

AVALIAÇÃO DA LEVEDURA *Yarrowia lipolytica* COMO MODELO DE  
ESTUDO DOS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO

**FLÁVIA DE AZEVEDO LOBÃO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
ABRIL - 2007

AVALIAÇÃO DA LEVEDURA *Yarrowia lipolytica* COMO MODELO DE  
ESTUDO DOS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO

**FLÁVIA DE AZEVEDO LOBÃO**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
ABRIL – 2007

AVALIAÇÃO DA LEVEDURA *Yarrowia lipolytica* COMO MODELO DE ESTUDO DOS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO

**FLÁVIA DE AZEVEDO LOBÃO**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Aprovada em 02 de abril de 2007.

Comissão Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Maria Alice Zarur Coelho (D.Sc., Engenharia Química) – UFRJ

---

Prof.<sup>a</sup> Marília A. B. de Molina (D.Sc., Tec. Bioquímico-Farmacêutica ) – UENF

---

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (D.Sc., Agronomia - Fitopatologia ) – UENF

---

Prof.<sup>a</sup> Anna L. Okorokova Façanha (D.Sc., Química Biológica) – UENF

---

Prof. Arnaldo Rocha Façanha ( D.Sc., Química Biológica) – UENF  
Orientador

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Alumínio.....	03
2.2 Mecanismos de exclusão do Alumínio.....	05
2.2.1 O papel da extrusão de prótons na resistência do Al.....	05
2.2.2 Detoxificação interna do Al.....	08
2.2.3 Transporte e compartimentalização do Al.....	08
2.3 Sistemas de transporte de $\text{Ca}^{2+}$ .....	09
2.4 Interação $\text{Ca}^{2+}$ – Al.....	12
2.5 O $\text{Ca}^{2+}$ e a polarização celular em fungos.....	12
2.6 Levedura como modelo de estudo da toxicidade do Al.....	14
2.6.1 Levedura de <i>Brotamento Saccharomyces cerevisiae</i> .....	14
2.6.2 Levedura de fissão <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	16

2.7 <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	17
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Microrganismo.....	21
4.2 Meios de cultura .....	21
4.2.1 Para cultivo em meio líquido.....	21
4.2.2 Manutenção.....	21
4.3 Condições de cultivo.....	22
4.4 Isolamento de membranas celulares de <i>Y. lipolytica</i> .....	22
4.5 Análise das mudanças morfológicas de <i>Y. lipolytica</i> .....	23
4.6 Determinação do transporte de H <sup>+</sup> em vesículas membranares .....	23
4.7 Determinação da Atividade Hidrolítica.....	24
4.8 Determinação do conteúdo de proteína.....	25
4.9 Análise do efeito do Al na alteração do pH do meio sólido de cultivo e em colônias de <i>Y. lipolytica</i> .....	27
4.10 Determinação de transporte de cálcio em células de <i>Y. lipolytica</i> .....	27
5. RESULTADOS.....	28
5.1 Efeito do Al no cultivo e na morfologia de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	28
5.2 Análise do efeito do Al na atividade de H <sup>+</sup> -ATPase.....	29
5.3 Efeito do Al no pH do meio de crescimento de <i>Y. lipolytica</i> .....	33
5.4 Análise da captação de <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> por células de <i>Y. lipolytica</i> .....	33
6. DISCUSSÃO.....	35
7. RESUMOS E CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## ABREVIATURAS

$\lambda$	Comprimento de onda
$[Ca^{+2}]_{cit}$	Concentração de cálcio livre no citoplasma
ACMA	Cloro-2-metoxiacridina
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase (classe de enzimas que hidrolizam ATP)
BSA	Albumina de soro bovino
<i>cta4<sup>+</sup></i>	Gene que codifica para a Cta4 ATPase
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (quelante de cálcio)
EGTA	Ethylene glycol-bis (b-aminoethyl ether) (quelante de cálcio)
FCCP	Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
GF/F	Filtro de fibra de vidro tamanho F
HACS	High-affinity calcium system
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
LACS	Low-affinity calcium system
MES	N- morpholino ethanesulfonic acid
MOPS	N-morpholino propane–sulfonic acid
Pi	Fosfato inorgânico
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
POPOP	1,4-bis [5phenyl-2oxazolyl] benzene; 2,2'-phenylene-bis[phenyloxazole]

PPO	2,5-diphenylaxazole
rpm	Rotações por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sódio
Tris-HCl	Tris [hydroxymethyl] aminomethane
YED	Yeast extract, meio de cultivo rico

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela vida e por ter dado-me forças para prosseguir.

Aos meus pais, Cecilia e José Mauricio, e aos meus irmãos, Aline e Adriano, por todo incentivo, nas mais diferentes decisões por sempre entenderem minha ausência em vários momentos importantes para nossa família.

Ao Marcos, que sempre esteve do meu lado em todas as ocasiões importantes demonstrando todo seu apoio, amor e carinho.

À minha Co-Orientadora, Professora Anna L. Okorokova-Façanha, por toda ajuda fornecida em todos os períodos que necessitei. Obrigada por todos os ensinamentos e por todas as vezes que me fez pensar de modo crítico. Além disso, agradeço pela amizade que surgiu deste longo convívio.

Ao meu orientador, Professor Arnaldo Rocha Façanha que me auxiliou com clareza e sabedoria em todas as dúvidas recorrentes. E também por ter concedido um maravilhoso convívio pessoal.

Ao Professor Lev Okorokov por sempre ter estado disposto a esclarecer minhas dúvidas e contribuir com sugestões para realização deste trabalho.

Ao Professor Ricardo Bressan pelas sugestões, discussões, esclarecimentos científicos na defesa do projeto.

Ao Professor Luciano Canellas por aceitar fazer a revisão deste trabalho e pela contribuição durante a defesa do projeto.



Aos Professores Marília Berbert Molina, Maria Alice Zarur Coelho e Silvaldo Felipe da Silveira por aceitarem o convite para compor a banca de defesa desta Dissertação.

Ao Luiz Carlos por ter me “socorrido” todas as vezes que precisei de ajuda com material de trabalho.

Às duas grandes amigas que ganhei no momento que entrei no laboratório, Lívia e Ludmilla, que sempre me ajudaram quando eu mais precisei e por sempre estarem dispostas a escutar meus desabafos e minhas alegrias, a me aconselhar e ajudar em decisões importantes para mim.

A Marcela pela ajuda decisiva em todos os meus isolamentos.

A Keilla, por todos os dias que chegou muito cedo e saiu muito tarde me ajudado com os experimentos e a cuidar tão bem da estrela maior deste trabalho: a *Yarrowia*.

A Natália, Ana Cristina, Flávia Emenegilda, Gislaine, Camila e novamente a Marcela, Ludmilla e Lívia por todos os momentos maravilhosos de descontração e de muitas gargalhadas durante a “hora do café”.

Aos colegas do LFBM: Renan, Bruno, Carol, André, Suzana, Mariângela, Luana e Isabela pela ajuda que sempre me dispuseram e pelo ótimo convívio no laboratório.

A UENF pela concessão da bolsa durante este trabalho.

E finalmente a todos que direta ou indiretamente me ajudaram e contribuíram para meu crescimento profissional.

## RESUMO

LOBÃO, Flávia de Azevedo; MS; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Abril de 2007; AVALIAÇÃO DA LEVEDURA *Yarrowia lipolytica* COMO MODELO DE ESTUDO DOS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO; Orientador: Arnaldo Rocha Façanha; Co-orientadora: Anna L. Okorokova Façanha.

*Yarrowia lipolytica* é um fungo dimórfico encontrado em diferentes habitats incluindo o solo. O alumínio (Al) é o principal fator limitante da produtividade em solos com pH menor que 5,5 que compreendem aproximadamente 40% da área arável do mundo. Além disso, o Al é considerado um agente neurotóxico. Foi usado *Y.lipolytica* do como um modelo para o estudo dos mecanismos da tolerância e de toxicidade ao Al. Foi possível observar que as concentrações de Al normalmente inibitórias às plantas (0,1 – 1,0 mM AlK (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) não afetaram o crescimento de *Y. lipolytica* em pH 4,5 e tampouco induziram mudanças na morfologia celular. Entretanto, concentrações elevadas do Al impedem a transição levedura-hifa. Essa transição levedura-hifa é determinante para a patogenicidade de diversos fungos em humanos, tais como *Candida*, *Cryptococcus* e *Histoplasma* e é controlada por diversos fatores incluindo o pH ambiental em *Candida albicans* e em *Yarrowia lipolytica*. Para testar se a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase é influenciada pelo Al, vesículas de membrana foram isoladas de células cultivadas na presença de 1 mM AlK (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. As vesículas de membrana exibiram uma estimulação cerca de 2 vezes no transporte de H<sup>+</sup> vanadato-sensível mas nenhum aumento significativo na atividade do ATPase foi visto indicando que o transporte de H<sup>+</sup> da

membrana do plasma foi estimulada pelo alumínio. Adicionalmente, mudanças no pH produzidas por células de *Yarrowia lipolytica* em meio sólido sob tratamento com Al estimulou a translocação de  $H^+$  em vesículas de membrana e reforçou a noção de que o Al influencia o pH extracelular por meio da ativação do bombeamento de  $H^+$  através da membrana plasmática. Trabalhos anteriores verificaram uma ligação entre o Al e fluxos celulares de cálcio em *Schizosaccharomyces pombe*. Para testar se o Al interfere com a homeostase do cálcio em *Y. lipolytica* foi medida a acumulação  $^{45}Ca^{2+}$  em células de levedura. A adição direta do Al ao meio de crescimento estimulou a captação de  $^{45}Ca^{2+}$  em células de *Y. lipolytica* cerca de 4 vezes. Os resultados sugerem que as alterações no transporte  $H^+$  da membrana plasmática podem atuar como sinalização via pH requerida para o desenvolvimento da transição levedura-hifa. A resistência de *Yarrowia lipolytica* pode estar associada com aumento do transporte do cálcio.

## ABSTRACT

LOBÃO, Flávia de Azevedo; MS; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Abril de 2007; VALIDATION OF YEAST *Yarrowia lipolytica* AS A MODEL TO STUDY THE MECHANISM OF ALUMINUM TOLERANCE; Orientador: Arnaldo Rocha Façanha; Co-orientadora: Anna L. Okorokova Façanha.

*Yarrowia lipolytica* is a dimorphic fungus found in different habitats including soil. Aluminum (Al) is the major factor which affects crop productivity in acid soils with pH below 5.5, that comprise about 40 percent of the world's arable land and also is considered a neurotoxic agent. Here we used *Y. lipolytica* as a model to study the mechanisms of Al tolerance and toxicity. We found that Al concentrations which are inhibitory to plants (0.1- 1.0 mM  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ) did not affect *Y. lipolytica* growth at pH 4.5 neither induced drastic changes in cell morphology. However, high Al concentrations prevent yeast-mycelium transition. Yeast-hyphae transition is a determination factor for pathogenicity of several human fungi including *Candida*, *Cryptococcus* and *Histoplasma* and is controlled by several factors including environmental pH in *Candida albicans* and *Y. lipolytica*. To test whether fungal  $\text{H}^+$ -ATPase is a potential target for Al, membrane vesicles were isolated from cells cultivated in the presence of 1 mM  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ . They exhibited stimulation of vanadate-sensitive  $\text{H}^+$  transport by ~2-fold but no significant increase in ATPase activity indicating that plasma membrane  $\text{H}^+$  pump was stimulated by aluminum. Furthermore, the changes in the pH of solid medium produced by *Y. lipolytica* cells under Al stress were consistent with Al-induced stimulation of  $\text{H}^+$  translocation in

the membrane vesicles and reinforced the notion that Al influences the extracellular pH by activating the H<sup>+</sup> pumping at the plasma membrane. Previous works established a link between Al and cellular calcium fluxes in *Schizosaccharomyces pombe*. To test whether Al treatment interferes with calcium homeostasis in *Y. lipolytica* we measured <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> accumulation in yeast cells. Direct addition of Al to yeast growth medium stimulated <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake into *Y. lipolytica* cells by ~4-fold. Our results suggest that alterations in the plasma membrane H<sup>+</sup> transport might underline a pH signaling required for yeast/hyphal development and that *Yarrowia* resistance might be associated with increase of calcium transport.

