveduras, enquanto o cultivo suplementado com 1 mM de CHA, possuía cerca de 70% de células leveduriformes. A concentração de 2 mM de CHA inibe mais efetivamente o processo, pois 85% das células permaneciam em forma de leveduras após 36 horas de incubação (**Figura 15**).

A adição exógena de 1 mM das poliaminas espermina ou espermidina mostrou-se suficiente para reverter a inibição na transição dimórfica causada pela concentração de 2 mM de CHA, conforme esperado (**Figura 16**). As células, incubadas na presença do inibidor e das poliaminas, iniciaram normalmente o processo de transição dimórfica após 18 horas de incubação. Os cultivos contendo poliaminas obtiveram aumento no perfil de transição dimórfica, até mesmo nos ensaios realizados concomitantemente com o inibidor CHA.

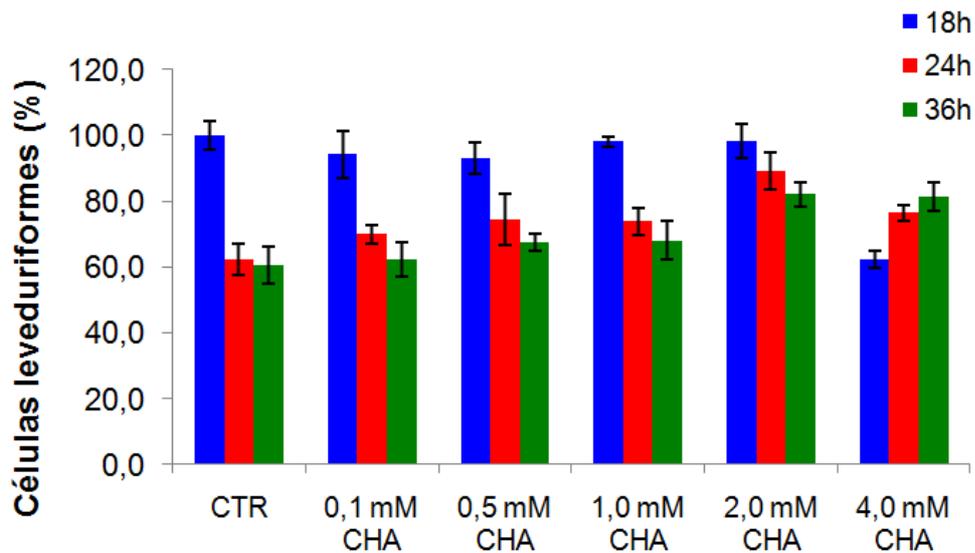


FIGURA 15. Efeito do inibidor ciclohexilamino (CHA) na transição morfológica de *Y. lipolytica*. Contagem de células leveduriformes na cultura celular após 18, 24 e 36 horas de incubação. Células incubadas na ausência (CTR) ou na presença de CHA (0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM e 4 mM). A transição morfológica ocorreu a partir das 18 horas de incubação no cultivo controle. Células foram crescidas em meio YED pH 4,5, à 30° C e 250 rpm de agitação orbital.

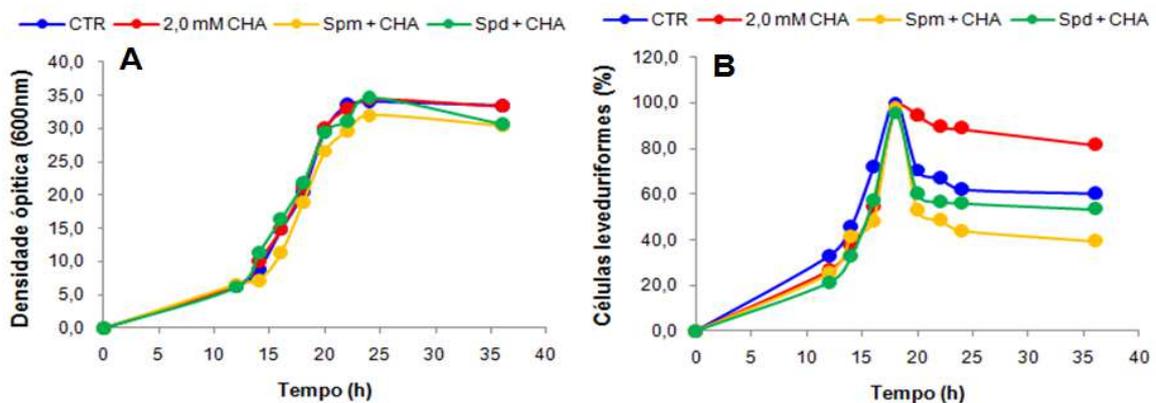


FIGURA 16. Reversão no efeito do inibidor CHA pela adição exógena de poliaminas. (A) Crescimento celular de *Y. lipolytica*. (B) Porcentagem de células leveduriformes em cultivos realizados na concentração de 1 mM de espermina (Spm) ou espermidina (Spd) e/ou 2 mM do inibidor CHA. No tratamento controle, a transição levedura-hifa foi observada a partir de 18 horas. Células foram crescidas em meio líquido YED pH 4,5, à 30° C e 250 rpm de agitação orbital.

5.3 Efeito das poliaminas e do ácido indol-3-acético (AIA) na transição dimórfica da *Y. lipolytica*

O hormônio auxínico ácido indol-3-acético (AIA) aumenta significativamente a transição dimórfica da *Y. lipolytica*, o cultivo com a auxina possui cerca de 40% de suas células em forma de leveduras ao final de 36 horas de incubação (Dutra, 2010; Lobão, 2012). Ensaios foram elaborados a fim de analisar os efeitos concomitantes

de poliaminas e auxinas na transição dimórfica da *Y. lipolytica* pela adição exógena e concomitante de 10 pmol de AIA e 1 mM de espermina ou espermidina.

Após 20 horas de incubação, os cultivos com adição de auxina e poliaminas, concomitantes ou não, possuíam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao controle (sem poliamina e auxina). Os tratamentos de auxina e espermidina, separados ou concomitantes, não diferiram no perfil de transição levedura-hifa. Os cultivos suplementados com 1 mM de espermina diferiam significativamente ($p \leq 0,05$) do cultivo que recebeu apenas auxina (10 pmol). Todavia, os cultivos contendo poliaminas e/ou auxina, não diferiam estatisticamente entre si (**Figura 17A**).

Após 36 horas, o ensaio com espermina e AIA estava com aproximadamente 30% das células em forma de leveduras, semelhante ao cultivo que recebeu apenas espermina. A adição simultânea de espermidina e AIA resultou na transição de aproximadamente 60% das células de *Y. lipolytica*, sem ocorrer efeito somatório (**Figura 17B**). Os resultados demonstram que poliaminas e auxinas concomitantes não diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) dos ensaios que receberam apenas as poliaminas ou o ácido indol-3-acético.

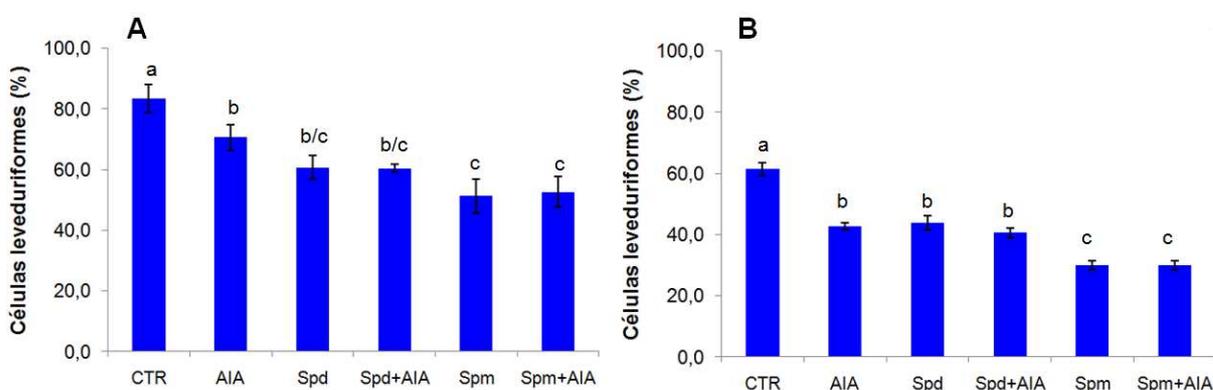


FIGURA 17. Efeito de ácido indol-3-acético (AIA) e as poliaminas espermina (Spm) e espermidina (Spd) na transição dimórfica de *Y. lipolytica*. Perfil da transição dimórfica após 20 horas (A) ou 36 horas (B) de cultivo em 1 mM de Spm ou Spd e/ou 10 pmol de AIA. As barras representam a porcentagem de células leveduriformes no cultivo. A morfogênese celular ocorreu a partir de 18 horas de incubação no cultivo controle (CTR). Células crescidas em meio líquido YED pH 4,5, 30° C e 250 rpm de agitação orbital. Dados representativos de três ensaios independentes. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

O efeito somatório também não foi observado em células cultivadas em meio suplementado com AIA e poliaminas em concentrações inferiores. Células de *Y. lipolytica* crescidas em hormônio auxínico e poliaminas, nas concentrações de 0,1

mM (**Figura 18A**) ou 0,5 mM (**Figura 18B**), apresentaram o mesmo perfil de transição dos cultivos tratados apenas com AIA, com aproximadamente 40% de células leveduriformes no cultivo após 36 horas de incubação. Ensaios com concentrações concomitantes de AIA e poliaminas, mesmo em baixas concentrações, não apresentaram efeito somatório na taxa de transição morfológica da levedura (**Figura 18**).

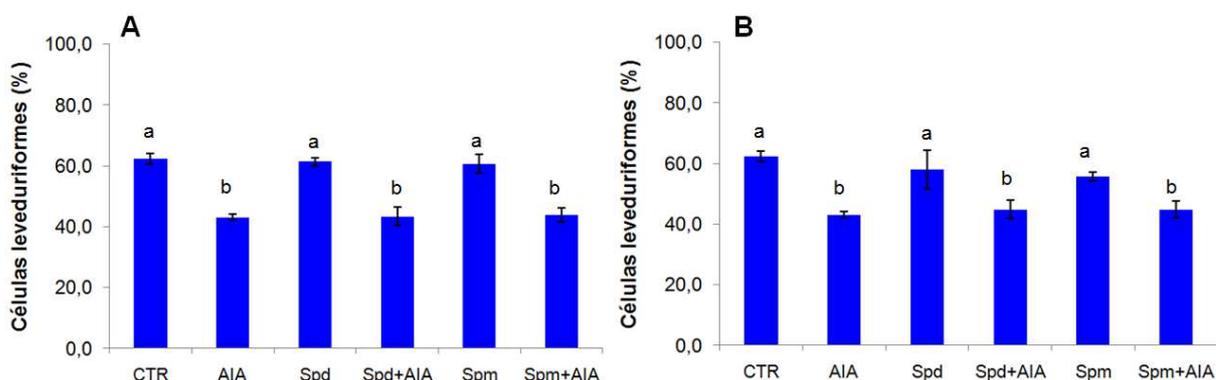


FIGURA 18. Efeito de ácido indol-3-acético (AIA) e poliaminas espermina (Spm) e espermidina (Spd) na transição dimórfica de *Y. lipolytica*. Perfil da transição dimórfica após 36 horas de cultivo em 0,1 mM (A) ou 0,5 mM (B) de Spm ou Spd e/ou 10 pmol de AIA. As barras representam a porcentagem de células leveduriformes no cultivo. A morfogênese celular ocorreu a partir de 18 horas de incubação no cultivo controle (CTR). Células crescidas em meio líquido YED pH 4,5, 30° C e 250 rpm de agitação orbital. Dados representativos de três ensaios independentes. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

5.4 Efeito de poliaminas, ácido indol-3-acético e seus inibidores na transição dimórfica de *Y. lipolytica*

Ensaios foram conduzidos na presença concomitante de auxina (10 pmol) e do inibidor da síntese de poliaminas CHA (2 mM). O ensaio não demonstrou toxicidade para a cultura, uma vez que as células cresceram normalmente, como o cultivo controle (**Figura 19A**). Todavia, a contagem das células leveduriformes de *Y. lipolytica* revelou que o hormônio auxínico ácido indol-3-acético restabeleceu em 100% a transição morfológica bloqueada pelo inibidor CHA (**Figura 19B**). Estes dados demonstram que os compostos auxínicos parecem desempenhar papéis importantes durante o processo de transição levedura-hifa em *Y. lipolytica*, além de atuar independentemente da presença de poliaminas.

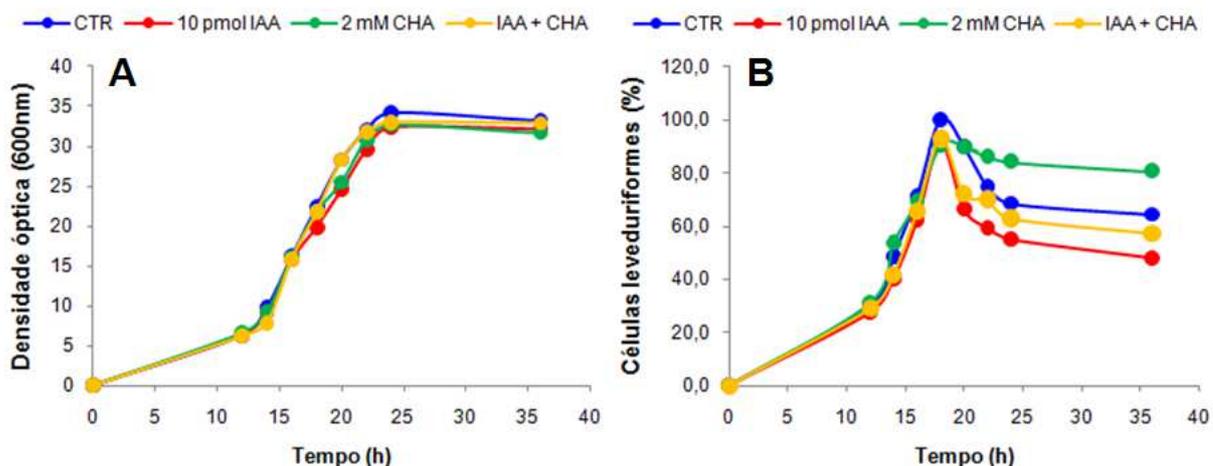


FIGURA 19. Reversão no efeito do inibidor CHA pela adição exógena de ácido indol-3-acético (AIA). (A) Crescimento celular em 10 pmol de AIA e/ou 2 mM de CHA. (B) Porcentagem de células leveduriformes em cultivos conduzidos na presença de 10 pmol de ácido indol-3-acético (AIA) e/ou 2 mM de ciclohexilamino (CHA). No tratamento controle, a transição levedura-hifa foi observada a partir de 18 horas. Dados representativos de três ensaios independentes. Células crescidas em meio líquido YED pH 4,5, 30° C e 250 rpm de agitação orbital.

Em seguida, um novo ensaio foi elaborado, agora a fim de analisar o efeito das poliaminas sobre os inibidores de AIA. Os inibidores do hormônio utilizados foram o ácido α -(p-clorofenoxi) isobutírico (PCIB) e o ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA). O PCIB é capaz de inibir a sinalização da auxina, pois ele previne a expressão de genes específicos que normalmente são expressos pela cascata de sinalização da auxina, enquanto o TIBA inibe os transportadores específicos do hormônio na célula. Ambos os inibidores mostraram-se capazes de prevenir a transição levedura-hifa em *Y. lipolytica*, após 36 horas de incubação, cerca de 85 a 90% das células ainda permaneciam leveduriformes em cultivos incubados na presença destes inibidores (**Figura 20**).