## 1. INTRODUÇÃO

Com seus genomas relativamente pequenos e compactos, as leveduras oferecem uma grande chance de explorar a evolução eucariótica do genoma pela análise comparativa de diversas espécies. Leveduras são usadas extensamente para a produção de cerveja, vinho, pão e recentemente, de vários produtos metabólicos tais como vitaminas, etanol, ácido cítrico, lipídios. Além disso, leveduras têm se mostrado um excelente sistema para isolamento e caracterização de genes responsáveis por sinais ambientais incluindo estresse oxidativo, salino e causado por metais (Serrano, 1996; Avery, 2001). Alumínio é o metal mais abundante da crosta terrestre, cerca de 7%, e possui uma ubíqua e crescente presença na vida humana, além de amplamente utilizado na indústria moderna. Por esta razão, o ambiente é constantemente exposto a altos níveis deste metal que se torna mobilizado e tóxico para muitas plantas em solos com pH abaixo de 5. A toxicidade do Al levando a deficiência de nutrientes tem sido considerada o fator primário limitante da produtividade agrícola (Foy *et al.*, 1978) que compreende cerca de 40% de toda área utilizada para cultivo. Apesar de intensas investigações, os mecanismos precisos de ação do Al permanecem desconhecidos. O entendimento das bases fisiológicas da toxicidade do Al e os mecanismos celulares que muitas plantas utilizam para tolerar a toxicidade do Al é essencial para o desenvolvimento de espécies capazes de ser cultivadas em solos ácidos (Kochian *et al.*, 2004).

Fungos e plantas compartilham similaridades na homeostase de íons e bioenergética, além de muitos outros mecanismos celulares envolvidos na

homeostase que são comuns entre estes organismos. No presente estudo, foi utilizada a levedura não convencional *Yarrowia lipolytica* para estudar a toxicidade do Al. *Y. lipolytica* é um ascomiceto dimórfico que recentemente tem atraído enorme atenção devido ao seu valor biotecnológico bem como um organismo modelo para o estudo do dimorfismo fúngico e funcionamento de peroxissomos e mitocôndrias (Barth e Gaillardin, 1997). *Y. lipolytica* cresce em diferentes faixas de pH e pode ser encontrada em diferentes habitats incluindo o solo, que é naturalmente exposto ao Al. *Y. lipolytica* cresce como uma mistura de leveduras e formas filamentosas. Diferentes efetores envolvidos na transição dimórfica de *Y. lipolytica* estão sendo descobertos. Entre eles estão fontes de carbono e nitrogênio, soro e pH extracelular (Perez-Campo & Dominguez 2001; Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002; Szabo & Stofaníková, 2002).

A H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática possui uma função essencial na fisiologia celular de fungos e plantas. É responsável pela geração de um grande gradiente eletroquímico que conduz o transporte de aminoácidos, açúcares e íons inorgânicos (Goffeau e Slayman, 1981). A extrusão de H<sup>+</sup> catalisada por esta enzima também contribui para a regulação do pH intracelular e do pH da superfície dos fungos. É amplamente conhecido que em *Y. lipolytica* e em *Candida albicans* o pH extracelular neutro ou alcalino induz a formação de formas filamentosas enquanto o pH extracelular ácido favorece o desenvolvimento de formas de leveduras (Ruiz-Herrera e Sentandreu, 2002; Szabo e Stofaníková, 2002).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Alumínio

O alumínio é o terceiro elemento químico e o metal mais abundante da crosta terrestre. É encontrado na natureza somente na forma oxidada, e em solução aquosa, é hidrolisado de tal modo que a espécie alumínio trivalente, ( $\text{Al}^{3+}$ ) predomina em pH menor que 5,5, enquanto as espécies  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  e  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  são formadas em pH levemente ácido. Próximos à neutralidade, o alumínio encontra-se na fase sólida  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , e em condições alcalinas a forma  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  predomina (Kochian, 1995).

Os solos ácidos com pH de 5,5 ou menor são encontrados em toda superfície terrestre, sendo que cerca de 30% das áreas aráveis são constituídas por este tipo de solo (Kinraide, 1993). A produção de plantas com finalidade alimentícia, principalmente os cereais, é sensivelmente reduzida em solos ácidos. Estima-se que até 20% da produção mundial de trigo e 13% da produção de arroz são cultivadas em solos ácidos (von Uexküll e Mutert, 1995). Neste tipo de solo, micronutrientes, tais como zinco, manganês, cobre e ferro, têm suas concentrações aumentadas. Em pH baixo, o íon hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) atua sobre os minerais, liberando íons alumínio (Al) retidos pelas cargas negativas dos minerais da fração argila do solo, aumentando a concentração de Al em solução (Bohnen, 1995; Bolan e Hedley, 2003; Tang e Rengel, 2003).

As plantas não necessitam de Al para crescer, não sendo também caracterizado como um nutriente essencial. Entretanto, é considerado



responsável por um dos mais importantes problemas de toxicidade de metais em solos ácidos, representando um fator limitante de crescimento para as plantas (Foy *et al.*, 1978; Aniol, 1990; Anoop, 2003; Matsumoto, 2005).

O estudo da toxicidade do Al em plantas tem adquirido uma grande importância devido a duas razões principais: primeiro, pelas fortes perdas econômicas e segundo, porque os vegetais como produtores primários são a via de entrada na cadeia alimentar para o homem, tanto diretamente como através da carne dos herbívoros, consumida pelo homem (Foy *et al.*, 1978). Muitos estudos têm mostrado que a inibição do crescimento da raiz é o sintoma visível característico da toxicidade do Al em plantas, resultando na redução e em danos do sistema radicular, podendo levar à deficiência mineral e ao estresse hídrico (Degenhardt *et al.*, 1998; Kochian *et al.*, 2004). Também foi observado que a toxicidade do Al pode resultar também, no desequilíbrio do metabolismo do nitrogênio, sulfato e carbono (Bolan e Heldley, 2003; Tang e Rengel, 2003), na captação excessiva de cátions em detrimento de ânions (Tang e Rengel, 2003), no uso contínuo de corretivos de acidez do solo (Bolan *et al.*, 1991; Zhang e Rengel, 2003) e no estresse oxidativo (Horst, 1992; Matsumoto *et al.*, 2003; Tamas, 2006). A indução da deposição de calose nos canais plasmodesmáticos, pelo Al, que bloqueia fisicamente o transporte simplástico entre as células, pode levar à deficiência de nutrientes, tais como fosfato (Rengel, 2000; Sivaguru, 2005; Hirano, 2006).

Há mais de três décadas, o Al é relacionado com diferentes processos patológicos importantes, tanto para o homem como para outros mamíferos. Nos primeiros estudos da neurotoxicidade do alumínio, Alfrey *et al.* (1976) constataram que o desenvolvimento de encefalopatias poderia estar associado ao acúmulo de alumínio. Maior atenção foi dada ao assunto, quando se percebeu a presença de disfunções relacionadas com a toxicidade do alumínio em pacientes que utilizavam a diálise como tratamento, já que esta não é eficiente na remoção do íon durante a filtração da água que continha resquício do mesmo. As fontes de água urbanas podem conter uma concentração maior de alumínio, pois a água é tratada geralmente com sulfato de alumínio antes da distribuição para a população.

O Al tem sido implicado, em numerosos estudos, como agente neurotóxico, uma vez que provoca a degradação de fibras nervosas em regiões do cérebro com elevada concentração do metal (Exley, 1999). Alguns estudos

indicam o Al como um fator que contribui para desenvolvimento de algumas doenças neurológicas, tais como o Mal de Alzheimer e o Mal de Parkinson (Houeland, 1990; Exley, 1999; Yokel, 2000; Zatta *et al.*, 2003) no qual o alumínio é capaz de causar alterações na homeostase de íons como o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  em células cerebrais, resultando em alterações na neurotransmissão e no desenvolvimento da cascata de eventos que caracterizam estes distúrbios (Bala Gupta *et al.*, 2005).

## **2.2 Mecanismos de exclusão do Alumínio**

Os mecanismos utilizados pelas plantas para excluir o Al foram estudados intensamente. A entrada do Al nas plantas Al-resistentes é impedida por diversos mecanismos de exclusão, incluindo o influxo de  $\text{H}^+$  na ponta da raiz, resultando em um aumento líquido do pH na superfície (Degenhardt *et al.*, 1998), ligação do Al por proteínas excretadas (Basu *et al.*, 1999), excreção localizada de fosfato no ápice da raiz, a fim de precipitar o Al (Pellet *et al.*, 1996) e ligação do Al a componentes negativamente carregados na parede celular da raiz (Katsumata *et al.*, 2003) e mucilagem (Miyasaka e Hawes, 2001). Destas alternativas somente dois mecanismos externos da resistência do Al foram comparados experimentalmente, ou seja, a formação de precipitado formado pelo Al e ligantes secretados no ápice da raiz, e a alcalinização do apoplasto e da rizosfera apical (Wenzl *et al.*, 2001).

### **2.2.1 O papel da extrusão de prótons na resistência ao Al**

Foy *et al.* (1996) propuseram um mecanismo de exclusão do Al que envolvia a alcalinização da rizosfera, onde a mudança no pH era aferida em solução nutriente, de forma mais acurada do que no microambiente da rizosfera associada com o ápice da raiz. Entretanto, os estudos recentes utilizando micro-eletrodos sensíveis a pH demonstraram o aumento induzido pelo Al no influxo de  $\text{H}^+$  especificamente no ápice da raiz, tendo por resultado o aumento local do pH (Degenhardt *et al.*, 1998; Kollmeier *et al.*, 2000). Degenhardt *et al.* (1998) forneceram evidências experimentais mais acuradas para o mecanismo de

resistência ao Al baseado no aumento do pH induzido pelo Al na superfície da raiz. Neste trabalho, um mutante tolerante ao Al, *alr-104*, de *Arabidopsis* apresentou aumento no influxo de H<sup>+</sup> na ponta da raiz induzido pelo Al, resultando em um aumento do pH da rizosfera. Na ausência de Al, nenhuma diferença no fluxo de H<sup>+</sup> foi observada entre o tipo selvagem e o mutante *alr-104*. Dessa forma, o mecanismo de resistência ao Al em *alr-104* parece ter sido causado pela alcalinização do rizosfera induzida pela exposição ao Al. No entanto, não está claro se o aumento do pH foi a causa da resistência do Al ou somente refletiu uma inibição da função da raiz induzida pelo Al, característica de espécies sensíveis. O Al inibiu a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática (MP), que regula os fluxos do H<sup>+</sup> e o potencial transmembrana (Matsumoto *et al.*, 1992; Ahn *et al.*, 2001). Ahn *et al.* (2001) encontraram um aumento no potencial zeta das vesículas da MP em raízes inteiras associado intimamente com a diminuição da atividade de H<sup>+</sup>-ATPase sob concentrações crescentes de Al e duração do tratamento. As propriedades da MP, tais como, de superfície negativa ou potencial zeta foram alteradas pelo Al e podem ser importantes como barreiras para o movimento passivo do Al em células da raiz (Kinraide *et al.*, 1998).

A modulação do pH celular em raiz é extremamente complexa e compreende componentes biofísicos e bioquímicos. O último envolve a produção e o consumo de H<sup>+</sup>, parte em consequência da carboxilação e decarboxilação de ácidos orgânicos dentro da célula da raiz, e parte em consequência dos fluxos de H<sup>+</sup> através das membranas celulares (Haynes, 1990; Marschner, 1995). Os componentes tamponantes internos desenvolvem um papel chave no sistema de controle do pH quando as H<sup>+</sup>-ATPases não conseguem controlar o pH do apoplasma ou do citosol (Gerendás e Schurr, 1999). Sendo assim, foi considerado que as bombas de H<sup>+</sup> atuam principalmente pela energização do transporte pela membrana e resultam em mudanças significativas de pH (Hinsinger *et al.*, 2003). As ATPases são modelos excelentes para a compreensão da captação de cátions. Entretanto, ainda há necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos de regulação das cargas na captação de ânions. A toxicidade do Al induz uma diminuição na captação de ânions, particularmente na captação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Ruffy *et al.*, 1995), mais do que na captação de cátions por raízes vegetais, causando uma acidificação adicional ou diminuição da alcalinização da rizosfera (Calba e Jaillard, 1997). Estes autores e outros (Haynes, 1990) mostraram que tal resposta à toxicidade do Al era típica de

genótipos sensíveis ao Al, visto que os genótipos resistentes eram mais capazes de manter sua capacidade de reter ânions e, desse modo, alcalinizar seu ambiente a fim de aliviar a toxicidade do Al em solos ácidos (Calba e Jaillard, 1997; Degenhardt *et al.*, 1998, Foy, 1988).

A H<sup>+</sup>-ATPase de MP desempenha um papel central na energização da captação de nutriente, assim como na regulação do pH citoplásmico. Supostamente, as plantas tolerantes ao Al possuem mecanismos para preservar a atividade de H<sup>+</sup>-ATPase e funções relacionadas. Embora seja considerado um elemento tóxico, o Al estimula freqüentemente o crescimento em concentrações mais baixas do que a concentração da fitotoxicidade (Façanha e Okorokova-Façanha, 2002). Previamente, acreditava-se que na maioria dos casos estes efeitos benéficos ocorriam como alívio do efeito tóxico de H<sup>+</sup> pelo Al (Kinraide, 1993), e demonstrou-se que a H<sup>+</sup>-ATPase MP poderia também contribuir significativamente neste processo (Yan *et al.*, 1998). Corroborando com esta idéia, Façanha e Okorokova-Façanha (2002) encontraram que baixas concentrações de Al (50-100 µM AlCl<sub>3</sub>) promoveram o crescimento da raiz, relacionado à estimulação da bomba de H<sup>+</sup> da MP em uma variedade de milho tolerante ao Al.

Os ácidos orgânicos (AOs) têm sido frequentemente referidos como uma fonte possível à acidificação da rizosfera (Hoffland *et al.*, 1989). Entretanto, este efeito parece depender das espécies vegetais e do meio. Em milho, a contribuição de ácidos orgânicos exudados na acidificação foi insignificante, não excedendo 0,2-0,3% (Petersen e Böttger, 1991). Contrariamente, em *Lupinus albus* L. as raízes foram capazes de liberar ânions orgânicos tanto quanto foram capazes de precipitar e acumular Al na rizosfera, tendo como resultado uma forte acidificação (Dinkelaker *et al.*, 1989). Ohno *et al.* (2003) caracterizaram a habilidade da excreção de citrato em uma linhagem celular mutante de cenoura (*Daucus carota* L.), e encontraram que a excreção de citrato estava correlacionada com o efluxo de H<sup>+</sup>, possivelmente através da ação da H<sup>+</sup>-ATPase de MP.

Diversas espécies e cultivares vegetais tolerantes ao Al podem expressar uma H<sup>+</sup>-ATPase que seja estimulada por Al. Na qual o Al poderia regular o gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup> gerado por esta bomba, que poderia dirigir tanto a captação dos nutrientes como o efluxo de ácidos orgânicos (Façanha e Okorokova-Façanha, 2002).

### **2.2.2 Detoxificação interna do Al**

Com a seleção natural, as plantas desenvolveram muitos mecanismos relacionados com a capacidade de sobreviver tolerando a presença do Al no ambiente. Foram criadas, naturalmente, estratégias para a tolerância ao Al, permitindo colheitas em ambientes desfavoráveis. A ativação do metabolismo dos ácidos orgânicos pode também contribuir para a tolerância do Al. Diversas plantas detoxificam o Al na rizosfera liberando os ácidos orgânicos que complexam o Al antes da sua interação com a raiz, enquanto outras detoxificam o Al internamente, formando complexos com ácidos orgânicos que acumulam dentro do vacúolo (Ma *et al.*, 2001). Em milho, por exemplo, além da rápida ativação da liberação de citrato induzida por Al, ocorre um aumento mais lento do conteúdo de citrato na raiz. Também foi observado, indicando que além do mecanismo de exclusão do Al baseado na exudação de ácidos orgânicos na raiz, um mecanismo interno paralelo de tolerância do Al que pôde ser obtido baseado em mudanças induzidas pelo Al na síntese e na compartimentalização dos ácidos orgânicos (Pineros *et al.*, 2002).

### **2.2.3 Transporte e compartimentalização do Al**

Uma maior compreensão da natureza do transporte do Al através das membranas celulares e da distribuição do Al em nível celular é requerida para elucidar se a detoxificação do Al no plasma ou no vacúolo contribui para a resistência do Al nas plantas. Entretanto, ainda não se sabe de que forma o Al é capaz de cruzar as membranas celulares. A base mecanicista do transporte do Al e da distribuição subcelular total permanece pouco entendida (Taylor *et al.*, 2000).

Diversos estudos sugerem que o Al é capaz de cruzar as membranas celulares vegetais. Estudos cinéticos foram usados como ferramenta para investigar a captação do Al, nos quais o Al foi detectado por espectroscopia de fluorescência (Tice *et al.*, 1992; Vitorello e Haug, 1996, 1997). Entretanto, questões foram levantadas sobre o uso dos fluoróforos, que não podem detectar o Al quando este está associado a ligantes biológicos. Uma evidência adicional para a captação do Al foi obtida por espectrofotometria de absorção atômica

(Zhang e Taylor, 1989, 1990; Rincon e Gonzales, 1992; Delhaize *et al.*, 1993a; Archambault *et al.*, 1996; Samuels *et al.*, 1997). A captação do Al é tipicamente bifásica, com uma fase rápida, não linear, sobreposta a uma fase na qual a captação se torna linear com tempo (Zhang e Taylor, 1989). Embora a interpretação tradicional de dados cinéticos indique que a fase linear representa a captação através da membrana do plasma, diversos estudos demonstram que esta fase pode também incluir o Al não transportado, ou seja, presente na parede celular (Zhang e Taylor, 1990; Tice *et al.*, 1992; Archambault *et al.*, 1996). O Al afeta diretamente a estrutura da membrana e a permeabilidade de células vegetais (Haug, 1984; Zhao *et al.*, 1987; Caldwell, 1989) e o rompimento de processos do transporte da membrana pode limitar a nutrição vegetal (Taylor, 1988).

### 2.3 Sistemas de transporte de Ca<sup>2+</sup>

O Ca<sup>2+</sup> tem uma função ampla e importante na célula. Como para todo mensageiro secundário, a concentração de cálcio livre no citoplasma ( $[Ca^{2+}]_{cit}$ ) é mantida em níveis muito baixos, na faixa nanomolar, variando entre 100 a 200 nM em células de animais (Carafoli, 1987) e em células de levedura (Halachmi e Eilam, 1989; 1993). Para manter os níveis de cálcio na faixa submicromolar, as células devem ser equipadas com um mecanismo de controle da  $[Ca^{2+}]_{cit}$ , sendo criticamente importante para o controle de muitas respostas celulares.

Os sistemas de transporte que retiram Ca<sup>2+</sup> do citoplasma estão presentes em todas as células, sendo responsáveis pela manutenção da concentração de cálcio citoplasmático em nível fisiológico (Clapham, 1995; Sanders *et al.*, 1999; Cunningham e Fink, 1994b). Acredita-se que esses mecanismos responsáveis pela homeostase tornaram-se ideais para a subsequente evolução de vias de transdução de sinal, baseados na elevação transitória de  $[Ca^{2+}]_{cit}$ .

O aumento da  $[Ca^{2+}]_{cit}$  pode acontecer em resposta a muitos sinais diferentes (Sanders *et al.*, 2002), afetando diversos processos celulares que incluem a regulação da expressão gênica, progressão do ciclo celular, processamento e síntese de proteínas, a apoptose, o transporte nuclear, a segregação de cromossomos (Rudolph *et al.*, 1989; Iida *et al.*, 1990; Okorokov e

Lehle, 1998; Dürr *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1994; Corbett e Michalak, 2000; Carrión *et al.*, 1999).

Em células eucarióticas, a sinalização por cálcio tem início com a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  localizados na membrana plasmática (Berridge *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 2002) e em membranas de algumas organelas (Bush, 1995). Este processo é iniciado por um estímulo que aumenta a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  de 10 a 100 vezes acima do nível basal, seguido pelo fechamento dos canais e pela rápida remoção de  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol pelos trocadores e bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cunningham e Fink, 1994b). A presença de organelas intracelulares capazes de acumular cálcio contribui efetivamente para a regulação do aumento transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Em geral, a saída de cálcio do citoplasma é mediada por bombas que usam a hidrólise de ATP ou por trocadores que usam o gradiente de prótons gerado nas membranas por  $\text{H}^+$ -ATPases (Bush, 1995). Assim, os sinais de cálcio que fluem no citoplasma podem ser vistos como resultado de duas funções opostas: *influxo* (movimento para dentro) e *efluxo* (movimento para fora) (Sze *et al.*, 2000).

Locke *et al.* (2000) mostraram que as proteínas Cch1p e Mid1p da levedura *S. cerevisiae* são requeridas para o sistema de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidade (HACS - *high-affinity Ca<sup>2+</sup> influx system*). *MID1* codifica uma glicoproteína integral de membrana plasmática com massa molecular de aproximadamente 100 kDa (Iida *et al.*, 1994). O gene *CCH1* codifica um homólogo de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependente (VGCCs) presentes na membrana plasmática de células animais eletricamente excitáveis. Ainda nesse trabalho foi mostrado que Mid1p e Cch1p interagem fisicamente na membrana plasmática para permitir o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, também foi mostrado que Cch1p e Mid1p funcionam juntas como subunidades catalítica e regulatória/acessória de um único canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidade (Locke *et al.*, 2000).

Ainda não está claro como ocorre a regulação do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  por Cch1p e Mid1p. Dados recentes mostraram que a depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, em levedura, estimulou a atividade do canal de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  composto por Cch1p e Mid1p (Locke *et al.*, 2000). Em células animais também foi mostrado que a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , através de canais do RE, promoveu um aumento de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais de membrana plasmática pelo mecanismo CCE (Putney *et al.*, 1986, 1999).

Em estudos envolvendo sinalização por feromônios em *S. cerevisiae*, Muller *et al.* (2001) mostraram que a atividade do sistema de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidade é muito maior após a inibição de calcineurina, sugerindo que o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  Cch1p-Mid1p está sujeito à regulação direta ou indireta por calcineurina, uma proteína fosfatase cálcio/calmodulina dependente .

Em *Sch. pombe*, o gene *ehs1<sup>+</sup>* ou *yam8<sup>+</sup>* codifica uma proteína integral de membrana que é 30% idêntica à Mid1p/Cch1p de *S. cerevisiae*. Foram demonstrados seu envolvimento com acumulação de cálcio intracelular e a integridade da parede celular (Carnero *et al.*, 2000).

Dos sistemas de transporte primário, as  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases são de interesse especial, devido à importância do cálcio como sinalizador celular (Berridge, 1993). Muitas funções celulares são direta ou indiretamente reguladas pela concentração de cálcio livre, o que faz com que mudanças drásticas na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$ , causadas por mutações, sejam incompatíveis com a vida. As organelas da via secretória de células eucarióticas requerem altas concentrações de íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para a atividade de numerosas enzimas que catalisam o enovelamento, processamento protéico e o tráfico de proteínas secretoras.

Na levedura *S. cerevisiae* foram identificadas até o presente momento três genes cujos produtos são responsáveis pela remoção do cálcio do citoplasma, a saber: *PMR1*, que codifica uma  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase localizada no Golgi, *PMC1*, que codifica uma  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase localizada no vacúolo e *VCX1*, que codifica um antiporter  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  localizado no vacúolo (Rudolph *et al.*, 1989; Cunningham e Fink, 1994a; Cunningham e Fink, 1996). Além da participação das bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , Pmc1p e Pmr1p, as membranas intracelulares constituintes da via secretória de *S. cerevisiae* apresentam atividade de transporte de cálcio dependente de ATP, possivelmente mediado por outras  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (Hiraga *et al.*, 1991; Okorokov *et al.*, 1994). No entanto, trabalhos recentes têm demonstrado a presença de ATPases localizadas no retículo endoplasmático, envolvidas na homeostase de cálcio, a saber: Cta4 e Cps5 ATPases na levedura de fissão *Sch. pombe* (Okorokova-Façanha *et al.*, 2002; Ishiguro *et al.*, 2004, respectivamente), Spf1 ATPase em *S. cerevisiae* (Suzuki e Shimma, 1999) e Eca1 em *Ustilago maydis* (Adamíková *et al.*, 2004).



## 2.4 Interação $\text{Ca}^{2+}$ – Al

O envolvimento do cálcio citozóico  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  na toxicidade do alumínio foi tema de muitos estudos em plantas (revisado por Rengel e Zhang, 2003). Adições diretas de Al inibem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em células de trigo intactas (Huang *et al.*, 1992; Ryan e Kochian, 1993; Jones e Kochian, 1995), em protoplastos de *Amaranthus* (Rengel e Elliot, 1992a, 1992b; Rengel, 1996) e em vesículas de membrana em células de milho (Huang *et al.*, 1996). Quando presente em altas concentrações, o Al induz a formação de superóxidos, causando estresse oxidativo que, por sua vez, induz o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  em células de tabaco (Kawano *et al.*, 2003). O Al também causou inibição do crescimento da raiz de trigo e, conseqüentemente, interferiu na absorção de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo ápice da raiz, comprometendo a sua nutrição (Huang *et al.*, 1992). A captação de  $\text{Ca}^{2+}$  em protoplastos de *Amaranthus* (Pineros e Tester, 1993) e o crescimento radicular em ponta de raiz foram inibidos, sendo que esta inibição foi diretamente correlacionada com um aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  (Rengel *et al.*, 2002). Sivaguru *et al.* (2003), estudando os receptores de glutamato em células de *A. thaliana*, observaram que o Al, na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , despolimeriza microtúbulos, despolariza a membrana plasmática e inibe a elongação vegetal. Os autores sugerem que estes fatos são decorrentes de uma elevação nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  causado por aberturas de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ . O Al também foi capaz de aumentar o influxo/entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  em células vivas de *Sch. pombe* (Lobão, 2005).