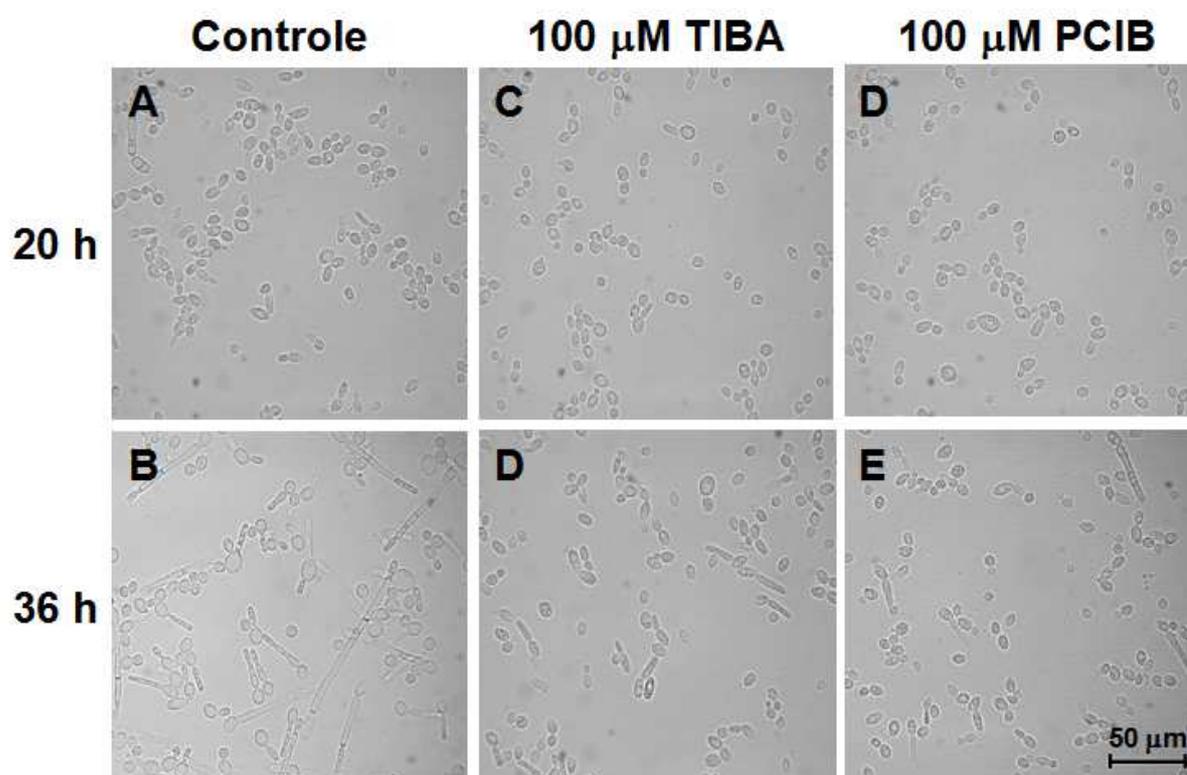


FIGURA 20. Efeito dos inibidores TIBA e PCIB na morfologia das células de *Y. lipolytica*. A e B são células incubadas na ausência de inibidores; C e D crescidas em 100 μM de ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA); E e F incubadas em 100 μM de α-(p-clorofenoxi) isobutírico (PCIB) após 20 e 36 horas de incubação, respectivamente. Cultivo realizado em meio líquido YED, pH 4,5, 30° C e 250 rpm de rotação orbital. A morfogênese foi observada a partir das 18 horas de incubação no controle. Microscopia óptica de contraste de fase, aumento de 400x, barra representa 50 μm.

As células foram crescidas em meio contendo 1 mM das poliaminas espermina ou espermidina mais 100 μm de PCIB ou 100 μm de TIBA. As observações dos cultivos indicaram que as poliaminas, mesmo na concentração de 1 mM, não foram capazes de reverter o efeito bloqueador causado pelos inibidores PCIB e TIBA (**Figura 21**). Após 36 horas de incubação, os cultivos que receberam doses concomitantes de poliaminas e inibidores permaneceram com aproximadamente 85 a 90% de suas células no formato de leveduras em ambos os inibidores. Os resultados permitem inferir possível dependência das poliaminas pela sinalização mediada pelo ácido indol-3-acético no processo de transição levedura-hifa em *Y. lipolytica*.

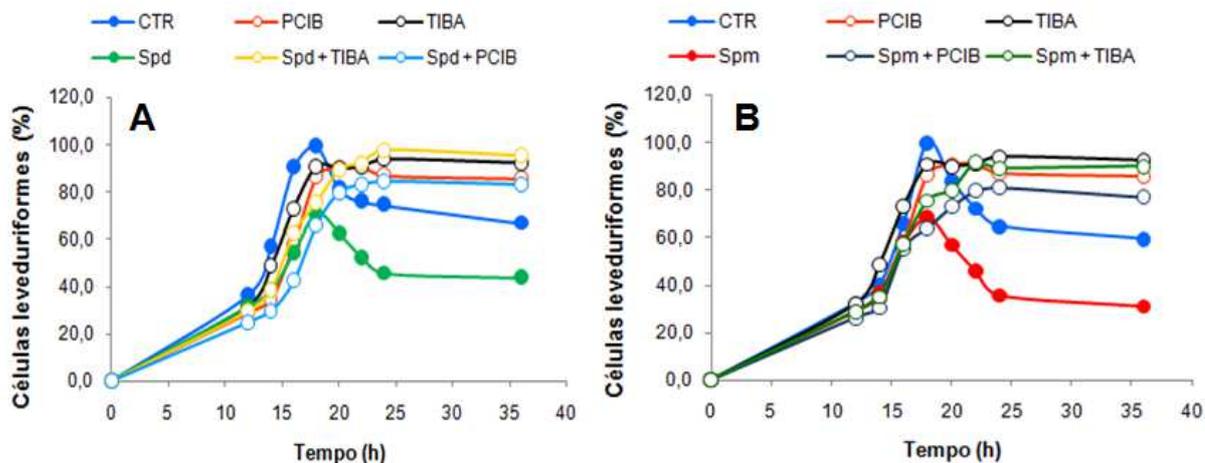


FIGURA 21. Efeitos dos inibidores PCIB e TIBA na transição dimórfica causada pelas poliaminas. (A) Porcentagem de células leveduriformes em cultivo conduzido na presença de 1 mM de espermidina (Spd) e/ou 100 μ m de 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) ou α -(p-clorofenoxi) isobutírico (PCIB). (B) Porcentagem de células leveduriformes em cultivo conduzido na presença de 1 mM de espermina (Spm) e/ou 100 μ m de PCIB ou TIBA. Células crescidas em meio líquido YED pH 4,5, 30° C e 250 rpm de agitação orbital. No tratamento controle, a transição levedura-hifa foi observada a partir de 18 horas. Dados representativos de três ensaios independentes.

5.5 Atividade das H⁺-ATPases durante a morfogênese de *Y. lipolytica*

O isolamento das membranas totais foi conduzido a fim de verificar o efeito das poliaminas na atividade de H⁺-ATPases durante a morfogênese das hifas fúngicas. As membranas foram isoladas pela utilização de enzimas líticas, capazes de hidrolisar a parede celular e formar poros por onde os esferoplastos podem sair, servindo como fontes de membranas para o estudo das H⁺-ATPases (**Figura 22**).

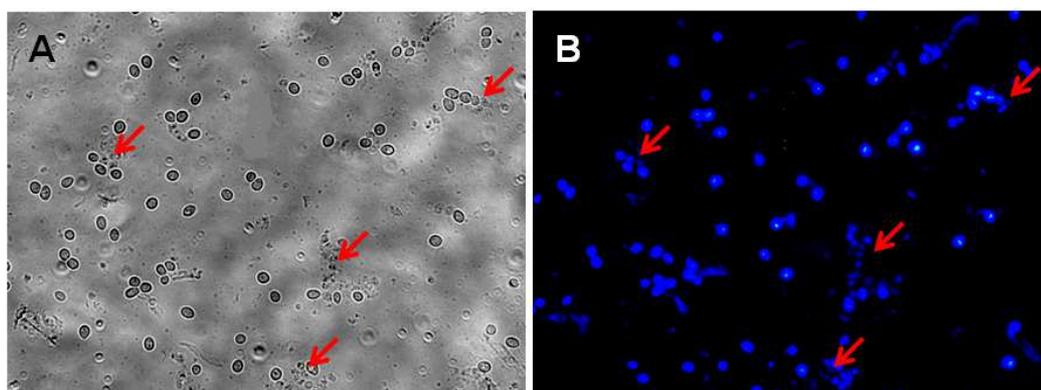


FIGURA 22. Detalhe de esferoplastos isolados de células de *Y. lipolytica*. (A) microscopia óptica contraste de fase, setas indicam possíveis esferoplastos, visíveis pela presença de grânulos de polifosfato presentes em vacúolos celulares. (B) Marcador CellTracker Blue CMAC para lúmen de vacúolos. Células crescidas por 20 horas em YED, pH 4,5, 30° C e 250 rpm de agitação orbital. Imagem feita após incubação de 20 minutos com enzima lítica. Aumento de 400x.

A análise do transporte de H^+ foi conduzida usando a sonda fluorescente (ACMA). O ACMA se liga aos H^+ que estão do lado externo da célula e, juntos, atravessam a membrana plasmática. Assim, as concentrações de H^+ e também de ACMA no exterior da célula se tornam menores, resultando no decaimento da sua fluorescência. A atividade de transporte pelas H^+ -ATPases tipo P foi calculado pelo F_{\max} da atividade total menos o F_{\max} da atividade na presença de 200 μM de vanadato. H^+ -ATPase tipo P teve o transporte sensivelmente aumentado após o início da transição. A atividade das bombas aumentou gradativamente à medida que ocorria o crescimento polarizado nas células de *Y. lipolytica* (**Figura 23**).

O transporte de H^+ via ATP-dependente e vanadato-sensível apresentou baixa atividade no momento em que as células estavam na forma de leveduras (14 horas). Todavia, com o início da transição levedura-hifa (20 horas), o transporte de H^+ aumentou, principalmente no cultivo contendo 1 mM de espermina. Após 26 horas de cultivo, o transporte de H^+ continuou a aumentar em ambos os tratamentos, apesar de diminuir a diferenças entre os cultivos contendo espermina e controle. Paradoxalmente, o aumento no transporte de H^+ através das membranas foi acompanhado pela alcalinização da matriz extracelular (**Figura 23**).

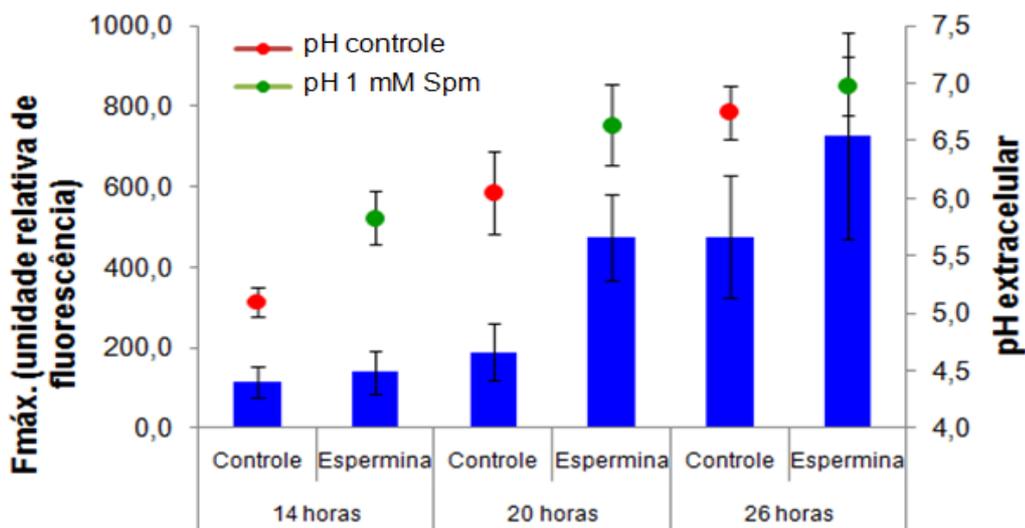


FIGURA 23. Efeito da espermina (Spm, 1 mM) no transporte de H^+ ATP-dependente e vanadato-sensível (H^+ -ATPase tipo P) durante a transição levedura-hifa em *Y. lipolytica*. As membranas foram isoladas após 14, 20 e 26 horas de cultivo de *Y. lipolytica* crescidas em meio YED líquido, pH 4,5, a 30° C e 250 rpm de agitação orbital. Barras (em azul) representam a F_{\max} da atividade vanadato-sensível das H^+ -ATPases de membranas, calculada pelo decaimento da fluorescência da sonda ACMA. Dispersão representa o pH extracelular da cultura controle (vermelho) e espermina (verde) durante a transição dimórfica. Dados representativos de três ensaios independentes (n=3).

Como pode ser observado na **Figura 24**, a adição do ATP às vesículas de membranas de células tratadas ou não com as poliaminas promoveu o decaimento da fluorescência da sonda fluorescente ACMA, a qual foi prevenida em até 85% pela adição de 0,2 mM de vanadato (VO_4^{-3}), indicando que o transporte de H^+ em membranas totais de *Y. lipolytica* foram mediada principalmente pela H^+ -ATPase tipo P de membrana plasmática. Praticamente o mesmo percentual de inibição do vanadato foi obtido em vesículas de membranas isoladas de células tratadas com 1 mM de espermina, contudo, a amplitude máxima no transporte vanadato-sensível de H^+ foi duas vezes maior após 20 horas de incubação ou 1,5 vezes superior após 26 horas de incubação nos tratamentos contendo 1 mM de espermina, indicando que as bombas de H^+ tipo P foram estimuladas pela poliamina. Em 14 horas de incubação, não foi observada diferenças na amplitude máxima no transporte de H^+ entre os tratamentos, indicando não haver diferenças entre eles (**Figura 24**).

A razão das atividades de transporte entre as células cultivadas na presença de espermina e o controle (Spm/CTR) demonstrou que após 20 horas de cultivo, as bombas estavam 2,5 vezes mais ativas na presença de espermina. Após 26 horas, a diferença diminuiu para 1,5 vezes, apesar disso, esta condição não diferiu estatisticamente da razão obtida em 14 horas de incubação (**Figura 24D**).

Assim como o transporte de H^+ , a velocidade inicial das bombas ATP-dependente e vanadato sensível (H^+ -ATPase do tipo P) também aumentou à medida que as células passavam pelas mudanças morfogênicas. Em 14 horas de crescimento, não havia diferenças na velocidade inicial do transporte de H^+ entre o cultivo contendo espermina e o controle. A partir das 20 horas, a diferença foi evidenciada, pois o tratamento com a poliamina apresentou velocidade inicial praticamente duas vezes superior ao controle, como ocorreu com F_{max} . A diferença entre os tratamentos é mantida após 26 horas de crescimento, apesar de também ocorrer a diminuição na velocidade inicial entre os cultivos (**Figura 24D**).

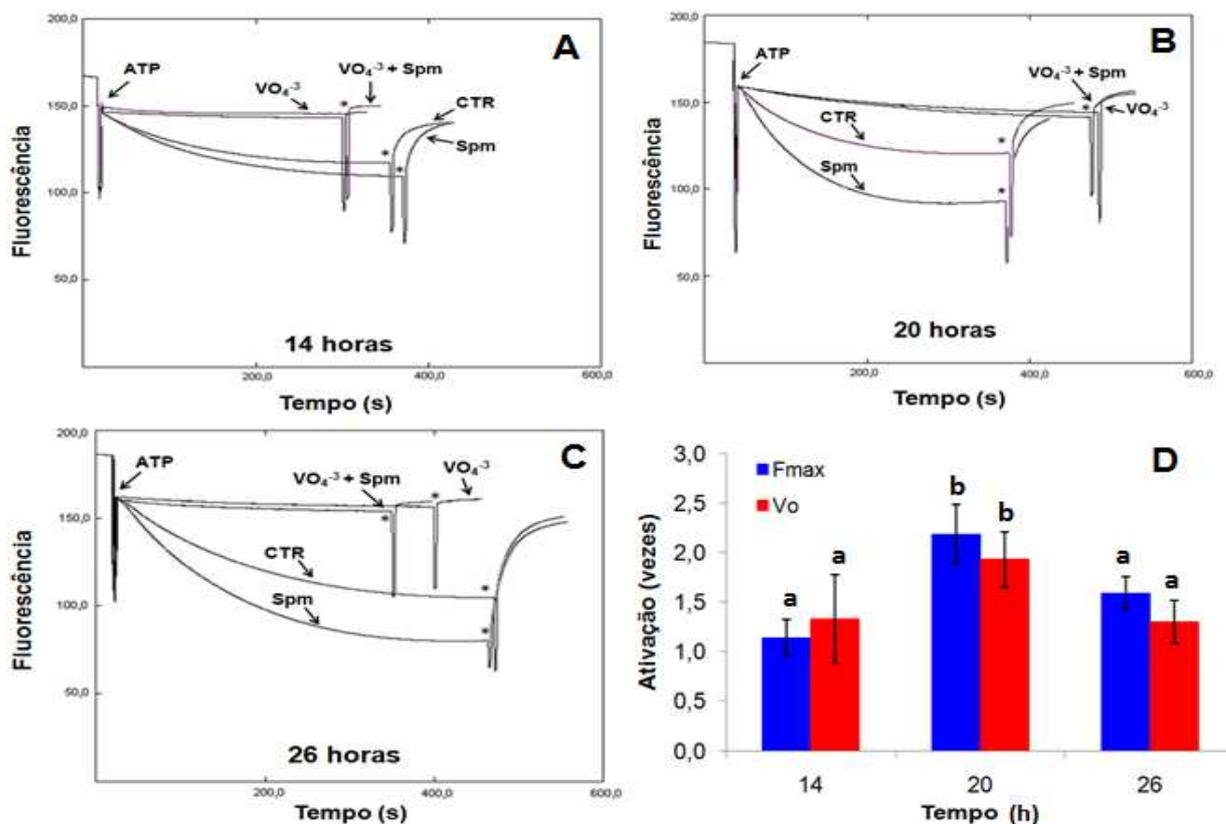


FIGURA 24. Transporte de H⁺ ATP-dependente e vanadato-sensível em células de *Y. lipolytica*. Formação do ΔpH pelo decaimento da sonda fluorescente ACMA em células incubadas na ausência ou presença de 1 mM de espermina (Spm) após 14 horas (A), 20 horas (B) ou 26 horas de cultivo (C). (*) Indicam a adição de 2 mM de cloreto de amônia (NH₄Cl), utilizado para desfazer o gradiente protônico. O transporte de H⁺ ATP-dependente e vanadato sensível foi obtido a partir da adição de 1 mM de ATP e 200 μM de vanadato (VO₄³⁻) nas membranas isoladas de células incubadas na presença ou ausência de espermina. (D) Ativação do transporte de H⁺ ATP-dependente e vanadato-sensível pela relação Spm/CTR da fluorescência máxima (F_{max}) e velocidade inicial de reação (V_o) após 14, 20 e 26 horas de incubação. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste Tukey (p < 0,05). A incubação das células de *Y. lipolytica* foi realizada em meio YED líquido, pH 4,5, a 30° C e 250 rpm de rotação orbital.

5.6 Poliaminas e o pH extracelular

O alteração do pH extracelular foi acompanhado durante o crescimento celular em meio sólido ou líquido nas diferentes condições de tratamento. O cultivo de *Y. lipolytica* promove naturalmente a alcalinização do meio extracelular, como ocorre em *C. albicans*. O uso do indicador púrpura de bromocresol revelou que poliaminas intensificam a alcalinização extracelular, a qual passa a ocorrer mais rápido. Após 60 horas de incubação, o cultivo na presença de poliaminas está bem mais alcalinizado que o cultivo na ausência de poliaminas. A antecipação também foi observada quando 10 pmol de AIA foram adicionados ao meio (Figura 25 e 26).

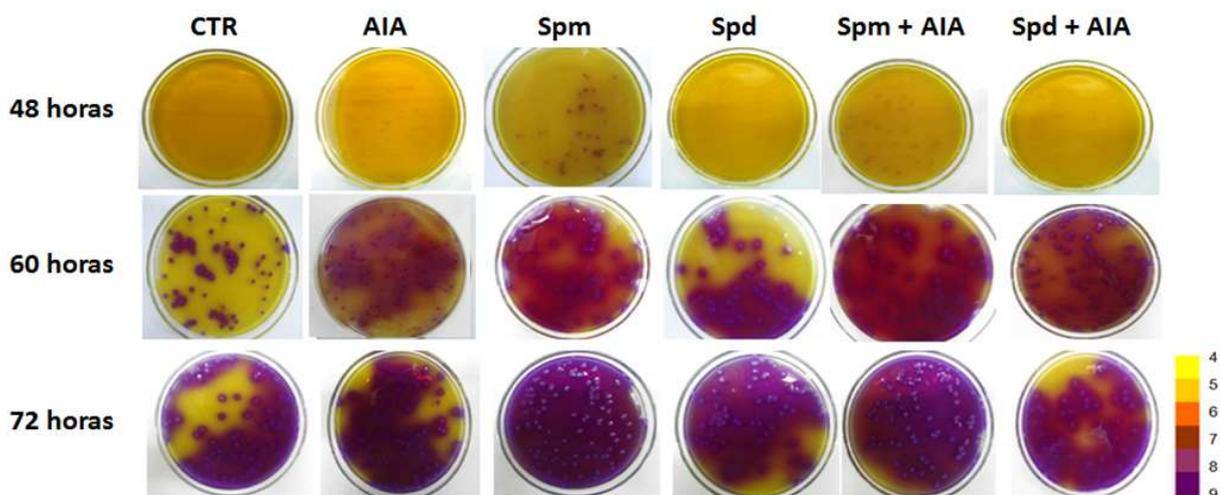


FIGURA 25. Avaliação do pH extracelular pelo indicador púrpura de bromocresol em cultivos sólidos de *Y. lipolytica*. As colônias cresceram na presença de 1 mM de espermina (Spm) ou espermidina (Spd) e/ou 10 pmol de ácido indol-3-acético (AIA). As colônias cresceram por 48, 60 ou 72 horas em YED, pH 4,5 a 30° C para posterior adição do indicador púrpura de bromocresol (0,015%) sobre a cultura.

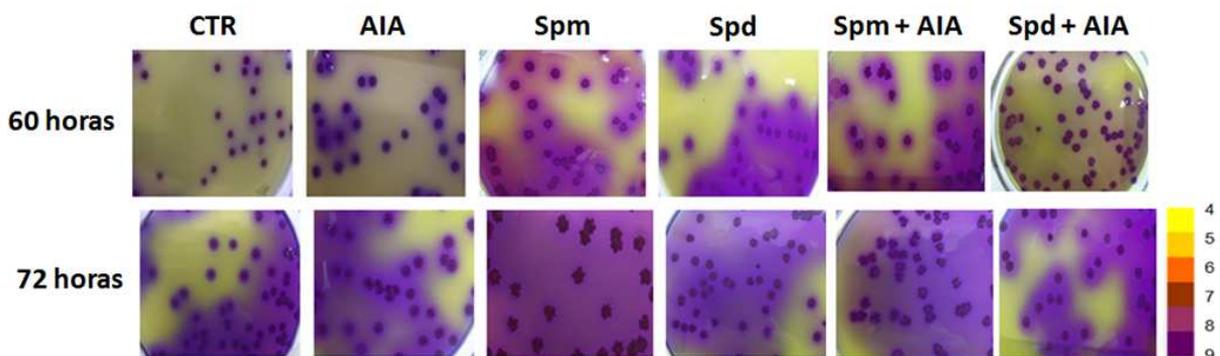


FIGURA 26. Detalhe do meio extracelular e das colônias de *Y. lipolytica* coradas pelo indicador púrpura de bromocresol. As colônias cresceram na presença de 1 mM das poliaminas espermina (Spm) ou espermidina (Spd) e/ou 10 pmol de ácido indol-3-acético (AIA). As colônias cresceram por 48, 60 ou 72 horas em YED, pH 4,5 a 30° C para posterior adição do indicador púrpura de bromocresol (0,015%) sobre a cultura.

A transição dimórfica da *Y. lipolytica* ocorre a partir das 18 horas de incubação em meio líquido, momento em que o pH está entre 6,0 e 6,5. Células não-leveduriformes não foram observadas em culturas cujo pH estava abaixo de 6,0. A adição de poliaminas, assim como auxina, também intensificou a alcalinização em meio líquido, tornando o pH superior ao cultivo ausente destas moléculas. Todavia, a adição concomitante de poliaminas e auxinas não diferiu significativamente do pH extracelular de cultivos crescidos apenas em poliaminas (dados não mostrados).

As culturas crescidas na presença dos inibidores TIBA e PCIB tiveram a alcalização extracelular retardada, apenas as colônias alcalinizaram após 72 horas de crescimento, enquanto as culturas sem os inibidores estavam completamente alcalinizadas. A adição concomitante de inibidores e poliaminas também não promoveu a alcalização extracelular, o meio apresentava-se menos alcalino que os ensaios ausentes de poliaminas e inibidores (**Figuras 27 e 28**).

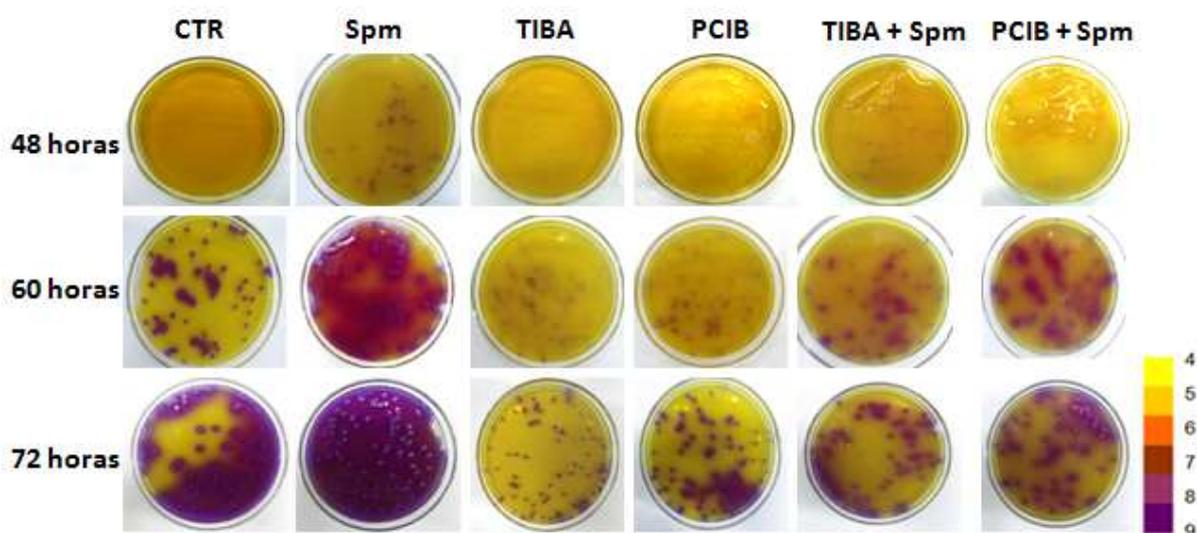


FIGURA 27. Avaliação do pH extracelular pelo indicador púrpura de bromocresol em cultivo sólido de *Y. lipolytica* em espermina e/ou os inibidores TIBA e PCIB. As colônias cresceram na presença de 1 mM de espermina (Spm) e/ou 100 μ M de ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) ou α -(p-clorofenoxi) isobutírico (PCIB). As colônias cresceram por 48, 60 ou 72 horas em YED, pH 4,5 a 30° C para posterior adição do indicador púrpura de bromocresol (0,015%) sobre a cultura.

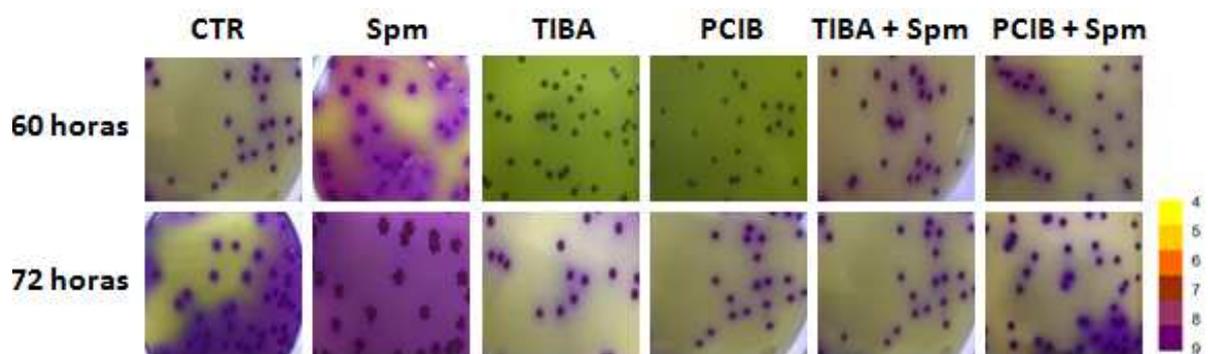


FIGURA 28. Detalhe do meio extracelular e das colônias de *Y. lipolytica* coradas com o indicador púrpura de bromocresol. As colônias cresceram na presença de 1 mM de espermina (Spm) e/ou 100 μ M de ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) ou α -(p-clorofenoxi) isobutírico (PCIB). As colônias cresceram por 48, 60 ou 72 horas em YED, pH 4,5 a 30° C para posterior adição do indicador púrpura de bromocresol (0,015%) sobre a cultura.

Em meio líquido, a adição de ambos os inibidores também retardou a alcalinização extracelular. Após 24 horas de incubação, o meio sem inibidores estava com o pH próximo a 7,0, enquanto a cultura crescida em PCIB e TIBA estava com pH extracelular em torno de 5,5 (**Figura 29**). Após 36 horas de cultivo, as culturas com os inibidores estavam mais alcalinizadas, mesmo assim a transição levedura-hifa não ocorreu, mesmo com adição de espermina.

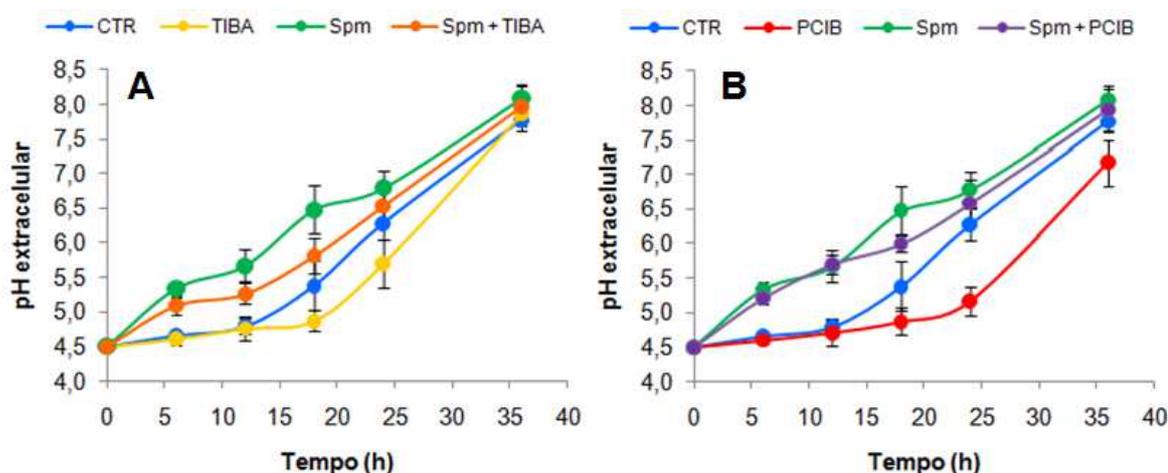


FIGURA 29. Avaliação do pH extracelular em meio YED líquido pelo aparelho pHmetro. As células cresceram em 1 mM de espermina (Spm). (A) Ensaio conduzido na presença de espermina e/ou 100 μ M de ácido 2,3,5-triodobenzóico (TIBA). (B) Ensaio conduzido na presença de espermina e/ou α -(p-clorofenoxi) isobutírico (PCIB). Células cresceram até 36 horas em meio YED líquido, pH 4,5 a 30° C, 250 rpm em agitação orbital.

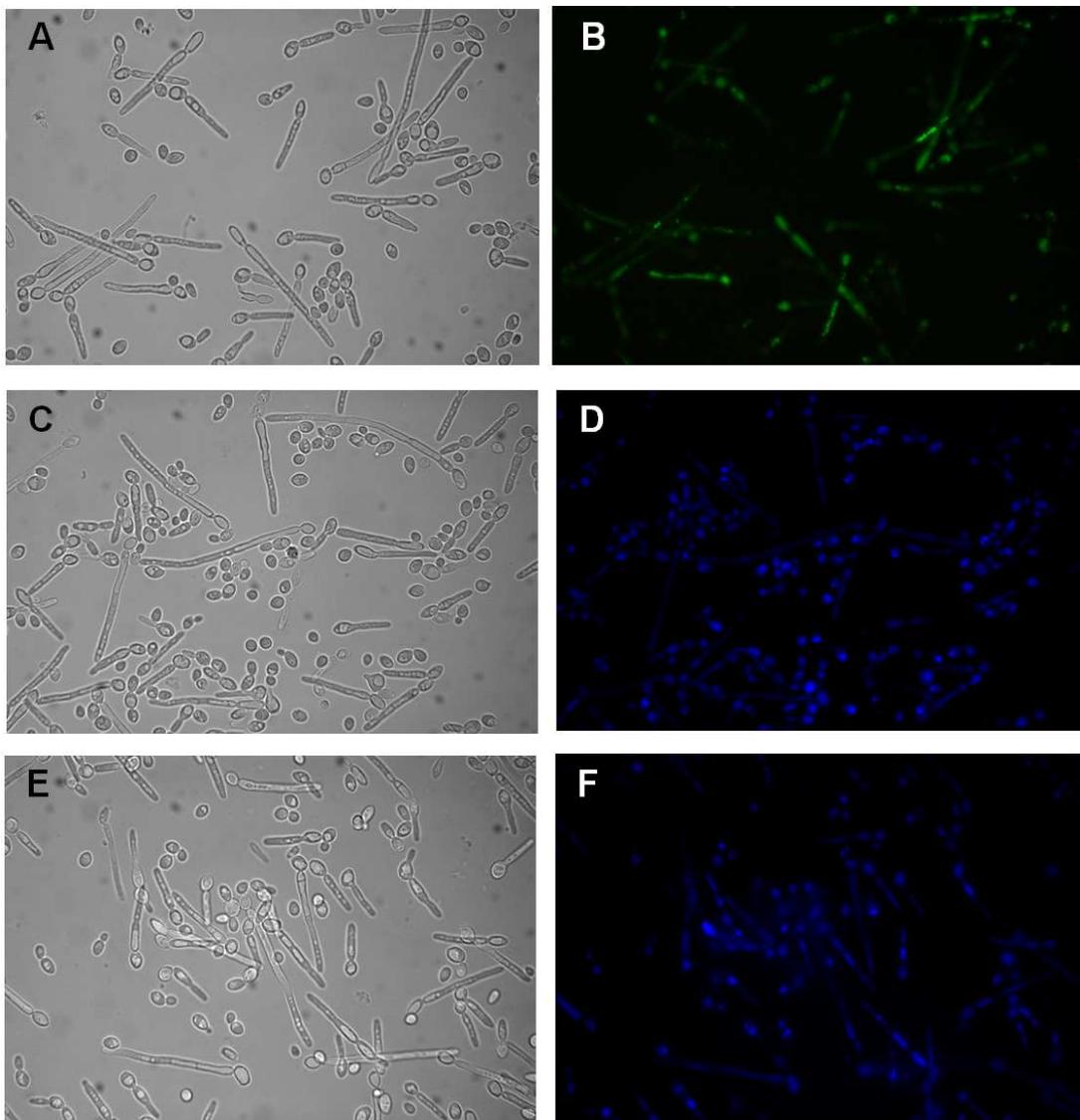
5.7 A dinâmica vacuolar durante o crescimento polarizado

Conforme demonstrado, o pH extracelular parece ser importante fator na promoção do dimorfismo e uma organela diretamente envolvida na regulação do pH é o vacúolo celular. O estudo da dinâmica vacuolar durante o dimorfismo foi acompanhado pelo emprego de marcadores vacuolares fluorescentes, os quais revelam as características e a viabilidade da organela durante o processo.