## 2.5 O $\text{Ca}^{2+}$ e a polarização celular em fungos

A polarização celular é um processo dinâmico e complexo, porém fundamental no crescimento de fungos e também de células especializadas dentro do reino vegetal (Silverman-Gavrila e Lew, 2002, 2003). A síntese e a expansão localizadas na ponta em crescimento são reguladas até que um tubo (uma hifa) de diâmetro constante seja produzido (Ruiz-Herrera, 1991). A regulação da expansão da ponta da hifa depende da extensibilidade da parede celular (Torralba e Heath, 2001), da associação do citoesqueleto com a MP (Lepidi *et al.*, 1995; Avrova *et al.*, 1998; Braun *et al.*, 2004) e de mudanças no gradiente iônico (Alcântara *et al.*, 2004).

F-actina é um dos principais componentes responsáveis pela polarização celular (Jackson e Heath, 1993). A abundância da actina e do  $\text{Ca}^{2+}$  nas extremidades celulares atuam como reguladores da polarização celular. Os íons  $\text{Ca}^{2+}$  podem interagir com a actina de diversas maneiras, podendo, por exemplo, se ligar diretamente a actina e afetar a síntese e a conformação do monômero (Bertazzon *et al.*, 1990; Milde, 1990). Níveis elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  também podem estimular a fosforilação de proteínas do citoesqueleto (através das kinases  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina dependentes), a qual pode afetar os filamentos de actina.

Diversos estudos mostram a ligação entre homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  e a polarização celular. Silverman-Gavrila e Lew (2003) demonstraram que canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por inositol 1,4,5-trisfosfato foram responsáveis pela manutenção do crescimento polarizado de *Neurospora crassa* (Silverman-Gavrila e Lew, 2003). Façanha *et al.* (2002) observaram que mutantes de levedura de fissão deficientes em cátion Cta4 ATPase, apresentam vários defeitos morfológicos, tais como células alongadas e multi-septadas. A ausência de Cta4p resultou em uma desestabilização dos microtúbulos, de modo que a célula apresentou microtúbulos curtos e em número maior. Experimentos utilizando o indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$  em células intactas revelaram que a ausência de *cta4* resultou em um aumento do nível de cálcio celular em mutantes. Estes resultados mostraram a existência de uma ligação entre o controle da forma celular, dinâmica de microtúbulos, citocinese e a homeostase de cálcio. Brand *et al.* (2007) observaram que células de *C. albicans* cultivadas em meio contendo baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  tiveram seu crescimento polarizado diminuído, bem como células em que os canais de cálcio foram bloqueados.

## **2.6 Levedura como modelo de estudo da toxicidade do Al**

### **2.6.1 Levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae***

A levedura de brotamento *S. cerevisiae* é utilizada como organismo modelo por ser de fácil manipulação genética, molecular e bioquímica e por

possuir os diversos processos celulares conservados e comuns às células de eucariotos superiores. A espécie provou ser um sistema excelente para isolar e caracterizar genes responsáveis por respostas aos sinais ambientais, incluindo estresses salino, oxidativo e de metal (Serrano, 1996; Avery, 2001). Na última década, *S. cerevisiae* foi considerada como modelo para estudar os mecanismos de toxicidade ao Al. Como em plantas, o Al é capaz de inibir o crescimento da levedura em pH baixo (<4,5), em concentrações micromolares, com 50% de inibição do crescimento a 200 µM de Al. Entretanto o crescimento pode ser detectável em concentrações de até 600-1000 µM (MacDiarmid e Gardner, 1996; Schott e Gardner, 1997, Ezaki *et al.*, 1998), indicando que a levedura mostra maior tolerância para o Al do que as plantas. A análise de mutantes de *S. cerevisiae* com sensibilidade aumentada ao Al mostrou que o Mg<sup>2+</sup> alivia o estresse causado pelo Al, sugerindo que o Al induz a deficiência de Mg<sup>2+</sup> na levedura (Schott e Gardner, 1997).

Uma seleção na biblioteca genômica da levedura para os genes que conferem resistência ao Al quando superexpressos, levou à identificação de *ALR1* e *ALR2* que codificam proteínas transportadoras da membrana (MacDiarmid e Gardner, 1998). A caracterização de *ALR1* demonstrou sua função como canal de Mg<sup>2+</sup> (Liu *et al.*, 2002) e sua localização na MP (Graschopf *et al.*, 2001). Transportadores homólogos, AtMGT1 a AtMGT-10, foram identificados em *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2001). O Mg<sup>2+</sup> alivia a toxicidade do Al nas plantas (Kinraide e Parker, 1987; Tan *et al.*, 1991) sugerindo que o Al pode também promover mudanças na homeostase de Mg<sup>2+</sup> na célula vegetal. O transporte de Mg<sup>2+</sup> mediado por AtMGT1 e por AtMGT10 é inibido por Al (Li *et al.*, 2001) indicando, assim, os membros da família AtMGT como genes candidatos à manipulação genética e à construção de plantas transgênicas com tolerância realçada ao Al.

Ezaki *et al.* (1998) isolaram a proteína de choque térmico codificado pelo gene *HSP150* da biblioteca do cDNA construída das células de levedura tratadas com Al e demonstraram que o mutante deficiente de *Hsp150* era sensível ao Al e ao peróxido de hidrogênio. Jung *et al.* (2002) verificaram que os níveis de manganês superóxido dismutases encontrados na levedura de fissão *Sch. pombe* foram regulados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assim como por Al. A expressão do manganês superóxido dismutase WMnSOD1 de trigo em plantas transgênicas de *Brassica napus* melhorou a resistência ao Al (Basu *et al.*, 2001). Por outro lado, a

superexpressão de *HSP150* de *S. cerevisiae* em *Arabidopsis* não foi suficiente para causar a resistência ao stress do Al (Ezaki *et al.*, 2000).

Entre os fatores conhecidos por melhorar os efeitos tóxicos do Al nas plantas está o citrato. O estudo do transporte do Al em células de levedura revelou que o citrato não favoreceu a entrada do Al nessas células (Rao e Easwaran, 1997). Anoop *et al.* (2003) demonstraram que a acumulação do citrato e a tolerância do Al em *S. cerevisiae* podem ser controladas pela manipulação dos genes que codificam enzimas do ciclo do ácido triacarboxílico, como citrato sintase, aconitase e isocitrato desidrogenase. Além disso, tanto *S. cerevisiae* quanto células de canola superexpressando uma citrato sintase mitocondrial indicaram uma tolerância realçada ao Al.

A levedura também provou ser útil como um sistema heterólogo de expressão para identificação e caracterização de genes de resposta ao Al em plantas. Fosfatidilserina sintase (*TaPPS1*) foi isolada da biblioteca do cDNA de trigo para analisar se sua habilidade de conferir resistência ao Al era aumentada quando expressada em levedura (Delhaize *et al.*, 1999). A análise de *Northern blot* confirmou a indução *TaPPS1* sob estresse de Al no ápice da raiz. Entretanto, a superexpressão *TaPPS1* em plantas de tabaco não foi suficiente para melhorar sua tolerância ao Al. No estudo de Ezaki *et al.* (1999) onze genes induzidos por Al em planta foram introduzidos na levedura. Entretanto, somente dois deles, *AtBCB* (proteína ligante de cobre de *Arabidopsis*) e *NtGD1* (inibidor da dissociação de GDP de tabaco), conferiram resistência ao Al quando expressos em levedura. Notavelmente, os mesmos dois genes aumentaram a tolerância do Al em *Arabidopsis*.

### **2.6.2 Levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe***

A levedura de fissão *Sch. pombe* constitui um modelo excelente para estudar o ciclo e a morfologia celular. Recentemente a espécie começou a ser utilizada como um sistema genético para o estudo da tolerância do Al (Lobão, 2005; Rangel, 2005). Os resultados preliminares indicaram que o crescimento da levedura de fissão foi reduzido durante o tratamento do Al em pH ácido. A análise da microscopia de imuno-fluorescência indireta revelou que o Al danifica a citocinese, levando à formação de células longas multi-nucleadas, multi-septadas,

com distribuição alterada de microtúbulos (Façanha e Okorokova-Façanha, 2004). Mudanças na organização microtubular do *Nicotiana tabacum* e *Triticum turgidum* promovidas pelo Al, sugerem que o citoesqueleto é um local alvo da toxicidade do Al em plantas e em levedura de fissão (Schwarzerova *et al.*, 2002; Frantzios *at al.*, 2000).

Em resumo, os dados indicam que leveduras e plantas compartilham mecanismos comuns de tolerância ao Al, mas diferem em alguns aspectos da resposta celular ao Al. É possível que os mecanismos específicos exibidos por plantas e por leveduras tenham sido adquiridos separadamente por estes organismos após a divergência evolucionária. Uma identificação adicional de genes regulados por Al em leveduras parece ser muito útil para a compreensão dos mecanismos que medeiam a tolerância do Al nas plantas. Existem mutantes para todos os genes de levedura de brotamento, tornando possível a análise imediata da sensibilidade ao Al por estes mutantes, mas falta a identificação de genes induzidos pelo Al tanto em leveduras como em plantas. As leveduras podem também ser muito úteis como modelo para o estudo de outros fungos que podem afetar diretamente a produtividade da planta sob o stress do Al, tal como a micorriza. A outra vantagem de usar a levedura como um modelo consiste em progressos recentes na genômica das leveduras (Gasch, 2002). Um desafio adicional seria uma análise genômica ampla da expressão de genes durante a exposição ao Al e uma comparação dos perfis entre estes estresses para o discernimento de genes Al específico.

## **2.7 *Yarrowia lipolytica***

*Yarrowia lipolytica* é um fungo hemiascomiceto, pertencente à família Dipodascaceae. É uma espécie das chamadas leveduras “não-convencionais”, cuja pesquisa científica e tecnológica está em plena ascensão. Consiste em um interessante objeto de estudo para a pesquisa básica devido às várias lacunas existentes no conhecimento de seu metabolismo, diferentemente do que ocorre com as leveduras convencionais *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Paralelamente, seu estudo também tem atraído grande interesse na área biotecnológica por possuir a capacidade de excretar

diversos metabólitos em grande quantidade – ácidos orgânicos e proteínas extracelulares – sendo muito usada para superexpressão e secreção de proteínas específicas (Barth e Gaillardin, 1997).

Dujon *et al.* (2004) realizaram a comparação e o seqüenciamento completo de quatro hemiascomicetos: *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii* e *Y. lipolytica*. Eles foram selecionados com base em suas posições filogenéticas e seu interesse específico como patógenos humanos, ou como leveduras de importância industrial ou ambiental. Foi visto que *Y. lipolytica* difere das leveduras convencionais, como *S. cerevisiae* e *Sch. pombe*, no que diz respeito a sua evolução filogenética, fisiologia, genética e biologia molecular (Esquema 1).

*Y. lipolytica* tem como nicho substratos ricos em lipídios e proteínas, mas a grande maioria das cepas foi isolada do solo, de rede de tratamento de esgoto e de ambientes contaminados com óleos. Apresenta vigoroso crescimento em diferentes valores de pH e apesar de ter crescimento ótimo a 30 °C, também é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura entre 5 e 32 °C (Barth e Gaillardin, 1997).

*Y. lipolytica* produz lipase, enzima que apresenta grande interesse para o uso em indústria de couro ou de queijos (German patent DD-272867). É uma levedura única na habilidade de produzir e excretar no meio uma variedade de ácidos orgânicos (AOs) incluindo o citrato (Chernyavskaya *et al.*, 2000; Finogenova *et al.*, 2002).

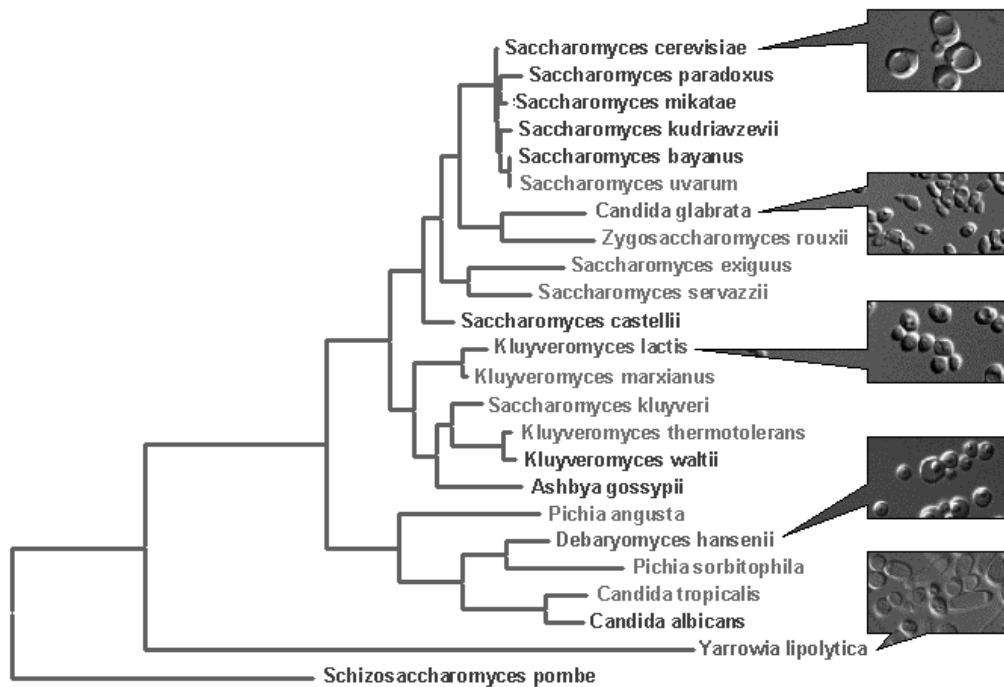
*Y. lipolytica* é um fungo dimórfico, originalmente classificado como *Candida lipolytica*. Pode ser encontrada na natureza sob três diferentes morfologias: levedura, pseudo-hifa (cadeia de células alongadas com constrições visíveis posicionando o septo) e hifa (filamentos lineares sem constrições visíveis).