Os marcadores fluorescentes do lúmen vacuolar carboxi-DCFDA, CellTraker Blue CMAC, CMAC-Arg e CMAC-Ala-Pro (Molecular Probes) auxiliaram na caracterização da organela durante a morfogênese de *Y. lipolytica*, como observado na **Figura 30A-H**. Esses marcadores se difundem pela parede celular, devido à natureza hidrofóbica. Eles, então, reagem com grupos tióis, como da glutatona, produzindo conjugados fluorescentes impermeáveis à membrana, acumulando-se no

lúmen vacuolar. O marcador de membrana vacuolar MDY-64 também foi utilizado para caracterizar a dinâmica vacuolar em *Y. lipolytica* (**Figura 30I-L**). Esse marcador ligar-se aos constituintes da membrana vacuolar e produz a fluorescência.

Apesar de não existir descrição sobre a especificidade celular, durante o ensaio foi observado que os marcadores do lúmen vacuolar CellTraker Blue CMAC, CMAC-Arg e CMAC-Ala-Pro, apesar de marcar células hifais, produziram efeitos mais evidentes em leveduras, enquanto o marcador carboxi-DCFDA, apresentou fluorescência mais forte principalmente em células no formato de hifas, como pode ser observado na **Figura 30**.



(continua na página seguinte).

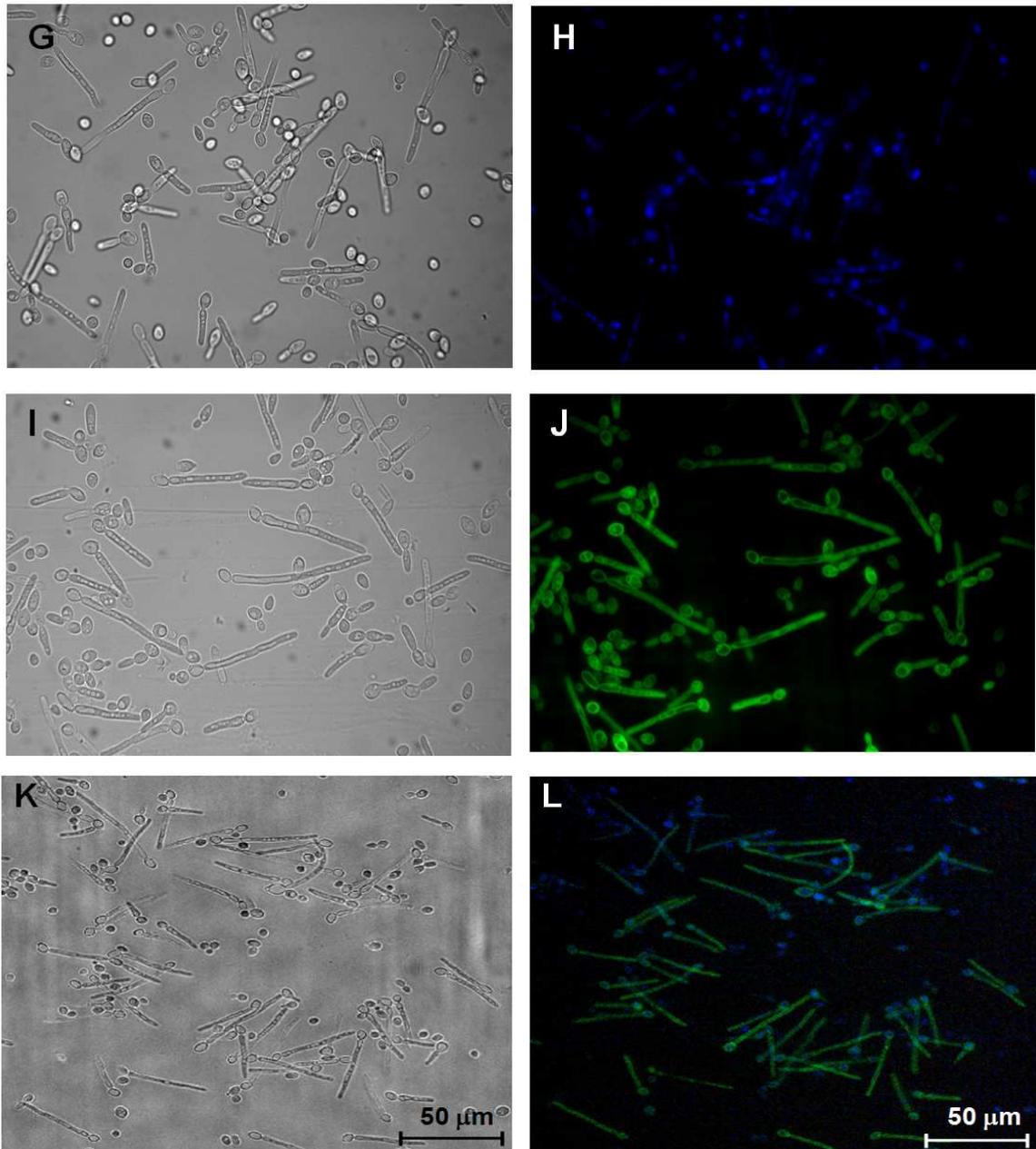


FIGURA 30. Marcação fluorescentes de vacúolos celulares de *Y. lipolytica* cepa JM-12. As imagens B, D, F e H são marcações fluorescentes do lúmen vacuolar; em J marcação da membrana vacuolar e em L sobreposição de marcações do lúmen e membrana vacuolar. (B) carboxy-DCFDA, (D) CellTraker Blue CMAC, (F) CMAC-Arg, (H) CMAC-Ala-Pro, (J) MDY-64 e (L) CellTraker Blue mais MDY-64. Células crescidas por 26 horas em meio líquido YED pH 4,5, 30° C e 250 rpm de agitação orbital. Microscopia óptica de fluorescência, aumento de 400x, barra representa 50 μm.

A utilização de marcadores fluorescentes permitiu identificar segregações vacuolares durante o crescimento polarizado, com a formação de vários vacúolos de tamanhos diferentes, enquanto células leveduriformes apresentam apenas um vacúolo, geralmente grande, que cresce à medida que a célula se diferencia. Outra observação importante é a presença de pequenos vacúolos nas pontas das hifas,

exatamente o local de intensa atividade durante o crescimento polarizado, o que sugere a participação dessas pequenas vesículas no crescimento hifal (**Figura 31**).

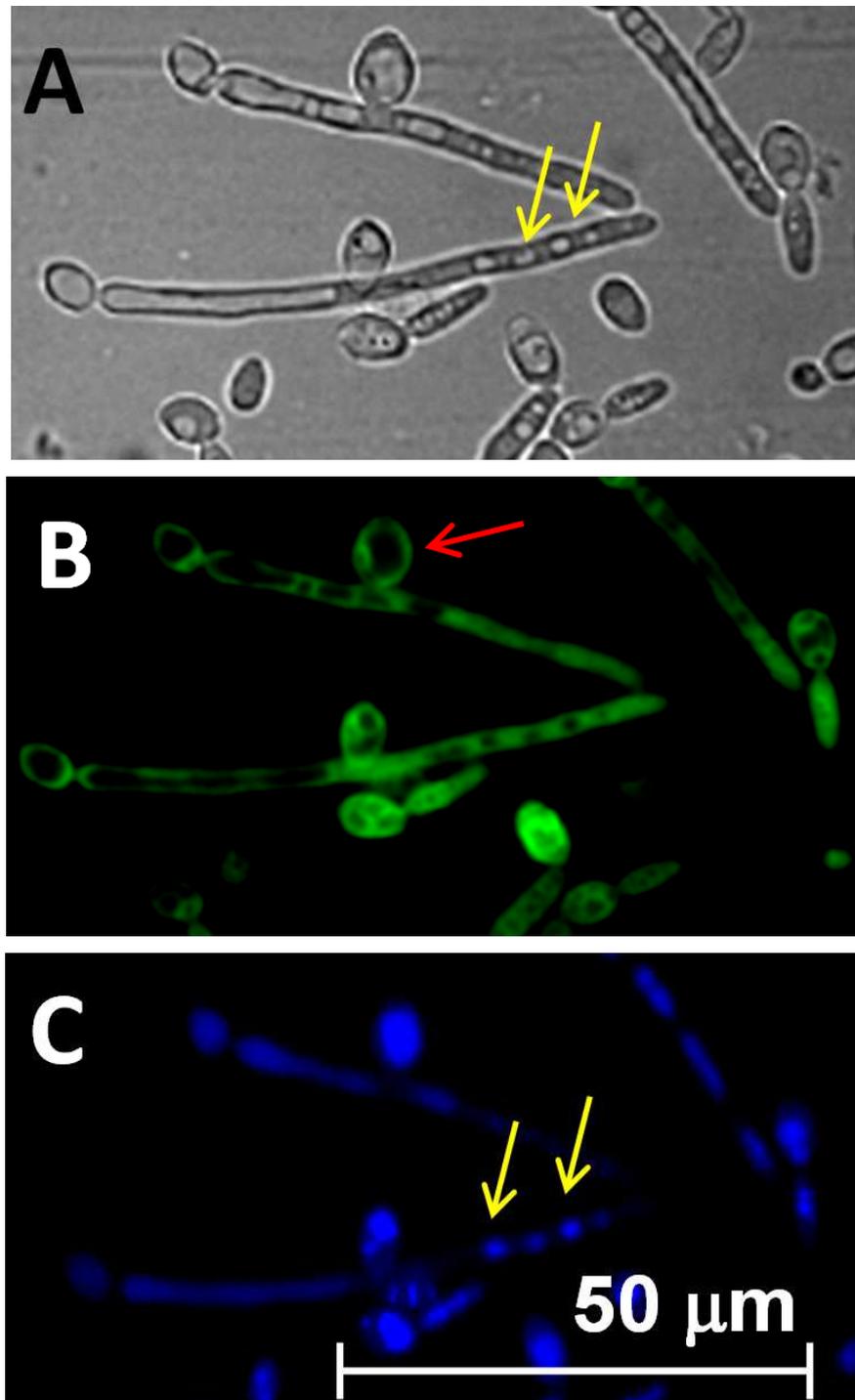


FIGURA 31. Detalhe dos vacúolos durante o crescimento polarizado das hifas de *Y. lipolytica*. (A) Imagem microscópica em contraste de fase; aumento de 100x. (B) Marcador da membrana vacuolar MDY-64. (C) Marcador do lúmen vacuolar CellTraker Blue CMAC. Setas amarelas indicam pequenos vacúolos localizados nas pontas das hifas e segregação vacuolar durante o crescimento polarizado, seta vermelha indica um vacúolo grande ocupando quase todo espaço citoplasmático da célula. Células crescidas por 26 horas em meio líquido YED pH 4,5, 30° C e 250 rpm de agitação orbital. Microscopia óptica de fluorescência, aumento de 400x, barra representa 50 µm.

5.8 A morfologia das colônias

O crescimento das colônias em meio sólido foi observado na presença ou ausência de poliaminas e auxina, concomitantemente ou não. A observação dos ensaios revelou diferenças importantes no aspecto e arquitetura das colônias. As células crescidas em meio ausente de poliaminas ou auxina apresentavam o aspecto menos rugoso, enquanto os demais ensaios a rugosidade era bem evidente. As colônias crescidas em meio contendo auxina (10 pmol) ou espermidina (1 mM) apresentavam as colônias no formato de cérebro, com diversas protuberâncias no seu desenvolvimento. As colônias crescidas em meio contendo espermina (1 mM) possuíam formato distinto, pois as colônias assumiam a forma de cratera, com as bordas rodeadas por uma protuberância maior que as demais. As colônias crescidas na presença de poliaminas também se apresentavam maiores em relação ao controle e circuncidadas por longas franjas filamentosas que auxiliavam as colônias a se invaginarem em meio sólido (**Figura 32**).

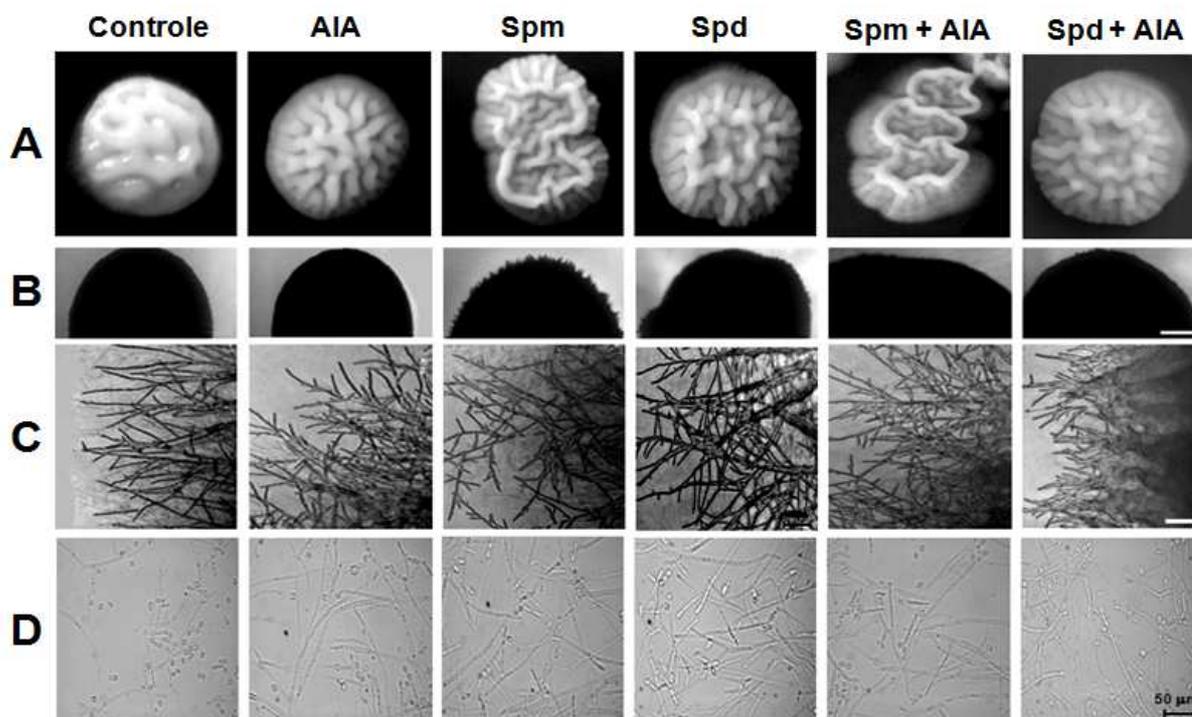


FIGURA 32. Morfologia das colônias de *Y. lipolytica*. As colônias cresceram por 7 dias na presença de 10 pmol de ácido indol-3-acético (AIA) e/ou 1 mM de poliaminas espermina (Spm) e espermidina (Spd). (A) Aspecto das colônias crescidas por 7 dias, imagens obtidas utilizando câmera digital. (B) Formação das bordas das colônias no início do crescimento (3 dias), imagens obtidas em microscópio invertido; aumento de 50x, barra corresponde a 500 µm. (C) Franjas das colônias crescidas por 7 dias em meio sólido, imagens obtidas a partir de microscópio invertido; aumento de 200x, barra corresponde a 100 µm. (D) Morfologia das células de *Y. lipolytica* crescidas em meio sólido, imagens obtidas a partir de microscópio óptico de contraste de fase; aumento de 400x, barra corresponde a 50 µm.

Essas franjas provavelmente são mais eficazes na invasão do meio sólido pela célula fúngica, assim como na aderência das colônias à superfície sólida. A análise microscópica das colônias revelou que as colônias crescidas em todas as condições possuíam hifas, contudo esses tipos celulares eram observados em maiores quantidades nas colônias crescidas na presença de poliaminas e/ou auxinas. Outro aspecto interessante foi a presença de muitas ramificações nas hifas crescidas nos meio suplementados com o hormônio auxínico (**Figura 32**), característica exclusiva de crescimento celular em meio sólido, uma vez que esse tipo de processo não ocorreu em meio líquido.

6. DISCUSSÃO

6.1 O efeito das poliaminas na transição dimórfica da *Y. lipolytica*

A morfogênese celular em micro-organismos é um fenômeno comum e extremamente importante no estabelecimento das relações entre eles e seus hospedeiros, tanto interações benéficas quanto as que causam algum tipo de malefício. A maioria das patologias causada por fungos, por exemplo, ocorrem após a transição levedura-hifa, como nos patógenos humanos *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Penicillium marneffeii* e *Coccidioides immitis* ou nos fungos fitopatogênicos *U. maydis* e *Mucor ramosus* (Orlowski, 1991; San-Blas *et al.*, 1997; Herrero *et al.*, 1999; Rodríguez-Kessler *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2013). Em contrapartida, a morfogênese celular também é importante durante eventos simbióticos, como nas associações micorrízicas, em que o crescimento polarizado é crucial no estabelecimento e colonização do sistema radicular pelos micro-organismos (Ramos *et al.*, 2008a,b, 2009).

Nos fungos dimórficos, o crescimento polarizado está relacionado à sobrevivência em condições adversas, na aquisição de nutrientes e na virulência de fungos patogênicos (Kawasse *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2013). Este fenômeno é regulado em *C. albicans*, por exemplo, de forma que ocorra o sincronismo na morfogênese a partir da comunicação célula-célula por meio da excreção de moléculas do “*quorum sensing*” (Han *et al.*, 2012). Além destas moléculas, a mudança no pH extracelular, a presença de hormônios e, até mesmo, de poliaminas são reconhecidos por alterar a morfologia das células (Guevara-Olvera *et al.*, 1993; Prusty *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2012). Todavia, o mecanismo utilizado por estes efetores não é descrito. Por esse motivo, a proposta do presente trabalho vai além de responder o que causa, busca-se explicar como causa. A fim de entender a regulação da morfogênese, algumas perguntas foram naturalmente levantadas: os ativadores da filamentação estariam interligados por meio de cascata ou estariam atuando independentemente? Qual a sequência dos eventos? Quem comandaria a morfogênese e como?

Os resultados obtidos durante o presente trabalho permitem sugerir uma seqência de eventos que serão apresentados no decorrer da discussão e que

seriam responsáveis por comandar a morfogênese em *Y. lipolytica*. Todos estes fatos permitem esclarecer um ponto ainda obscuro na ciência sobre o mecanismo de ação do crescimento polarizado em hifas fúngicas.

Iniciando pela *Y. lipolytica*, conhecida como fungo dimórfico natural e não-patogênico, o micro-organismo representa excelente modelo de estudo no crescimento polarizado, principalmente por possibilitar a distinção clara das diferentes morfologias e possuir semelhanças com a *C. albicans*, principal patógeno humano. De fato, a levedura apresenta-se como mais uma ferramenta de estudo, mesmo que tenha diferenças filogenéticas, fisiológicas ou moleculares das leveduras convencionais *S. cerevisiae* e *S. pombe* (Dujon *et al.*, 2004). Conforme pode ser observado na **Figura 9**, as células de *Y. lipolytica*, incubadas em meio rico em glicose iniciam naturalmente o crescimento filamentososo a partir de 18 horas de incubação, surgindo as primeiras pseudohifas. Por volta das 20 ou 22 horas surgem as hifas verdadeiras e após 36 horas de cultivo, aproximadamente 40% das células não são mais leveduras.

Os ensaios realizados a fim de encontrar as concentrações de poliaminas capazes de alterar significativamente os padrões da morfogênese celular, demonstraram que baixas concentrações, em pMol ou nMol de poliaminas, não alteram as taxas de transição da cultura (não mostrado), enquanto concentrações próximas a 1 mM promovem a morfogênese da cultura. Conforme **Figura 10 e 11**, o aumento gradual na concentração de espermina ou espermidina interfere significativamente no formato da célula a partir de 0,6 mM, apesar de não influenciar no crescimento celular.

As poliaminas estão relacionadas a diversos processos inerentes à atividade de hormônios, como a replicação, transcrição, tradução, estabilização da membrana, modulação da atividade de enzimas, alongação e desenvolvimento celular, além de apresentar diferenças na concentração entre espécies, órgãos, tecidos ou até mesmo no estágio de desenvolvimento. Todavia, a concentração endógena de poliaminas, entre 10^{-9} e 10^{-5} M, é muito superior às concentrações de hormônios, encontradas em torno de 10^{-13} a 10^{-7} M (Kuznetsov e Shevyakova, 2007).

Em *E. coli* crescidas em pH neutro, as células possuem aproximadamente 13,1 μmol de putrescina e 4,7 μmol de espermidina por grama de células. A concentração intracelular de putrescina é de 0,02 M e de espermidina cerca de

0,006 M na bactéria (Tabor e Tabor, 1985). Em *Y. lipolytica*, as poliaminas putrescina, espermidina e espermina (livre ou conjugada) estão em concentrações variantes dentro da escala de nmol. Os níveis endógenos das poliaminas aumentam durante a transição levedura-hifa (Guevara-Olvera *et al.*, 1993). As poliaminas constituem, juntamente com Mg^{2+} e Ca^{2+} , as maiores concentrações de compostos policatiônicos no interior celular, e estão, em sua maior parte livres, assim como o cátion Mg^{2+} (Igarashi e Kashiwagi, 1999). Dessa forma, altas concentrações endógenas e elevadas concentrações necessárias para alterar o perfil da transição permitem inferir que as poliaminas atuam como possíveis mediadores celulares, capazes de modular diversos processos, mas não devem atuar como biossinalizadores altamente específicos como os hormônios.

Dentre as poliaminas, a espermina demonstra maior tendência em induzir o processo de filamentação quando comparado a espermidina, apesar de não ser possível determinar diferenças significativas. Após 36 horas de cultivo, cerca de 30% das células estão no formato leveduriforme em 1 mM de espermina contra 40% em 1 mM de espermidina (**Figuras 10 e 11**). Esta sutil efetividade da espermina pode ser atribuída às diferenças estruturais entre as poliaminas, por exemplo, a espermina possui quatro cargas positivas, composta por dois grupamentos amino primários e dois secundários, enquanto a espermidina possui apenas três grupamentos amino. Atividades diferenciais das poliaminas também são reportadas em outros sistemas biológicos (Tabor e Tabor, 1985; San-Blas *et al.*, 1997; Garufi *et al.*, 2007).

A relação das poliaminas com a morfogênese de fungos já foi descrita em outras espécies, como *Mucor rouxi* (Cano *et al.*, 1988), *Glomus mosseae* (El Ghachtouli *et al.*, 1996), *P. brasiliensis* (San-Blas *et al.*, 1997), *C. albicans* (Ueno *et al.*, 2004), *Gigaspora rosea* (Sannazzaro *et al.*, 2004) e *U. maydis* (Valdés-Santiago *et al.*, 2009). Todavia, o modo de ação destas moléculas na morfogênese ainda é obscuro e incerto, sendo importante conhecer os fatos relevantes que servem de base para novas hipóteses.

De fato, o papel das poliaminas no dimorfismo de *Y. lipolytica* também foi discutido por Guevara-Olvera e colaboradores (1993), quando descreveram que inibidores da síntese de poliaminas bloqueiam o desenvolvimento micelial do fungo. Os autores também sugeriram que a sinalização das poliaminas para a morfogênese celular inicia nos períodos iniciais de crescimento, uma vez que a adição de

inibidores após estes momentos não interferem mais na morfogênese das células. Além disso, o estudo relaciona a possível ação das poliaminas nos processos transcricionais da célula por prevenir a metilação da cromatina, pois 5-azacitidina (inibidor da metilação) também reverte o efeito dos inibidores das poliaminas (Guevara-Olvera *et al.*, 1993).

A relação de poliaminas, diferenças nos padrões de metilação do DNA e a morfogênese celular são reportadas em outros estudos também realizados em fungos (Cano *et al.*, 1988; Martinez *et al.*, 1990; Reyna-López e Ruiz-Herrera, 2004). Os trabalhos sugerem que a metilação do DNA está envolvido na regulação negativa de genes indutores da morfogênese, ou seja, o alto nível de metilação do DNA previne o crescimento polarizado das células. As poliaminas seriam capazes de inibir a citosina-DNA metilase e, assim, aumentar a acessibilidade de proteínas regulatórias transcricionais aos sítios iniciadores da transcrição na cromatina (Herrero *et al.*, 1999; Reyna-López e Ruiz-Herrera, 2004).

O emprego do CHA, inibidor específico da espermidina sintase e, conseqüentemente da síntese de espermina, confirmou a importância destas poliaminas na promoção do crescimento polarizado de hifas fúngicas (**Figura 15**). A concentração de 1 mM de CHA é suficiente para prevenir a transição de 70% das células após 36 horas de incubação, permitindo o restabelecimento do processo somente após a adição de 1 mM de qualquer uma das poliaminas, conforme **Figura 16**. Novamente, este ensaio foi importante para não deixar dúvidas de que as poliaminas são importantes na morfogênese de *Y. lipolytica*.

O estudo realizado por Guevara-Olvera e colaboradores (1993) também obteve resultados semelhantes quando utilizou inibidores específicos da ornitina descarboxilase em *Y. lipolytica*. A transição levedura-hifa atingiu inibições superiores a 80% quando as células foram expostas a 20 mM de DAB ou a 40 mM de DFMO ou 100 mM de MO, o processo foi revertido somente pela adição exógena de 0,75 mM de putrescina. A diferença nas concentrações dos inibidores para atingir valores próximos ocorre devido ao modo de ação de cada um, os inibidores DAB, DFMO e MO competem pelo sítio do substrato da enzima, enquanto CHA é mais específico a espermidina sintase (Walthers, 1995). Células mutantes de *C. albicans* sem ornitina descarboxilase (*odc/odc*), também só restabelecem a transição dimórfica após a adição de 10 mM de putrescina exógena (Herrero *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram o efeito dose-dependente das poliaminas no crescimento hifal, além de indicar o efeito tóxico em altas concentrações de poliaminas, uma vez que 2 mM de espermina, por exemplo, inibe a multiplicação e produz células aberrantes (**Figura 13**). Altas concentrações de poliaminas podem causar a despolarização de membrana, acúmulo de produtos oxidativos provenientes de poliaminas, peróxido de hidrogênio e radicais livres que causam eventualmente efeitos danosos aos micro-organismos (El Ghachtouli *et al.*, 1996). A espermina, por exemplo, pode atuar como bactericida dependendo da concentração e do pH extracelular (Tabor e Tabor, 1985).

Todavia, a co-relação mais bem estabelecida até o presente momento entre poliaminas e a morfogênese está nas alterações sinérgicas nos níveis de poliaminas, livres ou conjugadas, e o crescimento polarizado em fungos dimórficos (Guevara-Olvera *et al.*, 1993; El Ghachtouli *et al.*, 1996; Ueno *et al.*, 2004). No caso da *Y. lipolytica*, a filamentação é acompanhada pelo aumento na atividade da ornitina descarboxilase e na concentração endógena de poliaminas totais, livres e conjugadas (Guevara-Olvera *et al.*, 1993). A proposta do presente estudo é ir muito além da descrição dos efeitos das poliaminas no crescimento polarizado de hifas fúngicas, como tem sido encontrado na literatura até o momento. Entretanto, estes ensaios iniciais são necessários como alicerces para um ponto de partida.

6.2 Efeitos das poliaminas e ácido indol-3-acético na morfogênese de *Y. lipolytica*

A associação entre poliaminas e auxinas durante a morfogênese de hifas fúngicas foi realizada pela primeira vez. Todavia, a forma que se chegou a esta associação deve ser explicada antes de prosseguir com a discussão dos resultados propriamente. As primeiras caracterizações do hormônio auxina iniciaram paralelamente em células vegetais, fúngicas e leveduriformes durante as décadas de 1940 e 1950. Intrigantemente, os estudos mais aprofundados se concentraram nas células vegetais e as auxinas passaram a ser conhecidas como fitormônios. Apesar disso, também existem estudos clássicos de auxinas em leveduras (Robinson e Stier, 1941; Yanagishima e Shimoda, 1968). Mais de meio século depois, a auxina emerge como importante molécula sinalizadora em micro-organismos. Inicialmente, Prusty e colaboradores (2004) demonstraram que baixas

concentrações de auxinas (120 μM) induzem a formação de pseudohifas em *S. cerevisiae*, enquanto altas concentrações (250 μM) inibem o desenvolvimento da célula. Lobão (2012) demonstrou que concentrações ainda menores de ácido indol-3-acético, fMol (10^{-15}) e pMol (10^{-12}), são suficientes para induzir a morfogênese em *Y. lipolytica*.

Dutra (2010) e Lobão (2012) também identificaram a produção de compostos indólicos em *Y. lipolytica* em todas as fases/formas morfológicas do micro-organismo. A produção de auxina acompanha o perfil de transição das células, pois as maiores concentrações são obtidas após o início da morfogênese, apesar de reduzir os níveis posteriormente. Além disso, a adição exógena de triptofano (Trp), precursor da auxina, triplica a produção de compostos indólicos, quando comparado aos estágios iniciais de crescimento. Rao e colaboradores (2010) demonstraram que *S. cerevisiae* também produz ácido indol-3-acético por vias independentes de triptofano.

A partir deste conhecimento, o presente trabalho também propôs investigar a relação entre as poliaminas e as auxinas em células fúngicas, uma vez que tanto as poliaminas como os hormônios auxínicos promovem o crescimento polarizado. Inicialmente a pergunta abordada foi: auxinas e poliaminas juntas poderiam causar um efeito somatório na transição levedura-hifa em *Y. lipolytica*?

A questão se baseou não apenas no crescimento polarizado como consequência da ação de ambas as biomoléculas, mas também em outra característica compartilhada, a presença do óxido nítrico (NO) como possível intermediário. O NO é apontado como mensageiro na cascata de sinalização regulada pela auxina (Correa-Aragunde *et al.*, 2006; Zandonadi *et al.*, 2010; Zandonadi, 2010). Além disso, a adição exógena de poliaminas induz o aumento na produção de NO e o uso do inibidor da enzima óxido nítrico sintase previne os efeitos da espermina, indicando a presença de uma via de produção de NO dependente de poliaminas (Tun *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2006; Yamasaki e Cohen, 2006), além da modulação na atividade da nitrato redutase pelas poliaminas e óxido nítrico (Rosales *et al.*, 2011). Recentemente, também foi demonstrado que a adição de doadores de NO interferem nos níveis de poliaminas no desenvolvimento de células vegetais, por aumentar a concentração endógena de poliaminas e os níveis de expressão gênica de proteínas da síntese de poliaminas (Filippou *et al.*, 2012).

Apesar destas semelhanças, os resultados obtidos indicam não existir efeito somatório na transição levedura-hifa quando as células são incubadas na presença concomitante de auxinas e poliaminas. O efeito é o mesmo, seja em concentração mais elevadas, como 1 mM de poliaminas, ou em concentrações intermediárias ou inferiores de poliaminas, como 0,5 ou 0,1 mM, respectivamente. Os ensaios revelam não haver efeito aditivo na taxa de transição pelo uso de poliaminas mais auxinas, conforme observado nas **Figuras 17 e 18**. Um estudo clássico de Hager (1962) discutido recentemente (2003), também foi conduzido sob o mesmo olhar, todavia o efeito aditivo em questão era a presença concomitante de auxinas e ácidos indutores do crescimento. O estudo demonstrou que alguns tampões ácidos (citrato, acetato e fosfato) induziam a alongação de raízes de girassóis, assim como a presença de auxina. Contudo, testes realizados com doses concomitantes de tampões ácidos e auxinas também não promoviam o efeito aditivo no crescimento. Em uma revisão publicada anos depois (2003), o autor discute os resultados dizendo que apesar da auxina ser transportada mais rapidamente, enquanto os tampões ácidos difundem-se lentamente, a indução do crescimento ocorre simultaneamente e o efeito aditivo só seria observado se os compostos atuassem em diferentes áreas de um segmento na promoção do crescimento (Hager, 2003). Então, outra dúvida surgiu: existe dependência das auxinas pelas poliaminas ou vice-versa durante a transição dimórfica?