Em *Y. lipolytica*, o micélio é formado por uma hifa de 3 a 5 µm de largura e alguns µm de comprimento. Células apicais podem exceder 100 µm de comprimento enquanto os segmentos podem ser de 50 a 70 µm. Há apenas um único núcleo por segmento. Os septos mostram um poro central incomum para outras leveduras, com o retículo endoplasmático estendendo-se de um segmento ao seguinte (Barth e Gaillardin, 1997). A proporção de morfologias encontrada na cultura depende da cepa utilizada. Certas condições são conhecidas por causar uma formação preferencial de células de levedura, ou induzir o desenvolvimento

de micélios. Perez-Campo e Domínguez (2001), observaram que a transição levedura-hifa em meio líquido foi obtida utilizando 1% de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) ou 4% de Soro Albumino Bovino (SAB) como fonte de carbono. Além disso, o soro também foi capaz de induzir um crescimento invasivo em meio sólido. Szabo e Štofáníková (2002) utilizando 0,05% de amônio e 5% de peptona como fontes de nitrogênio no meio de cultivo, demonstraram que estes são fortes indutores de hifa, tanto em meio líquido quanto sólido. Ruiz-Herrera e Sentandreu (2002) observaram que o estresse anaeróbico também é capaz de induzir a formação de hifa, assim como fontes de carbono (1% de glicerol) e nitrogênio (0.5% de amônio e glutamina). Kawasse *et al.* (2003) observaram aumento significativo tanto na formação de hifas como no comprimento destas em *Y. lipolytica* submetidas a estresse térmico e oxidativo.

A capacidade de mudança na morfologia entre levedura, pseudo-hifa e hifa é comumente considerada necessária para virulência de fungos patógenos de humanos, entretanto a morfologia considerada mais bem sucedida para o desenvolvimento desta virulência permanece incerta. Em *C. albicans*, pseudo-hifas e hifas têm demonstrado ser mais invasivas, em ensaios *in vitro*, podendo promover uma penetração em tecidos durante a infecção, tornando-se mais importantes para a colonização de órgãos. Porém, leveduras poderiam ser mais eficientes na disseminação através da corrente sanguínea (Berman *et al.*, 2004).

Por não ser considerada patogênica, *Y. lipolytica* representa um excelente modelo alternativo para o estudo de fatores que regulam a transição morfogênica, diferentemente de *Candida albicans*. Recentemente *Y. lipolytica* foi apontada como um organismo auxiliar no desempenho do fungo micorrízico arbuscular, resultando na promoção do crescimento vegetal (Vassilev *et al.*, 2001; Sudbery *et al.*, 2004). Entretanto, as bases desse efeito benéfico para o fungo tampouco foram ainda exploradas.



**Esquema 1.** Evolução dos Hemiascomicetos. As imagens mostram os hemiascomicetos de seqüência genética completamente seqüenciada e comparada. Fonte: <http://cbl.labri.fr/Genolevures/elt/YALI>



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Estudar o efeito do Al sobre o cultivo e o desenvolvimento de *Yarrowia lipolytica* com intuito de validar o uso dessa levedura como modelo de estudo de tolerância e toxicidade do Al.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do Al sobre o cultivo e a morfologia de *Y. lipolytica*;
- Avaliar o efeito do Al sobre o transporte de H<sup>+</sup> em vesículas de membranas de *Y. lipolytica*;
- Avaliar o efeito do Al sobre o transporte de Ca<sup>2+</sup> em células de *Y. lipolytica*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Microrganismo**

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

### **4.2 Meios de cultura**

#### **4.2.1 Para cultivo em meio líquido**

*Y. lipolytica* foi propagada em meio rico YED (1% extrato de levedura, 1% glicose) suplementado com 0,05% de uracila, adenina, leucina, lisina, e arginina. O pH da cultura foi ajustado para 4,5 com HCl. O meio foi autoclavado a 1 atm por 15 min (121 °C).

#### **4.2.2 Manutenção**

Para cultivo em meio sólido YED, foi acrescido 2% de ágar. Como forma de esterilizar os meios de cultura, estes foram submetidos a uma pressão de 1 atm (121 °C), por 15 min na autoclave. O meio sólido foi vertido em placas de Petri

(esterilizadas), no fluxo laminar, após solidificação as placas foram mantidas em estufa a 30 °C por 24 h, a fim de obter-se um controle de esterilidade.

Para a manutenção da cepa uma alçada de uma de *Y. lipolytica* foi retirada de uma cultura estoque e semeada em superfície de meio sólido, sendo as placas incubadas a 30 °C por 3 dias e estocada a 7 °C. As culturas eram renovadas (ou repicadas) a cada três meses.

### **4.3 Condições de cultivo**

A levedura *Y. lipolytica* foi cultivada no meio YED pH 4,5 contendo 0,5 e 1,0 mM de alumínio de potássio,  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ . Uma alíquota desta pré-cultura foi transferida em frascos Erlenmeyers para meio YED de modo que a absorbância inicial a 600 nm fosse igual a 0,01. A proporção volume de meio de cultura para volume do frasco foi 1:5, proporcionando aeração. O crescimento da cultura foi acompanhado através de leituras da  $A_{600}$  em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1203).

As células foram inoculadas em meio YED pH 4,5 e incubadas em agitador orbital (Inova 4300 New Brunswick Scientific), a 250 rpm a 30 °C até a fase logarítmica do crescimento. As culturas de células foram submetidas a duas condições: uma condição controle (sem adição de Al) e outra condição de estresse com 1 mM  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$

### **4.4 Isolamento de membranas celulares de *Y. lipolytica***

As células foram cultivadas na presença e na ausência de 1 mM de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  a 30 °C sob agitação (250 rpm) até atingirem 6 unidades. As células foram transferidas para os tubos de centrífuga e coletadas. Posteriormente, as culturas incubadas e não-incubadas com  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ , foram lavadas com água destilada e centrifugadas a 5000 rpm ( $4000 \times g$ ) por 5 min a 4°C. A massa úmida das células foi determinada. O isolamento de esferoplastos e a obtenção de membranas celulares foram realizados de acordo com a técnica descrita por Okorokov e Lehle (1998). Sucintamente, as células foram homogenizadas antes de serem submetidas à quebra da parede celular, levando à formação dos

esferoplastos. Foi adicionado para cada 1 g de células, 5 mL de tampão de esferoplastos (1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris, pH 7,4), 10 mg de enzima lítica de *Trichoderma* e 12,5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol. Esta suspensão celular foi incubada a 37 °C sob fraca agitação. A formação de esferoplastos foi monitorada através da determinação da  $A_{600}$ . A seguir, a suspensão de células/esferoplastos foi resfriada no gelo e aplicada cuidadosamente sobre uma solução de *cushion* (1,4 M de Sorbitol) e centrifugadas a  $4.000 \times g$  por 5 min para sedimentação dos esferoplastos. Os esferoplastos foram resuspensores em tampão de lise (12,5% - sacarose, 20 mM MOPS, pH 7,6) contendo inibidores de proteases (1 mM MPSP e 1 mM benzamidina) e homogeneizados. O lisado obtido foi centrifugado a  $4.000 \times g$  por 5 min. O sobrenadante foi transferido para tubos de ultracentrífuga e centrifugado a  $88.000 \times g$  por 45 min a 0 °C, obtendo-se as membranas celulares totais que foram aliquotadas e estocadas a -70 °C.

#### **4.5 Análise das mudanças morfológicas de *Y. lipolytica***

As mudanças morfológicas foram acompanhadas através de observações periódicas em microscópio. O desenvolvimento da cultura foi analisado através de leituras da densidade ótica no aparelho de espectrofotômetro e através da contagem das células em câmara de Neubauer, em intervalos regulares de 3 h.

#### **4.6 Determinação do transporte de $H^+$ em vesículas membranares**

O ensaio para a determinação do transporte de  $H^+$  em vesículas de membranas isoladas de *Y. lipolytica* foi realizado seguindo o protocolo descrito por Okorokov e Lichko (1983) com modificações. O gradiente de  $H^+$  foi monitorado pelo decréscimo da fluorescência da sonda fluorescente, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada com um feixe de  $\lambda$  415 nm e a emissão captada a 485 nm com abertura de 5 nm/10 nm usando fluorímetro (Shimadzu RF 5301 PC). O ACMA contém um grupo amina que funciona como uma base fraca, e assumindo-se que quando não protonado tem capacidade de atravessar livremente a bicamada lipídica das membranas. A protonação da base do grupo

amina limita essa capacidade de movimento transmembranar. Então a sonda distribui-se através da membrana em função da diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas. O meio reacional foi composto de 10 mM de MOPS-Tris pH 6,0, KCl 100 mM, ACMA 3  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM e ATP 1 mM, acrescido de uma suspensão de membranas com volume variando entre 5 e 50  $\mu$ L, dependendo da atividade apresentada, de modo que a amplitude máxima ( $F_{\text{máx}}$ ) não ultrapassasse o valor de 50 %.

Após 3 min de incubação (ou tempo necessário para estabilização da fluorescência), 1 mM ATP pH 7,2 foi acrescido à mistura e o transporte de H<sup>+</sup> foi monitorado. Após um tempo aproximado de 600 seg (ou suficiente para atingir o equilíbrio entre efluxo e influxo de prótons), foi adicionado 0,02 M de NH<sub>4</sub>Cl a fim de parar a reação, desfazendo o gradiente protônico estabelecido (Esquema 2).

Para análise de V e P H<sup>+</sup>-ATPase seguiu-se o mesmo procedimento, adicionando-se inibidores específicos dessas enzimas (11,5  $\mu$ M de concanamicina A e 200  $\mu$ M de vanadato, respectivamente) ao meio de ensaio contendo membranas e pré-incubando por 3 min antes de adição de ATP.

A mudança da fluorescência foi registrada e o gráfico obtido (Esquema 1) foi usado para o cálculo de velocidade inicial e fluorescência máxima seguindo a fórmula:  $V_0 = [F_0 / (F_{\text{máx}} * t)] * 100$ , onde:

$V_0$  : velocidade inicial de formação do  $\Delta$ pH;

$F_0$  : fluorescência dependente de  $V_0$ , em um tempo t, determinada pela extrapolação de uma reta tangente à maior inclinação inicial para o eixo do tempo;

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

t: tempo em minutos;

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

$F_{\text{eq}}$ : fluorescência de equilíbrio, determinado como fluorescência do platô que reflete o equilíbrio entre o influxo e o efluxo de H<sup>+</sup> nas vesículas.

#### 4.7 Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade hidrolítica da H<sup>+</sup>-ATPase de *Y. lipolytica* foi avaliada pela determinação da concentração de fosfato inorgânico liberado pela hidrólise de ATP (Fiske e Subbarow, 1925). Para construção da curva padrão foi utilizada uma

solução de 2  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  armazenada a 4  $^\circ\text{C}$ . Volumes de 50  $\mu\text{L}$  a 950  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foram aplicadas em água destilada até completar um volume de 1 mL. Em intervalos de 30 em 30 seg foi adicionado 2 mL da solução de reação contendo 10% de ácido ascórbico e 0.5% molibdato de amônio. Após exatos 10 min, à temperatura ambiente, foram realizadas leituras em espectrofotômetro Shimadzu UV-1203 a 750 nm.

Para determinação da atividade hidrolítica, 300  $\mu\text{L}$  do meio de reação, contendo 30 mM (MES)-Tris (pH 6,5), 3,75 mM  $\text{MgSO}_4$ , 262  $\mu\text{M}$  molibdato de amônio, 5 mM ATP e 10  $\mu\text{L}$  da preparação de membrana (~ 70  $\mu\text{g}$  de proteína), contendo ou não vanadato (200  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , inibidor específico de  $\text{H}^+$ -ATPase do tipo P da membrana plasmática) foi incubado a 30  $^\circ\text{C}$  por 10 min. A reação foi interrompida através da adição de 700  $\mu\text{L}$  de água destilada gelada e 2 mL da solução de reação contendo 10% de ácido ascórbico e 0,5% molibdato de amônio. Essa mistura foi incubada a 30  $^\circ\text{C}$  por 10 min e a absorbância, a 750 nm, foi determinada em espectrofotômetro. Um volume igual de água destilada (300  $\mu\text{L}$ ) foi utilizada como branco. Os valores obtidos nas determinações deveriam ficar preferencialmente, entre os valores médios estabelecidos na curva padrão.