A resposta para essa questão, por si só, estabelece uma relação até então desconhecida. Relação entre poliaminas e auxinas tem sido pouco explorada em plantas e muito menos em micro-organismos. Os estudos existentes em células vegetais se referem apenas a algumas alterações sinérgicas nos níveis de poliaminas e auxinas durante o desenvolvimento radicular (Heloir *et al.*, 1996; Nag *et al.*, 2001; Tonon *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2009), na embriogênese somática (Kevers *et al.*, 2002) ou na germinação de sementes (Dias *et al.*, 2009). O mesmo tipo de estudo foi conduzido durante o crescimento de fungos micorrízicos na fase pré-simbótica (Sarjala *et al.*, 2010), mas nenhum destes trabalhos explorou as relações funcionais entre essas moléculas.

Para responder a esta pergunta, inibidores específicos da síntese das poliaminas espermina e espermidina (CHA) e da sinalização (PCIB) e/ou efluxo (TIBA) da auxina foram utilizados. Zandonadi e colaboradores (2007) determinaram

que os inibidores PCIB e TIBA previnem os efeitos de auxina no crescimento radicular em plântulas de milho. Dutra (2010) e Lobão (2012) também demonstraram que concentrações em torno de 100 μM destes mesmos inibidores evitam a morfogênese da *Y. lipolytica* (**Figura 20**).

Os resultados demonstram que a auxina (10 pMol) é capaz de reverter o efeito bloqueador na transição levedura-hifa causado por CHA (2 mM), ou seja, à princípio, o efeito do hormônio independe da presença de espermina e/ou espermidina durante a morfogênese (**Figura 19**). Por outro lado, a inibição da morfogênese causada pelo inibidor de sinalização PCIB (100 μM) ou do fluxo de auxinas TIBA (100 μM) não é revertida pela adição concomitante de poliaminas (**Figura 21**). Portanto, os dados indicam que o efeito na morfogênese celular causada pelas poliaminas é dependente da cascata de sinalização das auxinas. Dado a significância da molécula de óxido nítrico na sinalização auxínica (Zandonadi *et al.*, 2010), é possível especular que o NO seja o próximo elemento desta via, seria mais um elo na sequência de eventos da morfogênese celular em hifas fúngicas e que deve ser investigada.

6.3 Variações no pH ambiental e a atividade da P H⁺-ATPase

A ação das poliaminas via auxina-dependente remete a um mecanismo de ação utilizado pelos hormônios auxínicos no alongamento de células vegetais: a “Teoria do Crescimento Ácido”. Esta teoria postula que a auxina estimula as bombas H⁺-ATPásicas da membrana plasmática que acidificam o meio extracelular pela extrusão de prótons através da membrana plasmática e a mudança no potencial eletroquímico ativa enzimas de degradação e síntese de novas paredes e, assim, permite o alongamento celular (Rayle e Cleland, 1970).

O isolamento das membranas totais foi realizado a fim de verificar a ação das poliaminas na atividade das H⁺-ATPases de membrana plasmática. A análise do transporte de H⁺ foi conduzida pelo decaimento de ACMA (**Figura 24A-C**). De fato, as H⁺-ATPases de membrana plasmática são ativadas durante o crescimento polarizado de *Y. lipolytica* (**Figura 23**). Mais que isso, a concentração de 1 mM de espermina ativa praticamente duas vezes o transporte e a velocidade inicial das H⁺-ATPases tipo P quando comparadas às células controle incubadas por 20 horas (**Figura 24D**). Esta ativação é mais notável no início do crescimento polarizado de

hifas fúngicas, visto que em 14 horas de incubação ainda não é possível encontrar diferenças no transporte de H⁺. Após 26 horas, a relação entre o transporte de H⁺ dos ensaios decresce para 1,5 vezes, embora a atividade das bombas incubadas em espermina permaneça superior ao controle.

Esses dados demonstram que as bombas protônicas são ativadas durante o crescimento polarizado de hifas fúngicas (**Figura 23**), assim como ocorre durante o desenvolvimento de pelos radiculares e/ou tubos polínicos (Zandonadi *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2008a,b; Certal *et al.*, 2008). Outra observação é a repentina ativação das H⁺-ATPases exatamente no momento da transição dimórfica. Entre os resultados obtidos, 20 horas de incubação apresenta a maior diferença entre os tratamentos com e sem espermina, apesar de não ser possível dizer que seja exatamente este o ponto de maior diferença entre eles, pois os outros ensaios foram realizados em tempos mais distantes, 14 ou 26 horas. Contudo, é possível inferir que a espermina intensifica a estimulação na atividade das H⁺-ATPases tipo P no início da transição dimórfica, posteriormente essa diferença tende a diminuir.

A relação entre poliaminas e as H⁺-ATPases só foram descritas em células vegetais, sem considerar o crescimento polarizado das células. Garufi e colaboradores (2007) identificaram que concentrações fisiológicas de espermina, 0,2 mM, estimula aproximadamente duas vezes a atividade das P H⁺-ATPases e a interação direta da proteína 14-3-3 com a H⁺-ATPase, sugerindo um possível mecanismo de modulação da bomba pela poliamina independente do íon de Mg²⁺. Em contra partida, Dutra e colaboradores (2012) identificaram que as poliaminas modularam negativamente a atividade das bombas protônicas durante a embriogênese de *Araucaria angustifolia*.

A ativação das H⁺-ATPases pelas poliaminas durante o crescimento polarizado de hifas fúngicas, possivelmente utilizando a cascata de sinalização auxina dependente é relatado pela primeira vez. Estes dados quebram o paradigma de que a teoria do crescimento ácido é exclusiva de células vegetais. Aliás, os trabalhos de Dutra (2010) e Lobão (2012) também inferem esta possibilidade, uma vez que determinaram a estimulação de 40-50% na atividade das H⁺-ATPases tipo P pela auxina durante a alongação de células fúngicas tanto na membrana plasmática como nas membranas do retículo endoplasmático.

Além das bombas, o pH extracelular também foi investigado durante o crescimento polarizado de *Y. lipolytica*. Este micro-organismo alcaliniza naturalmente o pH extracelular pela excreção de moléculas alcalinas durante seu crescimento, além de possuir o efector Rim101, regulado pelo 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*. As **Figuras 25 e 26** demonstram que as poliaminas intensificam a alcalinização, principalmente na concentração de 1 mM de espermina. O ensaio demonstrou que o meio extracelular inicialmente ácido (pH 4,5-5,0) em até 48 horas, torna-se alcalino em 60 horas de cultivo, enquanto as células crescidas na ausência de poliaminas alcalinizam apenas regiões próximas às colônias. A alcalinização promovida pelas poliaminas é mais intensa inclusive quando comparada ao cultivo de auxina (10 pmol). Provavelmente tal característica corrobora na indução do processo morfogênico causado pelas poliaminas.

Os inibidores TIBA e PCIB, por sua vez, retardam a alcalinização extracelular, mesmo quando a espermina é adicionada concomitantemente (**Figura 27 e 28**). Após 72 horas de cultivo, apenas as regiões periféricas das colônias estão alcalinas, enquanto o meio permanece ácido, diferentemente das culturas que não receberam estes inibidores. A mesma característica é encontrada em meio líquido (**Figura 29**), uma vez que as poliaminas induzem a alcalinização, enquanto os inibidores retardam o processo. Palková e colaboradores (1997, 2002 e 2003) observaram que *S. cerevisiae* pode alcalinizar o meio extracelular durante a fase estacionária pela excreção de amônia. Além disso, este composto atua possivelmente como indutor “*quorum sensing*” que sinaliza a comunicação entre colônias (Palková *et al.*, 1997).

Apesar das H⁺-ATPases estarem ativas, a alcalinização extracelular ocorre normalmente na presença de poliaminas. As H⁺-ATPases possivelmente estejam transportando prótons para regiões do periplasma celular, energizando as proteínas membranares, enquanto os compostos alcalinos são secretados para o ambiente extracelular, diferindo ainda mais o gradiente protônico entre a célula e a matriz extracelular. A substância secretada pela *Y. lipolytica* provavelmente seja a amônia e os efeitos das poliaminas sugerem que estejam atuando como intensificadoras desta excreção. Os resultados obtidos no presente trabalho também indicam a

importância do pH como sinalizador no crescimento polarizado de hifas fúngicas, uma vez que condições cujo meio permanece ácido, não ocorre a morfogênese da levedura.

A alcalinização da matriz extracelular acompanhada pelo aumento na atividade de prótons pode estar relacionada a sobrevivência deste micro-organismo. A quantidade de compostos alcalinos excretados pela célula poderia ativar a extrusão de H^+ a fim de manter as diferenças eletroquímicas entre as membranas. Possivelmente, os H^+ transportados pela bomba se concentram no micro-ambiente, no periplasma, entre a membrana e a parede celular, enquanto a excreta alcalina é eliminada para a matriz extracelular. Provavelmente, em um ambiente natural, sob condições adversas, a resposta da matriz extracelular poderia ser diferente. Estes compostos poderiam se difundir pelo ambiente, enquanto em condições laboratoriais, são acumulados, possivelmente causando algum tipo de estresse que pode ser minimizado pela morfogênese celular (Palková e Váchová, 2006; Váchová *et al.*, 2012). Ambos os fatores, alcalinização extracelular e a homeostase de H^+ , possivelmente devem trabalhar unidos na promoção do crescimento polarizado de hifas fúngicas de *Y. lipolytica*, uma vez que ocorre a variação de ambos os fatores durante a morfogênese celular (**Figura 23**).

6.4 A dinâmica vacuolar e a morfologia colonial

Os vacúolos estão diretamente envolvidos na regulação do gradiente eletroquímico de prótons entre as membranas. Por esse motivo, a dinâmica vacuolar foi observada durante a morfogênese da levedura pelo uso de marcadores fluorescentes do lúmen e da membrana vacuolar (**Figura 30**). Os vacúolos correspondem às maiores organelas celulares e estão envolvidos desde a degradação de componentes celulares a estocagem de íons e metabólitos, além da regulação na homeostase celular (Richards *et al.*, 2012).

Os vacúolos são organelas dinâmicas e, por isso, sofrem expansões e remodelagens durante a morfogênese. Okorokova-Façanha e colaboradores (2002) demonstraram que os vacúolos são organelas importantes nas leveduras de fissão por definir o formato celular, a dinâmica do citoesqueleto e citocinese. Os autores determinaram que a homeostase de cátions, principalmente de Ca^{2+} pelas ATPases

localizadas nas membranas destas organelas, são cruciais no estabelecimento da polaridade celular e na regulação da dinâmica de microtúbulos.

Pelo uso dos marcadores fluorescentes é possível identificar que as formas celulares do micro-organismos são influenciadas por distintos padrões de vacuolização. As células leveduriformes apresentam um vacúolo contínuo, que ocupa grande espaço no compartimento celular, enquanto as células pseudohifais ou hifas verdadeiras possuem vacúolos de tamanhos diferentes que auxiliam no crescimento celular. Veses e Gow (2008) também demonstraram a importância dos vacúolos na formação dos septos celulares durante a formação das hifas em *C. albicans*.

Como pode ser observado na **Figura 31**, é possível identificar apenas um vacúolo, geralmente grande, nas células leveduriformes de *Y. lipolytica*, que cresce à medida que ocorre a diferenciação. Durante a expansão apical, é possível visualizar o aumento no volume vacuolar e a consequente formação de vacúolos longos e elipsóides que se dividem, formando vários vacúolos de diferentes tamanhos. Outra observação importante é a presença de pequenos vacúolos nas pontas das hifas (**Figura 31**). Esta região corresponde ao local de intensa atividade durante a morfogênese, com a presença de vesículas apicais, como o Spitzenkörper ou o polarissoma, relacionadas à manutenção do crescimento polarizado pelo transporte e síntese de novas proteínas (Riquelme *et al.*, 2011).

O citoesqueleto é responsável por guiar desde a segregação vacuolar até o tráfego de pequenas vesículas para regiões apicais (Veses e Gow, 2008; Riquelme *et al.*, 2011). Contudo, oscilações do pH celular provavelmente rege toda essa sinfonia durante o crescimento polarizado, utilizando para isso, a homeostase iônica e a ativação das bombas protônicas. As consequências destas variações são observadas macroscopicamente no fenótipo das colônias. A mesma levedura pode possuir diferentes formatos dependendo do ambiente que esteja colonizando (**Figura 32**). Todos estes fatores auxiliam o desenvolvimento de hifas fúngicas e complementam a teoria do crescimento ácido, demonstrando que esta teoria é muito mais complexa do que se imagina.

A arquitetura e o aspecto das colônias são influenciados por fatores externos, conforme observado na **Figura 32**. As colônias crescidas em auxina ou espermidina possuem o formato de cérebro, enquanto as colônias crescidas em espermina

assumem a forma de cratera. Além disso, as colônias crescidas na presença de poliaminas ou auxinas são mais rugosas e possuem longas franjas celulares, provavelmente mais eficazes na invasão e adesão ao meio sólido. Estas alterações fenotípicas são naturais e relacionadas à variabilidade de uma população apta a colonizar diferentes condições ambientais (Furlaneto *et al.*, 2012). As rugosidades são devido a maior quantidade de células filamentosas, por esse motivo a ativação do efector Rim101 também é observada durante alterações morfológicas da colônia, assim como no crescimento polarizado (Voordeckers *et al.*, 2012).

As alterações do pH parecem desempenhar um papel fundamental na caracterização fenotípica das colônias de vários micro-organismos, porém os processos de sinalização iônica envolvidos permanecem pouco explorados. Este tipo de sinalização poderia envolver mudanças nos gradientes eletroquímicos das membranas, influenciando na homeostase de pH nos ambientes intra e extracelular. As alterações nos gradientes de H⁺ e a consequente sinalização por prótons seria gerada pelas bombas protônicas que conduziriam a produção de informações para mudanças na dinâmica do citoesqueleto e do vacúolo, a fim de promover o crescimento polarizado de hifas fúngicas (Ramos *et al.*, 2009a,b).

A partir dos resultados descritos, fica evidente o papel das poliaminas na modulação do crescimento polarizado em *Y. lipolytica*. Até o momento estas parecem ser as primeiras evidências de ativação das bombas de H⁺ e a morfogênese celular em fungos induzidos pelas poliaminas. A partir dos dados apresentados ainda é possível sugerir uma sequência de eventos desencadeados pela sinalização das poliaminas via auxina-dependente, ativação das H⁺-ATPases, alterações no pH extracelular, mudança na dinâmica de citoesqueleto e vacúolos até chegar a morfologia da colônia, propriamente dita. Este conjunto de informações auxilia a completar uma cascata de sinalização relacionada à morfogênese celular, partindo das poliaminas.

O conhecimento de princípios básicos que regem o desenvolvimento e a formação das colônias torna-se ferramenta importante em diversos segmentos. Na área médica, o controle da morfogênese é importante por prevenir patologias e proteger superfícies específicas contra o ataque de biofilmes microbianos, como cateteres e implantes (Palková e Váchová, 2006). Na biotecnologia, o desenvolvimento de fungos morfogênicos é importante na produção de ácidos

orgânicos e outros compostos de alto valor agregado. Na agricultura, a morfogênese fúngica é importante no desenvolvimento de bioinóculos capazes de colonizar o sistema radicular, aumentar a superfície de absorção e exsudar quelantes orgânicos que indisponibilizam metais tóxicos, como o alumínio (Bankar *et al.*, 2009).