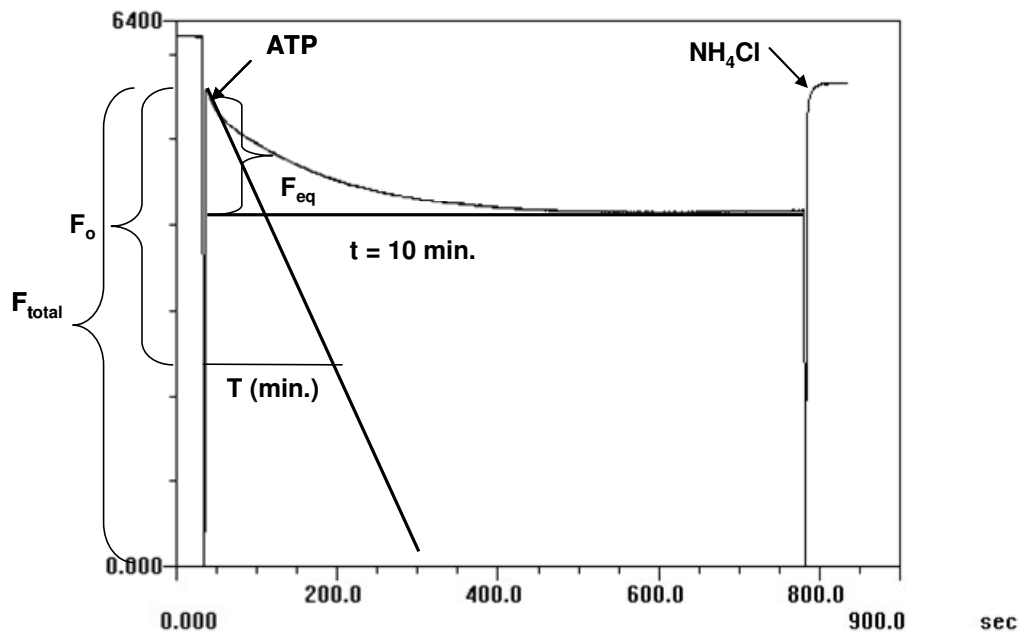
#### **4.8 Determinação do conteúdo de proteína**

O teor de proteína foi determinado pelo método de Bradford (1976). Em um Becker contendo 12 mL de etanol absoluto, devidamente envolto por papel alumínio a fim de evitar a entrada de luz, 28 mg de Coomassie Brilliant Blue G 90 foi adicionado e deixado sob agitação por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 25 mL de ácido ortofosfórico (85 %), e após a total homogeneização, o volume foi completado para 250 mL com água destilada. A solução foi filtrada em papel de filtro por três vezes e armazenada em vidro âmbar na geladeira.

Para construção da curva padrão foi utilizada uma solução de albumina de soro bovino na concentração de 1 mg/mL. Volumes de 2  $\mu\text{L}$  a 20  $\mu\text{L}$  da solução foram misturados em água destilada até completar um volume de 100  $\mu\text{L}$ . Em intervalos de 30 seg foi adicionado 1 mL da solução de Bradford. Após exatos 10 min, à temperatura ambiente, as leituras de absorbância em espectrofotômetro, a 595 nm, foram realizadas.

O conteúdo de proteína foi determinado utilizando-se entre 5 e 15  $\mu\text{L}$  de suspensão de membranas, em volume para 100  $\mu\text{L}$  com água destilada e adicionando-se 1 mL da solução de Bradford em intervalos de 30 seg. Após exatos 10 min, à temperatura ambiente, procedeu-se às leituras de absorbância, em espectrofotômetro, a 595 nm, obedecendo ao mesmo intervalo de tempo utilizado anteriormente.

O volume de suspensão de membranas utilizado pode variar de acordo com o conteúdo de proteína. Os valores obtidos nas dosagens deveriam ficar preferencialmente, entre os valores médios estabelecidos na curva padrão.



$$\text{Velocidade inicial} = V_0 = [F_0 / (F_{\text{total}} * T)] * 100$$

$$\text{Amplitude máxima} = \Delta F_{\text{max}} = F_{\text{eq}} / F_{\text{total}} * 100$$

**Esquema 2.** Determinação de velocidade inicial ( $V_0$ ) e amplitude máxima ( $F_{\text{máx}}$ ) do transporte de  $\text{H}^+$ . Na presença de ATP a fluorescência do ACMA diminui, demonstrando a formação do gradiente do transporte de  $\text{H}^+$  nas vesículas de membranas. Ao atingir o estágio máximo e de equilíbrio, adiciona-se  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , que desfaz o gradiente protônico.

#### **4.9 Análise do efeito do Al na alteração do pH do meio sólido de cultivo e em colônias de *Y. lipolytica***

Para visualizar uma possível alteração do pH em colônias e no meio em torno de colônias, as células de *Y. lipolytica* foram plaqueadas com ajuda de pérolas de vidro (para que as colônias ficassem isoladas) em meio YED pH 4,5 na ausência ou presença de 1 mM de  $\text{Al}(\text{SO}_4)_2$  e mantidas na estufa a 30 °C por 3 dias. Após o aparecimento das colônias, as placas foram retiradas da estufa e uma fina camada de 0,7 % agarose contendo 0,015% de púrpura de bromocresol pH 4,5 (indicador de pH) foi vertida sobre as colônias. Após 10-15 min a alteração da coloração pôde ser observada e o valor do pH pôde ser estimado através de uma escala colorimétrica.

#### **4.10 Determinação de transporte de cálcio em células de *Y. lipolytica***

O ensaio de captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em células vivas de *Y. lipolytica* foi realizado seguindo o protocolo descrito por Cunningham e Fink (1994) com modificações. As células foram cultivadas na presença e na ausência de 0,5 mM  $\text{Al}(\text{SO}_4)_2$  até atingirem o início da fase logarítmica (0,5-1,0  $\text{OD}_{600}/\text{mL}$  - equivalente a uma concentração de  $1,4 \times 10^6$  células/mL), aproximadamente 12 h em 20 mL de meio. Alíquotas de 2 mL de suspensão foram distribuídas em tubos com adição posterior de 5  $\mu\text{L}$  de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (110,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 2,5 mCi/mL, Amersham Pharmacia). Após adição, as amostras foram incubadas a 30 °C. A captação de cálcio foi interrompida nos tempos de 1, 5, 15, 30, 90 e 180 min, transferindo 100  $\mu\text{L}$  da reação para aproximadamente 20 mL do tampão de lavagem (10 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM MES-NaOH pH 6,5) gelado. As alíquotas foram filtradas em filtros Wathaman GF/F por sistema a vácuo. Depois os filtros foram secos e colocados em tubos de cintilação contendo aproximadamente 4 mL de líquido de cintilação (27 mM PPO, 55  $\mu\text{M}$  POPOP dissolvidos em 1 L de tolueno) e a radioatividade associada aos filtros, e conseqüentemente às células, foi quantificada por contagem em meio de cintilação usando contador Packard. A acumulação de cálcio em células foi normalizada por densidade ótica da cultura ( $A_{600}/\text{mL}$ ) usada no experimento.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeito do Al no cultivo e na morfologia de *Yarrowia lipolytica*

Para analisar se o Al era capaz de afetar o cultivo de *Y. lipolytica*, as células foram cultivadas em meio YED pH 4,5 contendo 0,5 e 1 mM de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ . Todas as culturas foram inoculadas de forma que o experimento iniciasse com 0,01 unidade ( $A_{600}$ ).

Na cultura de *Y. lipolytica* sem Al (controle), a divisão celular teve início após uma fase lag de aproximadamente 6 h. A saturação foi atingida após 26 h. A presença de 0,5 mM e 1 mM de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  não afetou a fase lag nem a fase logarítmica, mas a absorbância máxima atingida pela cultura foi aproximadamente 10% menor do que a atingida na cultura controle para ambas as concentrações (Figura 1A).

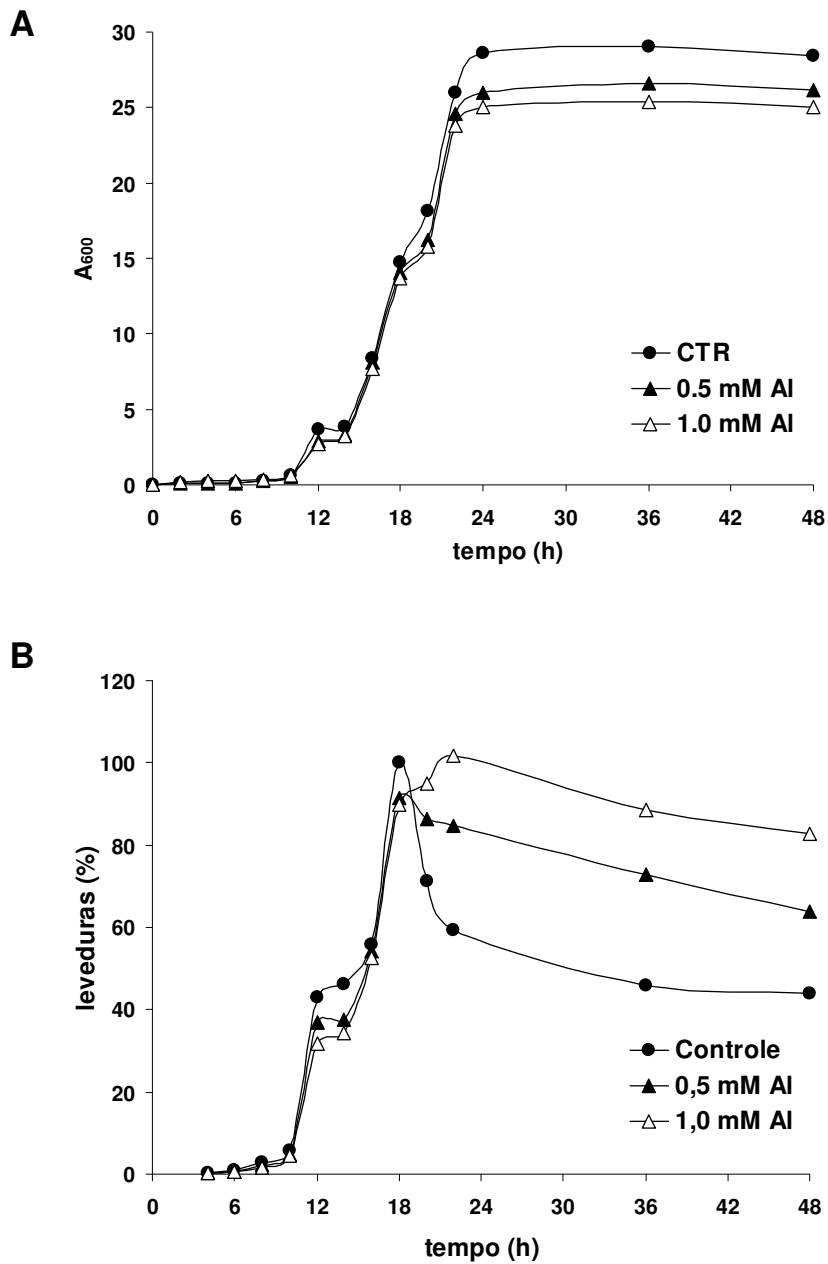
A morfologia celular foi analisada por microscopia ótica na qual foi possível observar que a transição levedura-hifa ocorreu após 18 h na cultura controle. Corroborando com esta observação, o número de células em forma de levedura atingiu um pico máximo neste ponto seguido por um declínio refletindo a aparição de formas filamentosas compostas de pseudo-hifas e hifas (Figura 1B, Figura 2A). Curiosamente, quando altas concentrações de Al foram adicionadas ao meio, foram observadas mudanças na morfologia celular. A cultura de *Y. lipolytica* exposta a 0,5 mM de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  exibiu uma diminuição significativa de formas filamentosas após 24 h, em comparação com a cultura controle (Figura 1B, Figura 2B). Com a concentração de 1 mM de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ , a transição levedura-

hifa só teve início após 24 h. Entretanto, não foi possível observar a formação de hifas verdadeiras, pois a maioria das células dessa cultura permaneceu em forma de levedura e somente algumas pseudo-hifas foram formadas (Figura 1B, Figura 2C).