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem estabelecer uma relação entre o efeito de poliaminas sobre a morfogênese em células fúngicas, com a ativação diferencial das bombas de H^+ da membrana plasmática. A partir dos dados apresentados, é possível sugerir uma sequência de eventos que culminam na transição dimórfica levedura-hifa de *Y. lipolytica*. No modelo proposto, as poliaminas utilizam a sinalização auxina-dependente para sincronizar a ativação das bombas de H^+ e, assim, alterar o gradiente eletroquímico nas membranas. Esta alteração, por sua vez, induziria oscilações de pH específicas relacionadas com o controle do crescimento polarizado, possivelmente via ativação de efetores relacionados à morfogênese e mudanças na dinâmica vacuolar e do citoesqueleto. Este processo desencadeado em nível celular pode influenciar mudanças morfológicas globais na arquitetura das colônias. As evidências experimentais que sustentam tal modelo são as seguintes:

1 - Nas condições normais de crescimento (meio YED; pH 4,5; 30° C e 250 rpm) as poliaminas espermidina e espermina induzem a transição dimórfica de *Y. lipolytica* em concentrações próximas a 1 mM, reduzindo o número de células leveduriformes para 40 e 30%, respectivamente. O cultivo controle permanece com 60% de suas células na forma de leveduras após 36 horas de incubação;

2 - A adição exógena de 2 mM do inibidor da espermidina sintase, o ciclohexilamino (CHA), previne a morfogênese celular do fungo em até 80% das células, apesar de não influenciar no crescimento celular;

3 - O efeito somatório na transição dimórfica não é observado em ensaios conduzidos em concentrações concomitantes de poliaminas e auxina;

4 - A morfogênese celular causada pela sinalização da auxina não depende da presença de poliaminas, uma vez que a CHA não preveniu o crescimento polarizado de hifas crescidas em auxinas;

5 - A morfogênese causada pelas poliaminas é auxina-dependente, pois a adição de inibidores da sinalização e transporte de AIA, evitou a formação de hifas verdadeiras em células crescidas em poliaminas;

6 - Durante o desenvolvimento colonial das hifas fúngicas, ocorre naturalmente a alcalinização do meio extracelular. A presença de auxina ou poliaminas influenciam no aumento do pH extracelular, enquanto e os inibidores

TIBA e PCIB previnem o processo de alcalinização, assim como a transição dimórfica;

7 - As H⁺-ATPases tipo P são ativadas durante o crescimento polarizado de hifas fúngicas. A presença de espermina induz ainda mais a atividade da bomba, chegando a 2,5 vezes no início da transição dimórfica levedura-hifa (20 horas).

8 - O vacúolo celular, principal organela envolvida na manutenção e ajuste do pH celular, sofre alterações em sua dinâmica durante o crescimento polarizado. A utilização de marcadores fluorescentes indicou a vacuolização durante a morfogênese celular, assim como a presença de várias vesículas pequenas próximas a ponta das hifas, exatamente o local de intensa atividade de degradação e síntese no crescimento polarizado da célula;

9 - A arquitetura macroscópica da colônia é influenciada pela presença de poliaminas. As colônias apresentavam-se mais rugosas e com longas franjas ao seu redor, estruturas relativas a adaptação a estresses ambientais em geral.

8. REFERÊNCIAS

- Almeida, B.; Buttner, S.; Ohlmeier, S.; Silva, A.; Mesqueta, 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. *J Cell Sci*, 15 (120):279–288.
- Augstein, A.; Barth, K.; Gentsch, M.; Kohlwein, S.D.; Barth, G. (2003) Characterization, localization and functional analysis of Gpr1p, a protein affecting sensitivity to acetic acid in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology*, 149:589-600.
- Bais, H.P.; Ravishankar, G.A. (2002) Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 69:1-34.
- Bankar, A.V.; Kumar, A.R.; Zinjarde, S.S. (2009) Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84(5):847-865.
- Banuett, F.; Quintanilla, R.H.; Reynaga-Peña, C.G. (2008) The machinery for cell polarity, cell morphogenesis, and the cytoskeleton in the Basidiomycete fungus *Ustilago maydis* - a survey of the genome sequence. *Fungal Genet Biol*, Suplemento1:1-14.
- Barth, G.; Gaillardin, C. (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev*, 19(4):219-237.
- Beopoulos, A.; Chardot, T.; Nicaud, J.M. (2009) *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, 91(6):692-696.
- Berman, J.; Sudbery, P.E. (2002) *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Rev Genet*, 3(12):918-930.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Brand, A.; Gow, N.A. (2009) Mechanisms of hypha orientation of fungi. *Curr Opi Microbiol*, 12(4):350-357.
- Brand, A.; Shanks, S.; Duncan, V.M.; Yang, M.; Mackenzie, K.; Gow, N.A. (2007) Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism. *Curr Biol*, 17(4):347-352.
- Bowman, B.J.; Bowman, E.J. (2002) Mutations in subunit C of the vacuolar ATPase confer resistance to bafilomycin and identify a conserved antibiotic site. *J Biol Chem*, 277(6):3965-3972.
- Bowman, E.J.; Bowman, B.J. (1988) Purification of vacuolar membranes, mitochondria, and plasma membranes from *Neurospora crassa* and modes of discriminating among the different H⁺-ATPases. *Methods Enzymol*, 157:562-573.

- Bowman, E.J.; Kendle, R.; Bowman, B.J. (2000) Disruption of *vma-1*, the gene encoding the catalytic subunit of the vacuolar H(+)-ATPase, causes severe morphological changes in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem*, 275(1):167-176.
- Brown, A.J.; Gow, N.A. (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol*, 7(8):333-338.
- Cano, C.; Herrera-Estrella, L.; Ruiz-Herrera, J. (1988) DNA methylation and polyamines in regulation of development of the fungus *Mucor rouxii*. *J Bacteriol*, 170(12):5946-5948.
- Cáp, M.; Váchová, L.; Palková, Z. (2012) Reactive oxygen species in the signaling and adaptation of multicellular microbial communities. *Oxid Med Cell Longev*, v.2012, 13p., ID976753, doi:10.1155/2012/976753.
- Carone, S.B.; Santa-Catarina, C.; Silveira, V.; Floeh, E.I.S. (2010) Polyamine patterns in haploid and diploid tobacco tissues and in vitro cultures. *Braz Arch Biol Technol*, 53:409-417.
- Certal, A.C.; Almeida, R.B.; Carvalho, L.M.; Wong, E.; Moreno, N.; Michard, E.; Carneiro, J.; Rodríguez-Léon, J.; Wu, H.M.; Cheung, A.Y.; Feijó, J.A. (2008) Exclusion of a proton ATPase from the apical membrane is associated with cell polarity and tip growth in *Nicotiana tabacum* pollen tubes. *Plant Cell*, 20(3):614-634.
- Cervantes-Chávez, J.A.; Ruiz-Herrera, J. (2006) STE11 disruption reveals the central role of a MAPK pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*, 6:801-815.
- Cervantes-Chávez, J.A.; Ruiz-Herrera, J. (2007) The regulatory subunit of protein kinase A promotes hyphal growth and plays an essential role in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*, 7:929-940.
- Chant, J. (1999) Cell polarity in yeast. *Annu Rev Cell Devl Biol*, 15:365-391.
- Chattopadhyay, M.K.; Tabor, C.W.; Tabor, H. (2002) Absolute requirement of spermidine for growth and cell cycle progression of fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*). *PNAS*, 99(16):10330-10334.
- Chattopadhyay, M.K.; Tabor, C.W.; Tabor, H. (2006) Polyamine deficiency leads to accumulation of reactive oxygen species in a *spe2Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(10):751-761.
- Chernyavskaya, O.G.; Shishkanova, N.V.; Il'chenko, A.P.; Finogenova, T.V. (2000) Synthesis of alpha-ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53(2):152-158.

- Choi, S.Y.; Park, H.Y.; Paek, A.; Kim, G.S.; Jeong, S.E. (2009) Insect ornithine decarboxylase (ODC) complements SPE1 knock-out of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cells*, 28(6):575-581.
- Christen, S.; Sauer, U. (2010) Intracellular characterization of aerobic glucose metabolism in seven yeast species by ¹³C flux analysis and metabolomics. *FEMS Yeast Res*, 11(3):263-272.
- Cirigliano, M.C.; Carman, G.M. (1984) Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl Environ Microbiol*, 48(4):747-750.
- Correa-Aragunda, N.; Graziano, M.; Chevalier, C.; Lamattina, L. (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J Exp Bot*, 57(3):581-588.
- Cosgrove, D.J. (1997) Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 13:171-201.
- De La Hera, D.P.; Corradi, G.R.; Adamo, H.P.; De Tezanos Pinto, F. (2013) Parkinson's disease-associated human P5B-ATPase ATP13A2 increases spermidine uptake. *Biochem J*, 450(1):47-53.
- Dias, L.L.C.; Santa-Catarina, C.; Silveira, V.; Pieruzzi, F.P.; Floh, E.I.S. (2009) Polyamines, amino acids, AIA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. *Seed Sci & Technol*, 37:42-51.
- Downward, J. (1997) Cell cycle: routine role for Ras. *Curr Biol*, 7(4):258-260.
- Duby, G.; Boutry, M. (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pfügers Arch*, 457(3):645-655.
- Dujon, B.; Sherman, D.; Fischer, G.; Durrens, P.; Casaregola, S.; Lafontaine, I.; De Montigny, J.; Marck, C.; Neuvéglise, C.; Talla, E.; Goffard, N.; Frangeul, L.; Aigle, M.; Anthouard, V.; Babour, A.; Barbe, V.; Barnay, S.; Blanchin, S.; Beckerich, J.M.; Beyne, E.; Bleykasten, C.; Boisramé, A.; Boyer, J.; Cattolico, L.; Confanioleri, F.; De Daruvar, A.; Despons, L.; Fabre, E.; Fairhead, C.; Ferry-Dumazet, H.; Groppi, A.; Hantraye, F.; Hennequin, C.; Jauniaux, N.; Joyet, P.; Kachouri, R.; Kerrest, A.; Koszul, R.; Lemaire, M.; Lesur, I.; Ma, L.; Muller, H.; Nicaud, J.M.; Nikolski, M.; Oztas, S.; Ozier-Kalogeropoulos, O.; Pellenz, S.; Potier, S.; Richard, G.F.; Straub, M.L.; Suleau, A.; Swennen, D.; Tekaiia, F.; Wésolowski-Louvel, M.; Westhof, E.; Wirth, B.; Zeniou-Meyer, M.; Zivanovic, I.; Bolotin-Fukuhara, M.; Thierry, A.; Bouchier, C.; Caudron, B.; Scarpelli, C.; Gaillardin, C.; Weissenbach, J.; Wincker, P.; Souciet, J.L. (2004) Genome evolution in yeast. *Nature*, 430(6995):35-44.

- Dutra, K.R. (2010) *Transição dimórfica em Yarrowia lipolytica: ação da auxina e via sistemas de transporte primário de prótons: ação da auxina e óxido nítrico*. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro" - UENF, 58p.
- Dutra, N.T.; Silveira, V.; De Azevedo, I.G.; Gomes-Neto, L.B.; Façanha, A.R.; Steiner, N.; Guerra, M.P.; Floh, E.I.; Santa-Catarina, C. (2012) Polyamines affect the cellular growth and structure of pro-embryogenic masses in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures through the modulation of proton pump activities and endogenous levels of polyamines. *Physiol Plant*, doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01695.
- Eisenberg, T.; Knauer, H.; Schauer, A.; Büttner, S.; Ruckenstuhl, C.; Carmona-Gutierrez, D.; Ring, J.; Schroeder, S.; Magnes, C.; Antonacci, L.; Fussi, H.; Deszcz, L.; Hartl, R.; Schraml, E.; Criollo, A.; Megalou, E.; Weiskopf, D.; Laun, P.; Heeren, G.; Breitenbach, M.; Grubeck-Loebenstern, B.; Herker, E.; Fahrenkrog, B.; Fröhlich, K.U.; Sinner, F.; Tavernarakis, N.; Minois, N.; Kroemer, G.; Madeo, F. (2009) Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biol*, 11(11):1305-1314.
- El Ghachtouli, N.; Martin-Tanguy, J.; Paynot, M.; Gianinazzi, S. (1996) First report of the inhibition of arbuscular mycorrhizal infection of *Pisum sativum* by specific and irreversible inhibition of polyamine biosynthesis or by gibberellic acid treatment. *FEBS Lett*, 385(3):189-192.
- Fickers, P.; Benetti, P.H.; Waché, Y.; Marty, A.; Mauersberger, S.; Smit, M.S.; Nicaud, J.M. (2005) Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*, 5(6-7):527-542.
- Fickers, P.; Marty, A.; Nicaud, J.M. (2011) The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnol Adv*, 29(6):632-644.
- Filippou, P.; Antoniou, C.; Fotopoulos, V. (2012) The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Free Radic Biol Med*, 56:172-183.
- Furlaneto, M.C.; Andrade, C.G.T.J.; Aragão, P.H.A.; França, E.J.G.; Moralez, A.T.P.; Ferreira, L.C.S. (2012) Scanning electron microscopy as a tool for the analysis of colony architecture produced by phenotypic switching of a human pathogenic yeast *Candida tropicalis*. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 371:012022.
- Galston, A.W.; Kaur-Sawhney, R.; Atabella, T.; Tiburcio, A.F. (1997) Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot Acta*, 110:197-207.

- Garcia-Sanchez, S.; Mavor, A.L.; Russell, C.L.; Argimon, S.; Dennison, P.; Enjalbert, B.; Brown, A.J. (2005) Global roles of Ssn6 in Tup-1 and Nrg-1 dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 16:2913-2925.
- Garufi, A.; Visconti, S.; Camoni, L.; Aducci, P. (2007) Polyamines as physiological regulators of 14-3-3 interaction with the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell Physiol*, 48(3):434-440.
- Gaxiola, R.A.; Palmgren, M.G.; Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS Lett*, 581:2204-2214.
- Graham, T.R. (2004) Flippases and vesicle-mediated protein transport. *Trends Cell Biol*, 14:670-677.
- Guevara-Olvera, L.; Calvo-Mendez, C.; Ruiz-Herrera, J. (1993) The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *J Gen Microbiol*, 193(3):485-493.
- Guo, J.; Dai, X.; Xu, J.R.; Wang, Y.; Bai, P.; Liu, F.; Duan, Y.; Zhang, H.; Huang, L.; Kang, Z. (2011) Molecular characterization of a Fus3/Kss1 type MAPK from *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*, PsMAPK1. *Plos One*, 7:e21895, doi:10.1371.
- Hager, A.; Menzel, H.; Krauss, A. (1971) Versuche und hypothese zur primärwirkung des auxins beim streckungswachstum (Experiments and hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth). *Planta*, 100:47-75.
- Hager, A. (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J Plant Res*, 116:483-505.
- Han, T.L.; Cannon, R.D.; Villas-Bôas, S.G. (2011) The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol*, 48(8):747-763.
- Harris, S.D. (2011) Hyphal morphogenesis: an evolutionary perspective. *Fungal Biol*, 115(6):475-484.
- Harris, S.D.; Momany, M. (2004) Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet Biol*, 41(4):391-400.
- Heloir, M.C.; Kevers, C.; Hausman, J.F.; Gaspar, T. (1996) Changes in the concentrations of auxins and polyamines during rooting of - *in vitro* - propagated walnut shoots. *Tree Physiol*, 16(5):515-519.
- Heinick, A.; Urban, K.; Roth, S.; Spies, D.; Nunes, F.; Phanstiel, O.; Liebau, E.; Lüersen, K. (2010) *Caenorhabditis elegans* P5B-type ATPase CATP-5 operates in polyamine transport and is crucial for norspermidine-mediated suppression of RNA interference. *The FASEB Journal*, 24(1):206-217.

- Hepler, P.K.; Vidali, L.; Cheung, A.Y. (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:159-187.
- Herrero, A.B.; López, M.C.; García, S.; Schmidt, A.; Spaltmann, F.; Ruiz-Herrera, J.; Dominguez, A. (1999) Control of filament formation in *Candida albicans* by polyamine levels. *Infect Immun*, 67(9):4870-4878.
- Hervás-Aguilar, A.; Peñalva, M.A. (2010) Endocytic machinery protein SlaB is dispensable for polarity establishment but necessary for polarity maintenance in hyphal tip cells of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, 9(10):1504-1518.
- Igarashi, K.; Kashiwagi, K. (1999) Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem J*, 344:633-642.
- Igarashi, K.; Kashiwagi, K. (2010) Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(1):39-51.
- Illingworth, C.; Mayer, M.J.; Elliott, K.; Hanfrey, C.; Walton, N.J.; Michael, A.J. (2003) The diverse bacterial origins of the *Arabidopsis* polyamine biosynthetic pathway. *FEMS Lett*, 549:26-30.
- Jiménez-Bremont, J.F.; Ruiz-Herrera, J.; Dominguez, A. (2001) Disruption of gene YIODC reveals absolute requirement of polyamines for mycelial development in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*, 1(3):195-204.
- Kashiwagi, K.; Igarashi, K. (2011) Identification and assays of polyamine transport systems in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol*, 720:295-308.
- Kaur-Sawhney, R.; Tiburcio, A.F.; Altabella, T.; Galston, A.W. (2003) Polyamines in plants: An overview. *J Cell Mol Biol*, 2:1-12.
- Kawasse, F.M.; Amaral, P.F.; Rocha-Leão, M.H.M. (2003) Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioproc Biosyst Eng*, 25(6):371-375.
- Kevers, C.; Gaspar, T.; Dommès, J. (2002) The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng* *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 70:181-188.
- Kig, C.; Temizkan, G. (2009) Nitric oxide as a signaling molecule in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Protoplasma*, 238(1-4):59-66.
- Kim, J.; Cheon, S.A.; Park, S.; Song, Y.; KIM, J.Y. (2000) Serum-induced hypha formation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett*, 190(1):9-12.