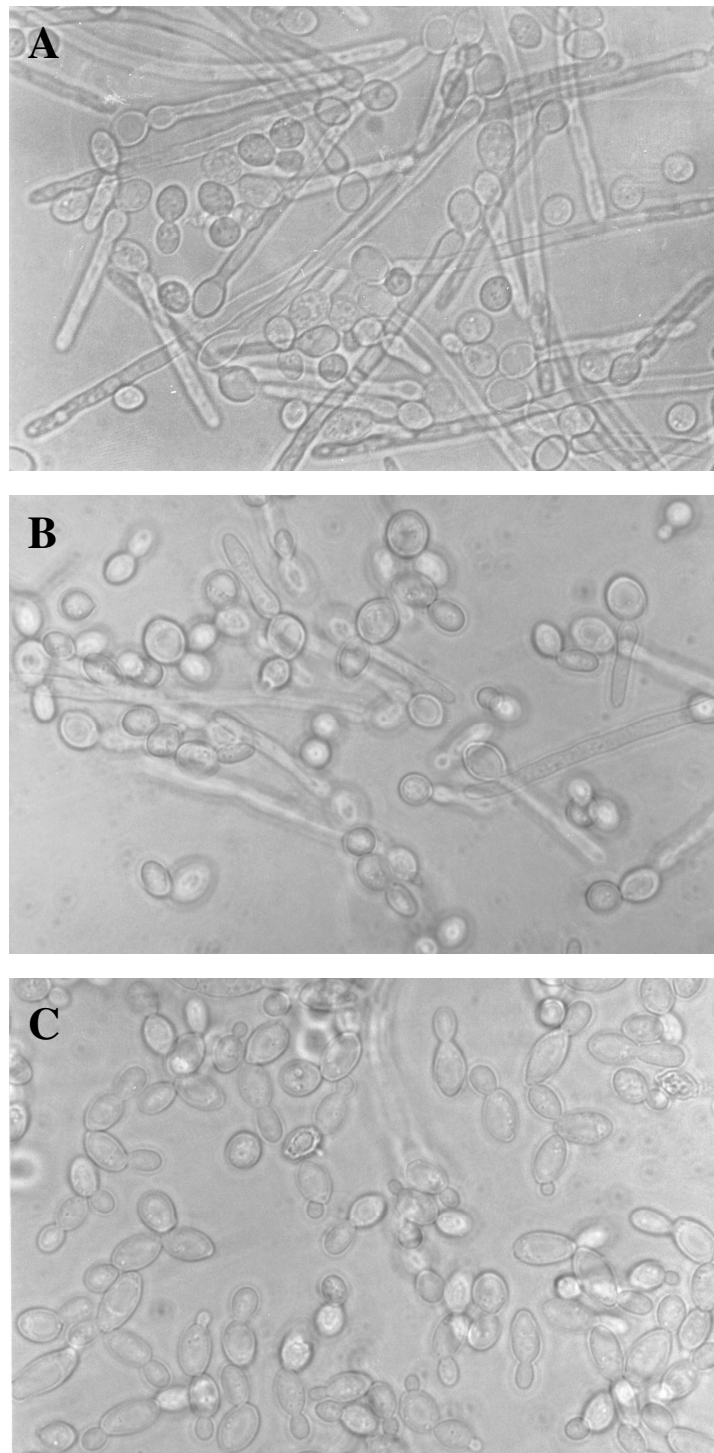
## 5.2 Análise do efeito do Al na atividade de H<sup>+</sup>-ATPase

Para verificar o efeito do Al na atividade de H<sup>+</sup>-ATPase foram isoladas membranas totais de células de *Y. lipolytica* cultivadas ou não com 1 mM de AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. A Figura 3A mostra que a adição de ATP às vesículas de membranas de células controle promoveu um decaimento da fluorescência, que foi inibida em 80% por 200 µM de vanadato, indicando que o transporte de H<sup>+</sup> em membranas de *Y. lipolytica* foi principalmente mediado pela H<sup>+</sup>-ATPase do tipo P de membrana plasmática. A mesma porcentagem de inibição por vanadato foi obtida em vesículas de membranas isoladas de células tratadas com Al. Entretanto, a F<sub>máx</sub> tanto do transporte total quanto do transporte vanadato-sensível foi 1,8 vezes maior do que em membranas controle. A H<sup>+</sup>-ATPase foi portanto, estimulada pelo Al (Figura 3B, Tabela 1).

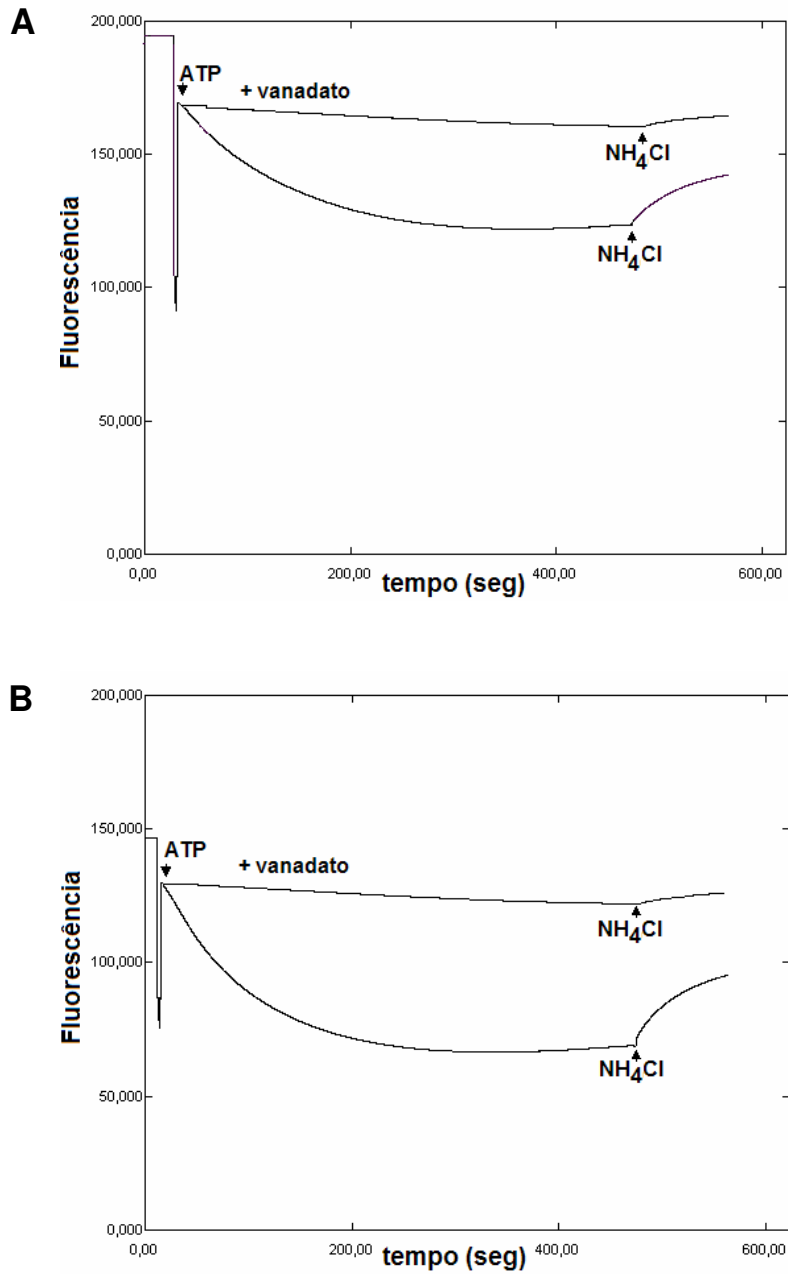
A atividade hidrolítica da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática também foi analisada. A comparação das células controle de *Y. lipolytica* com as células tratadas com Al demonstrou uma atividade ATPásica vanadato-sensível, no qual 70% inibição foi obtida. Em contraste com a atividade do bombeamento de H<sup>+</sup>, somente um pequeno aumento da hidrólise de ATP foi observado em vesículas de membranas isoladas de células cultivadas na presença de Al (1,2 vezes, Tabela 1).



**Figura 1.** Efeito do Al sobre *Y. lipolytica* JM-12. (A) Células foram cultivadas em meio YED pH 4,5 na ausência (●) ou na presença (▲, △) de  $AlK(SO_4)_2$ . (B) Número de células de levedura foi contado em cada ponto temporal e o valor máximo foi considerado 100%. Os valores representam uma média de 3 experimentos.



**Figura 2.** Análise do efeito do Al na transição morfológica de *Y. lipolytica* JM-12. A morfologia celular foi examinada após 24 h de cultivo na ausência (A) ou na presença de 0,5 mM  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  e 1,0 mM  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  (B e C, respectivamente) em meio YED pH 4,5.



**Figura 3.** Efeito do transporte de  $H^+$  em *Y. lipolytica*. As vesículas de membranas celulares foram isoladas de células cultivadas na ausência (A) ou na presença (B) de 1 mM de  $AlK(SO_4)_2$  e utilizadas para determinação da formação do  $\Delta pH$ .

A análise do transporte de próton ( $F_{m\acute{a}x}$ ) e hidrólise de ATP vanadato-sensível foi realizada em membranas totais isoladas de células cultivadas na presença de 1 mM  $AlK(SO_4)_2$  por 18 h. A determinação da  $F_{m\acute{a}x}$  foi realizada utilizando os dados da Figura 3 e conforme o item 4.6. Os valores são representativos de uma média de três experimentos

**Tabela 1.** Efeito do Al sobre a atividade de  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática de *Y. lipolytica*.

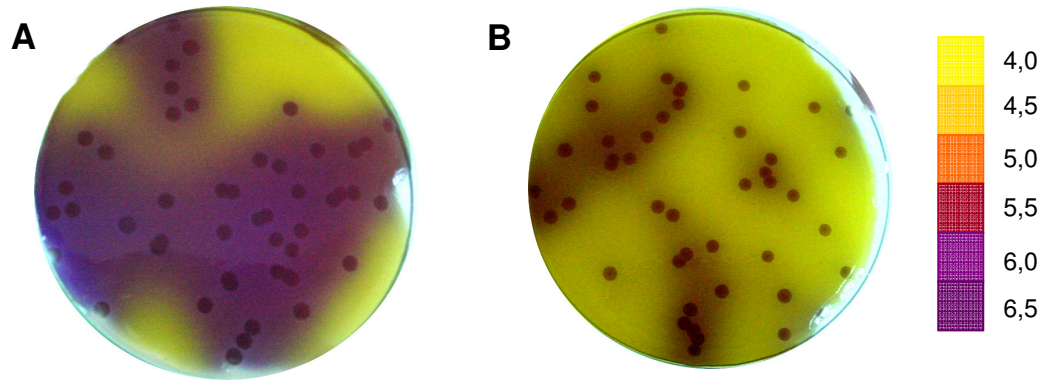
	$F_{m\acute{a}x}$ (%)	Hidrólise de ATP ( $nmol\ mg^{-1}\ min^{-1}$ )
<b>Controle</b>	$687 \pm 25$	$95 \pm 10$
<b>1,0 mM <math>AlK(SO_4)_2</math></b>	$1258 \pm 27$	$120 \pm 18$

### 5.3 Efeito do Al no pH do meio sólido de crescimento de *Y. lipolytica*

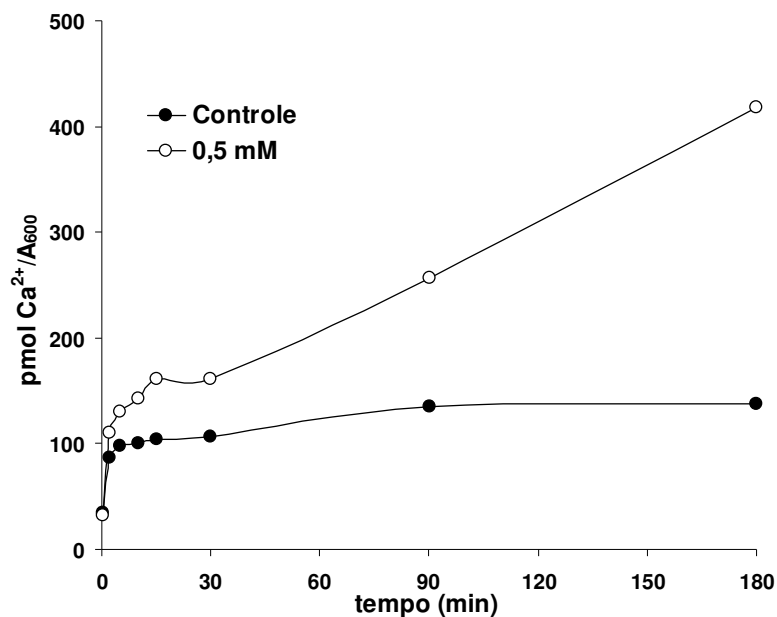
Para confirmar os dados de estimulação da  $H^+$ -ATPase pelo Al, o pH do meio de crescimento das colônias de *Y. lipolytica* foi indiretamente indicado pelo púrpura de bromocresol. A estimativa do pH foi realizada através de comparação com a escala de cor no qual, púrpura de bromocresol que tem coloração amarelada em pH ácido (4,5), sofre modificação para magenta/roxo conforme o aumento do pH. Em 15 min após a adição de púrpura bromocresol já foi possível observar a modificação na coloração das colônias e do meio. A área em torno das colônias crescidas na ausência de Al ficou roxa, indicando uma alcalinização do meio (Figura 4A). Quando as colônias foram crescidas na presença de 1,0 mM  $AlK(SO_4)_2$  a coloração roxa foi atenuada, indicando uma maior acidificação mediada por células de *Y. lipolytica* (Figura 4B).