- Kuznetsov, V.V.; Shevyakova, N.I. (2007) Polyamines and stress tolerance of plants. *Plant Stress*, 1(1):50-71.
- Leberer, E.; Marcus, D.; Broadbent, I.D.; Clark, K.L.; Dignard, D.; Ziegelbauer, K.; Schmidt, A.; Gow, N.A.; Brown, A.J.; 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*. *PNAS*, 93(23):13217-13222.
- Lengeler, B.K.; Davidson, R.C.; D'souza, C.; Harashima, T.; Shen, W.C.; Wang, P.; Pan, X.; Wangh, M.; Heitman, J. (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(4):746-785.
- Liu, H. (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 4:728-735.
- Liu, H.; Styles, C.A.; Fink, G.R. (1993) Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science*, 262:1741-1743.
- Lo, H.J.; Köhler, J.R.; Didomenico, B.; Loebenberg, D.; Cacciapuoti, A.; Fink, G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90(5):939-949.
- Lobão, F.A. (2012) *Modulação da transição dimórfica de Yarrowia lipolytica via sistemas de transporte primário de prótons: regulação por auxina e alumínio*. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro" - UENF, 124p.
- Lopez, M.C.; Nicaud, J.M.; Skinner, H.B.; Vergnolle, C.; Kader, J.C.; Bankaitis, V.A.; Gaillardin, C. (1994) A phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* from the yeast to the mycelial form. *J Cell Biol*, 125(1):113-127.
- Lustoza, A.C.; Palma, L.M.; Façanha, A.R.; Okorokov, L.A.; Okorokova-Façanha. (2011) P(5A)-type ATPase Cta4p is essential for Ca²⁺ transport in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe*. *Plos One*, 6(11):e27843, doi:10.1371/journal.pone.0027843.
- Madhani, H.D.; Fink, G.R. (1998) The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol*, 8(9):348-353.
- Madhani, H.D.; Styles, C.A.; Fink, G.R. (1997) MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell*, 91:673-684.

- Mansour, S.; Bailly, J.; Delettre, J.; Bonnarme, P. (2009) A proteomic and transcriptomic view of amino acids catabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Proteomics*, 9(20):4714-4725.
- Martinez, J.P.; Lopez-Ribot, J.L.; Gil, M.L.; Sentandreu, R.; Ruiz-Herrera, J. (1990) Inhibition of the dimorphic transition of *Candida albicans* by the ornithine decarboxylase inhibitor 1,4-diaminobutanone: alterations in the glycoprotein composition of the cell wall. *J Gen Microbiol*, 136:1937-1943.
- Mayer, F.L.; Wilson, D.; Hube, B. (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2):119-128.
- Mauersberger, S.; Wang, H.J.; Gaillardin, C.; Barth, G.; Nicaud, J.M. (2001) Insertional mutagenesis in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*: generation of tagged mutations in genes involved in hydrophobic substrate utilization. *J Bacteriol*, 183(17):5102-5109.
- Morales-Vargas, A.T.; Domínguez, A.; Ruiz-Herrera, J. (2012) Identification of dimorphism-involved genes of *Yarrowia lipolytica* by means of microarray analysis. *Res Microbiol*, 163(5):378-387.
- Nag, S.; Saha, K.; Choudhuri, M.A. (2001) Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. *J Plant Growth Regulation*, 20(2):182-194.
- Nelson, N. (1992) The vacuolar H⁺-ATPase - one of the most fundamental ion pumps in nature. *J Exp Biol*, 172:19-27.
- Nicaud, J.M. (2012) *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29:409-418.
- Ocampo, J.; Nuñez, L.F.; Silva, F.; Pereyra, E.; Moreno, S.; Garre, V.; Rossi, S. (2009) A subunit of protein kinase A regulates growth and differentiation in the fungus *Mucor circinelloides*. *Eukaryot Cell*, 8(7):933-944.
- Okorokov, L. A.; Lichko, L. P. (1983) The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carsbergensis*: ATPase is electrogenic H⁺-translocase. *FEBS Lett*, 155:102-106.
- Okorokov, L. A.; Lehle, L. (1998) Ca²⁺-ATPases of *S. cerevisiae*: diversity and possible role in protein sorting. *FEMS Microbiol Lett*, 162:83-91.
- Okorokova-Façanha, A.L.; Appelgren, H.; Tabish, M.; Okorokov, L.; Ekwall, K. (2002) The endoplasmic reticulum cation P-type ATPase Cta4p is required for control of cell shape and microtubule dynamics. *J Cell Biol*, 157(6):1029-1039.

- Orlowski, M. (1991) *Mucor* dimorphism. *Microbiol Rev*, 2(55):234-258.
- Palková, Z.; Devaux, F.; Icíková, M.; Mináriková, L.; Le Crom S.; Jacq, C. (2002) Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol Biol Cell*, 13(11):3901-3914.
- Palková, Z.; Forstová, J. (2000) Yeast colonies synchronise their growth and development. *J Cell Sci*, 113:1923-1928.
- Palková, Z.; Janderová, B.; Gabriel, J.; Zikánová, B.; Pospíšek, M.; Forstová, J. (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature*, 390(6659):532-536.
- Palková, Z.; Vachová, L. (2003) Ammonia signaling in yeast colony formation. *Int Rev Cytol*, 225:229-272.
- Palková, Z.; Váchová, L. (2006) Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol Rev*, 30(5):806-824.
- Pedersen, P. L.; Carafoli, E. (1987) Ion motive ATPases. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends Biochem Sci*, 12:146-150.
- Polticelli, F.; Salvi, D.; Mariottini, P.; Amendola, R.; Cervelli, M. (2012) Molecular evolution of the polyamine oxidase gene family in Metazoa. *BMC Evol Biol*, 20:90.
- Poltermann, S.; Nguyen, M.; Gunther, J.; Wendland, J.; Härtl, A.; Künkel, W.; Zipfel, P.F.; Eck, R. (2005) The putative vacuolar ATPase subunit vma7p of *Candida albicans* is involved in vacuole acidification, hyphal development and virulence. *Microbiology*, 5:1645-1655.
- Prusty, R.; Grisafi, P.; Fink, G.R. (2004) The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci*, 101(12):4153-4157.
- Pruyne, D.; Bretscher, A. (2000a) Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci*, 113:365-375.
- Pruyne, D.; Bretscher, A. (2000b) Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci*, 113:571-585.
- Ramos, A.C.; Façanha, A.R.; Feijó, J.A. (2008a) Proton (H⁺) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*, 178(1):177-188.
- Ramos, A.C.; Façanha, A.R.; Lima, P.T.; Feijó, J.A. (2008b) pH signature for the responses of arbuscular mycorrhizal fungi to external stimuli. *Plant Signaling and Behavior*, 3(10):850-852.

- Ramos, A.C.; Martins, M.A.; Okorokova-Façanha, A.L.; Olivares, F.L.; Okorokov, L.A.; Sepúlveda, N.; Feijó, J.A.; Façanha, A.R. (2009a) Arbuscular mycorrhizal fungi induce differential activation of the plasma membrane and vacuolar H⁺ pumps in maize roots. *Mycorrhiza*, 19:69-80.
- Ramos, A.C.; Lima, P.T.; Dias, P.N.; Kasuya, M.C.M.; Feijó, J.A. (2009b) A pH signaling mechanism involved in the spatial distribution of calcium and anion fluxes in ectomycorrhizal roots. *New Phytol.* 181:448-462.
- Rao, R.P.; Hunter, A.; Kashpur, O.; Normanly, J. (2010) Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. *Genetics*, 185:211-220.
- Rayle, D.L.; Cleland, R.E. (1970) Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiol*, 46:250-253.
- Rayle, D.L.; Cleland, R. (1972) The *in-vitro* acid growth response: relation to *in-vitro* growth responses and auxin action. *Planta*, 104:282-296.
- Rayle, D.L.; Cleland, R.E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol*, 99:271-274.
- Reyna-López, G.E.; Ruiz-Herrera. (2004) Specificity of DNA methylation changes during fungal dimorphism and its relationship to polyamines. *Curr Microbiol*, 48(2):118-123.
- Richards, A.; Gow, N.A.; Veses, V. (2012) Identification of vacuole defects in fungi. *J Microbiol Methods*, 91(1):155-163.
- Riquelme, M.; Yarden, O.; Bartnicki-Garcia, S.; Bowman, B.; Castro-Loongoria, E.; Free, S.J.; Fleißner, A.; Freitag, M.; Lew, R.R.; Mourino-Pérez, R.; Plamann, M.; Rasmussen, C.; Richthammer, C.; Roberson, W.; Sanchez-Leon, E.; Seiler, S.; Watters, M.K. (2011) Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha – a model cell for polarized growth. *Fungal Biol*, 115:446-474.
- Robinson, T.; Stier, T.J.B. (1941) Formation of auxin in yeast cultures. *J Gen Physiol*, 6:765-769.
- Rodríguez-Kessler, M.; Baeza-Montañez, 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(5):270-282.
- Rosales, E.P.; Iannona, M.F.; Groppa, M.D.; Benavides, M.P. (2012) Polyamines modulate nitrate reductase activity in wheat leaves: involvement of nitric oxide. *Amino Acids*, 42(2-3):857-865.

- Ruiz-Herrera, J.; Ruiz-Medrano, R.; Domínguez, A. (1995) Selective inhibition of cytosine-DNA methylase by polyamines. *FEBS Lett*, 357(2):192-196.
- Ruiz-Herrera, J.; Sentandreu, R. (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiol*, 178(6):477-483.
- 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 (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro" - UENF, 109p.
- Samarão, S.S.; Teodoro, C.E.; Silva, F.E.; Ribeiro, C.C.; Granato, T.M.; Bernades, N.R.; Retamal, C.A.; Façanha, 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. *Biochim Biophys Acta*, 1788:303-313.
- San-Blas, G.; San-Blas, F.; Sorais, F.; Moreno, B.; Ruiz-Herrera, J. (1997) Polyamines in growth and dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Microbiol*, 166:411-413.
- Sannazzaro, A.I.; Álvarez, C.L.; Menéndez, A.B.; Pieckenstain, F.L.; Albertó, E.O.; Ruiz, O.A. (2004) Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. *FEMS Microbiol Lett*, 230:115-121.
- Sarjala, T.; Niemi, K.; Häggman, H. (2010) Mycorrhiza formation is not needed for early growth induction and growth-related changes in polyamines in Scots pine seedlings *in vitro*. *Plant Physiol Biochem*, 48(7):596-601.
- Saroussi, S.; Nelson, N. (2009) The little we know on the structure and machinery of A-ATPase. *J Exp Biol*, 212:1604-1610.
- Sarubbo, L.A.; Farias, C.B.; Campos-Takaki, G.M. (2007) Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr Microbiol*, 54(1):68-73.
- Shan, W.; Liu, J.; Hardham, A.R. (2006) *Phytophthora nicotianae* PnPMA1 encodes an atypical plasma membrane H⁺-ATPase that is functional in yeast and developmentally regulated. *Fungal Genet Biol*, 43:583-592.
- Shaw, B.D.; Chung, D.W.; Wang, C.L.; Quintanilla, L.A.; Upadhyay, S. (2011) A role for endocytic recycling in hyphal growth. *Fungal Biol*, 115:541-546.
- Shrivastava, S.; D'souza, S.F.; Desai, P.D. (2008) Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (*kitasatospora sp.*) for soil applications. *Curr Sci*, 94:12-25.

- Silveira, V.; Santa-Catarina, C.; Tun, N.N.; Scherer, G.F.E.; Handro, W.; Guerra, M.P.; Floh, E.I.S. (2006) Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze. *Plant Sci*, 171:91-98.
- Silverman-Gavrila, L.B.; Lew, R.R. (2003) Calcium gradient dependence of *Neurospora crassa* hyphal growth. *Microbiology*, 149:2475-2485.
- Szabo, R.; Stofaniková, V. (2002) Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Lett*, 206(1):45-50.
- Tabor, C.W.; Tabor, H. (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem*, 53:749-90.
- Tabor, C.W.; Tabor, H. (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev*, 49(1):81-99.
- Tedford, K.; Kim, S.; SA, D.; Stevens, K.; Tyers, M. (1997) Regulation of the mating pheromone and invasive growth responses in yeast by two MAP kinase substrates. *Curr Biol*, 7(4):228-238.
- Tsigie, Y.A.; Wang, C.Y.; Truong, C.T.; Ju, Y.H. (2011) Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour Technol*, 102(19):9216-9222.
- Tonon, G.; Kevers, C.; Gaspar, T. (2001) Changes in polyamines, auxins and peroxidase activity during in vitro rooting of *Fraxinus angustifolia* shoots: an auxin-independent rooting model. *Tree Physiol*, 21:655-663.
- Tun, N.N.; Santa-Catarina, C.; Begum, T.; Silveira, V.; Handro, W.; floh, E.I.; Scherer, G.F. (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol*, 47:346-354.
- Uemura, T.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K. (2007) Polyamine uptake by DUR3 and SAM3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 282(10):7733-7741.
- Ueno, Y.; Fukumatsu, M.; Ogasawara, A.; Watanabe, T.; Mikami, T.; Matsumoto, T. (2004) Hyphae formation of *Candida albicans* is regulated by polyamines. *Biol Pharm Bull*, 27(6):890-892.
- Váchová, L.; Cáp, M.; Palková, Z. (2012) Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity. *Oxid Med Cell Longev*, v.2012, 8p., ID601836, doi:10.1155/2012/601836.

- Valdés-Santiago, L.; Cervantes-Chávez, J.A.; Ruiz-Herrera, J. (2009) *Ustilago maydis* spermidine synthase is encoded by a chimeric gene, required for morphogenesis, and indispensable for survival in the host. *FEMS Yeast Res*, 9:923-935.
- Veses, V.; Gow, N.A. (2008) Vacuolar dynamics during the morphogenetic transition in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*, 8(8):1339-1348.
- Voordeckers, K.; De Maeyer, D.; Van Der Zande, E.; Vincens, M.D.; Meert, W.; Cloots, L.; Ryan, O.; Marchal, K.; Verstrepen, K.J. (2012) Identification of a complex genetic network underlying *Saccharomyces cerevisiae* colony morphology. *Mol Microbiol*, 86(1):225-239.
- Walthers, D.L. (1995) Inhibition of polyamine biosynthesis in fungi. *Mycol Res*, 99(2):129-139.
- Walther, T.; Reinsch, H.; Weber, P.; Ostermann, K.; Deutsch, A.; Bley, T. (2010a) Applying dimorphic yeasts as model organisms to study mycelial growth: part 1. Experimental investigation of the spatio-temporal development of filamentous yeast colonies. *Bioprocess Biosyst Eng*, 34(1):13-20.
- Walther, T.; Reinsch, H.; Weber, P.; Ostermann, K.; Deutsch, A.; Bley, T. (2010b) Applying dimorphic yeasts as model organisms to study mycelial growth: part 2. Use of mathematical simulations to identify different construction principles in yeast colonies. *Bioprocess Biosyst Eng*, 34(1):21-31.
- Wang, Y.; Luo, J.P.; Wu, H.Q.; Ji, H. (2009) Conversion of protocorn-like bodies of *Dendrobium huoshanense* to shoots: the role of polyamines in relation to the ratio of total cytokinins and indole-3-acetic acid. *J Plant Physiol*, 15:2013-2022.
- Whiteway, M. (2000) Transcriptional control of cell type and morphogenesis in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 3:582-588.
- Xu, J.R. (2000) Map kinases in fungal pathogens. *Fungal Gen. Biol.*, 31(3):137-152.
- Yamasaki, H.; Cohen, M.F. (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci*, 11(11):522-524.
- Yamazaki, T.; Zaal, K.; Hailey, D.; Presley, J.; Lippincott-Schwartz, J.; Samelson, L.E. (2002) Role of Grb2 in EGF-stimulated EGFR internalization. *J Cell Science*, 115(9):1791-1802.
- Yanagishima, N.; Shimoda, C. (1968) Auxin-induced expansion growth of cell and protoplasts of yeast. *Physiol Plant*, 21:1122-1128.
- Zandonadi, D.B.; Canellas, L.P.; Façanha, A.R. (2007) Indoleacetic and humic acids induces lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, 225(6):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(5):1025-1036.

Zandonadi, D.B. (2010) *Energização e sinalização dos mecanismos de regulação do desenvolvimento radicular via modulação das bombas de H⁺ por ácidos húmicos e fitormônios*. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro" - UENF, 169p.

Zarr, J. H. (1999) *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice-Hall Press, 663p.

Zhao, P.B.; Ren, A.Z.; Li, D.C. (2011) The FUS3/KSS1-type MAP kinase gene FPK1 is involved in hyphal growth, conidiation and plant infection of *Fusarium proliferatum*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 21(3-4):110-119.