### 5.4 Análise da captação de $^{45}Ca^{2+}$ por células de *Y. lipolytica*

Para avaliar o efeito do Al no funcionamento de canais de  $Ca^{2+}$  presentes na membrana plasmática foi feita análise da captação de  $^{45}Ca^{2+}$  por células intactas de *Y. lipolytica*. As células foram cultivadas na ausência de Al. Foi possível observar que a adição do 0,5 mM  $AlK(SO_4)_2$  no meio de cultivo ocasionou uma captação de  $^{45}Ca^{2+}$  cerca de 4 vezes maior do que nas células controle (Figura 5) ao fim de 3 h.



**Figura 4.** Efeito do Al na alteração do pH em colônias de *Y. lipolytica*. As células de *Y. lipolytica* foram plaqueadas em meio YED com pH 4,5 na ausência (A) ou na presença de 1 mM  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  e mantidas a 30 °C até obtenção de colônias. As placas foram cobertas por uma fina camada de agarose contendo o indicador de pH bromocresol púrpura (0,015%). Resultado representativo de três experimentos.



**Figura 5.** Efeito do Al na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em células intactas de *Y. lipolytica*. As células foram cultivadas em meio YED pH 4,5 na ausência de Al por 12 h antes da adição de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e 0,5 mM  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ . Os dados são representativos de quatro experimentos.

## 6. DISCUSSÃO

As leveduras têm demonstrado ser um excelente modelo para isolamento e caracterização de genes de resposta a diversos sinais ambientais, dentre eles o estresse oxidativo e salino e ainda os causados por metais (Serrano, 1996, Avery, 2001). Na última década, a levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae* emergiu como modelo de estudo de mecanismos de toxicidade e tolerância ao Al.

A toxicidade do Al foi demonstrada em diversos sistemas biológicos, sendo considerada um fator limitante para a produtividade de muitas culturas vegetais, especialmente nos trópicos no qual a maioria dos solos é ácida. Os efeitos da toxicidade do Al também são observados em bactérias e fungos (Zel *et al.*, 1993) e algumas patologias humanas podem estar associadas com a contaminação pelo Al. Foi demonstrado que assim como em plantas, o Al também causava inibição do crescimento de *S. cerevisiae* (MacDiarmid e Gardner, 1996; Schott e Gardner, 1997, Ezaki *et al.*, 1998).

Neste trabalho, foi analisado o efeito do Al no fungo dimórfico *Yarrowia lipolytica*. Foi possível observar que o tratamento com Al não inibiu o crescimento de *Y. lipolytica* mesmo com a concentração de 1 mM (Figura 1), indicando que este ascomiceto é mais resistente ao Al do que *S. cerevisiae* ou *Sch. pombe*. Em vários sistemas biológicos a concentração de 1 mM de Al é considerada fatal. Em plantas, a concentração suportável de Al é no máximo de 0,1 mM (Blancaflor *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 2001; Rengel *et al.*, 2002 e Hirano *et al.*, 2006), para outras leveduras, como por exemplo *Sch. pombe*, a concentração de 0,5 mM inibe o crescimento em 37% (Lobão, 2005). *Y. lipolytica* é conhecida por sua capacidade



de produzir ácidos orgânicos (Barth e Gaillardin, 1997). Desta forma, a resistência de *Y. lipolytica* ao tratamento com Al pode ser devido a sua capacidade de produção de ácidos orgânicos que são capazes de se complexar com o Al, um processo descrito para plantas (Kochian et al., 2004; Shen et al., 2005). Além disso, foi sugerido que o efluxo de citrato é realizado mais por sistemas de transporte secundário da membrana plasmática do que pelo vacúolo (Kulakovskaya et al., 1993). Seria interessante determinar até onde a secreção de ácidos orgânicos é induzida pelas células de *Y. lipolytica* tratadas com Al.

Apesar de não interferir no cultivo de *Y. lipolytica* o Al afeta drasticamente sua morfogênese (Figura 2). O crescimento das hifas foi inibido no meio contendo Al, indicando que possivelmente o Al pode interferir na transdução de sinal responsável pela formação das hifas. Diversos estudos já demonstraram que a transição levedura-hifa é obtida em resposta a vários sinais ambientais, tais como, pH (Ruiz-Herrera e Sentandreu, 2002; Szabo e Štofánikova, 2002; Kawasse et al., 2003), temperatura, composição do meio de cultivo (Pérez-Campo e Domínguez 2001; Szabo e Štofánikova, 2002), entre outros, levando à expressão de genes hifa-específicos por meio da regulação de cascatas de sinalização (Kadosh e Johnson, 2005). A transição dimórfica é controlada pelo pH do ambiente, sendo a formação de células em forma de levedura favorecida pelo pH ácido enquanto a formação das formas filamentosas pelo pH próximo à neutralidade ou alcalino. A transição entre duas formas celulares (levedura e hifa) é comum em alguns fungos e parece ser um fator determinante para a patogenicidade dos mesmos (Phan et al., 2000; Bensen et al., 2002). O envolvimento da H<sup>+</sup>-ATPase na morfogênese e no crescimento filamentoso de *Y. lipolytica* ainda não foi examinado. Trabalhos anteriores apontam a H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática como um possível fator para a morfogênese de *C. albicans* (Monk, 1993).

Neste trabalho foi visto que 1 mM Al estimula em aproximadamente 85%, o transporte de H<sup>+</sup> mediado por P H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática (Figura 3, Tabela 1). Em plantas, o Al pode causar tanto um efeito inibitório quanto estimulatório na atividade das H<sup>+</sup>-ATPases, dependendo da concentração utilizada. Foi observado em plantas de milho que o Al é capaz de promover a estimulação da H<sup>+</sup>-ATPase em concentrações mais baixas do que as que iniciam a fitotoxicidade (Façanha e Okorokova-Façanha, 2002; Shen et al., 2005). No caso de *Y. lipolytica*, o Al exerce um efeito diferencial na atividade das bombas de H<sup>+</sup>, a qual é mais efetiva no aumento do transporte de H<sup>+</sup> do que na hidrólise de

ATP, indicando um aumento no acoplamento da H<sup>+</sup>-ATPase (Tabela 1). Sendo assim, possivelmente, o efeito do Al na H<sup>+</sup> ATPase de *Y. lipolytica* envolve uma regulação pós-traducional envolvendo fosforilação, como demonstrado em bombas de H<sup>+</sup> de milho (Shen *et al.*, 2005). Esses resultados possibilitam sugerir que alterações no transporte de H<sup>+</sup> na membrana plasmática podem estar envolvidas na sinalização pH-dependente necessária para a formação de hifas. A membrana plasmática em fungos é energizada através da geração de um gradiente eletroquímico de prótons a partir da ação de H<sup>+</sup> ATPases do tipo P. Durante a síntese de ácidos orgânicos, uma grande quantidade de H<sup>+</sup> é produzida e removida da célula vegetal por bombas protônicas (Sze *et al.*, 1999). Desta maneira, a liberação de citrato pode estar relacionada com liberação de H<sup>+</sup>. Foi demonstrado que a liberação de citrato foi concomitante ao efluxo de H<sup>+</sup> em células mutantes de cenoura (*Daucus carota*), na qual um elevado nível de atividade de H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática foi encontrado (Ohno *et al.*, 2003). O aumento da extrusão de H<sup>+</sup> em resposta ao tratamento com o Al em células de *Y. lipolytica* pode induzir mudanças na energização da membrana, tornando a superfície celular e o meio extracelular mais ácidos do que nas células não cultivadas com Al. Uma menor alcalinização foi observada no meio de crescimento das colônias de *Y. lipolytica* na presença do Al (Figura 4). É amplamente conhecido que leveduras têm a capacidade de acidificar o meio de cultura líquido em detrimento do consumo de glicose. Entretanto, em meio sólido, foi visto que quando atingem a fase estacionária, as colônias de *S. cerevisiae* podem alterar o pH do meio que as envolve passando de pH ácido para quase alcalino (“acid-to-alkali transition”) (Palková *et al.*, 2002). Aumento do pH deve-se à liberação de amônia por colônias e seria um fenômeno semelhante a um “quorum sensing”, em que uma sinalização para as colônias vizinhas é emitida dando início à transição do pH do meio. Neste mesmo estudo, foi visto, por *microarray*, que durante a transição ácido-álcali, a expressão da H<sup>+</sup>-ATPase de PM é inibida, diminuindo a extrusão de H<sup>+</sup> e, conseqüentemente, o pH extracelular. As colônias de *Y. lipolytica* crescidas na presença de Al produziram uma maior acidificação do meio, indicando uma estimulação das bombas de H<sup>+</sup> nestas células que conseguiram manter o pH do meio mais ácido do que nas colônias controle, corroborando com os dados da atividade de H<sup>+</sup>-ATPase obtidos “in vitro”.

Os resultados obtidos, juntamente com os dados encontrados na literatura sobre a importância de um baixo pH do meio extracelular como fator do dimorfismo, sugerem a existência de um sensor de pH na superfície da célula da levedura. É possível que o pH superficial atue como fator chave na transdução de sinal do sensor de pH à fatores de resposta que desenvolvem mudanças transcricionais, levando finalmente à alteração da morfologia. De fato, uma via dependente de pH já foi identificada em *S. cerevisiae* e *C. albicans*. A via da proteína Rim 101 é ativada em condições alcalinas e leva ao desenvolvimento de formas filamentosas (Li e Mitchell, 1997; Davis *et al.*, 2000). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nesta transição ainda necessitam ser mais estudados.

Um aumento transiente no pH citoplasmático foi sugerido preceder a transição morfológica em *C. albicans* (Kaur *et al.*, 1988; Stewart *et al.*, 1988). Nossos dados levantam a hipótese de que o pH extracelular bem mais que o intracelular é um sinal para a morfogênese. Isso é consistente com a idéia de que a alcalinização citoplasmática mediada pela H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática pode ser necessária para o desenvolvimento contínuo dos tubos germinativos de *C. albicans* apesar deste processo ser pouco provável para ser determinante primário da morfogênese (Monk *et al.*, 1993).

O transporte de Ca<sup>2+</sup> para dentro das células é mediado por canais de membrana. A habilidade do Al em reduzir a entrada de Ca<sup>2+</sup>, nas plantas, já foi documentada (Huang *et al.*, 1992; Rengel e Elliot, 1992), podendo inclusive causar deficiência desse cátion (Foy, 1988). Além disso, foi verificado que a inibição da entrada de Ca<sup>2+</sup> induzida pelo Al é mais afetada em cultivares de trigo sensíveis ao alumínio do que naquelas tolerantes (Huang *et al.*, 1992). Essas observações sugerem que a inibição do crescimento da raiz induzida pelo alumínio pode ser promovida, pelo menos em parte, pela inibição do transporte de Ca<sup>2+</sup> e conseqüentemente alterações na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub>.

Previamente, Lobão (2005) observou o bloqueio da captação de Ca<sup>2+</sup> em células de *Sch. pombe* na presença de 0,5 mM de AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Além disso, o cultivo com Al foi capaz de causar 37% de inibição da cultura e a formação de células de *Sch. pombe* aberrantes, longas e multi-septadas. Contrariamente, adição do Al diretamente às células de *Y. lipolytica* causou um aumento significativo na captação de cálcio, cerca de 4 vezes (Figura 5), em comparação com células não tratadas. Em *Sch. pombe* este aumento foi visto somente após 6

h de exposição ao Al, quando o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  foi duas vezes maior do que nas células não expostas (Lobão, 2005), indicando que primeiramente o alumínio, através de bloqueio de canais de cálcio, pode ter causado um estresse celular, promovendo uma superexpressão de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  encontrados na membrana plasmática como tentativa de recuperar os níveis de cálcio citoplasmático. A levedura de fissão demonstrou ser mais susceptível ao Al, apresentando a alteração da morfologia e do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . *Y. lipolytica*, apesar de ter seu dimorfismo afetado pelo Al, demonstrou ser mais resistente, não tendo uma alteração significativa no seu cultivo e apresentando um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mais elevado em células expostas ao Al. Especula-se que este aumento da captação de  $\text{Ca}^{2+}$  esteja vinculado a essa resistência, no qual por mecanismos ainda desconhecidos, o Al atuaria sobre os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes na MP, causando uma entrada maciça desse cátion e provocando as alterações nos níveis de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ , que interferem com a transdução de sinal  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente responsável pela regulação do ciclo e polaridade celular, entre outras funções. A análise do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  em vesículas de membranas também foi realizada, mas por não demonstrar consistência de dados, não foi apresentada neste trabalho.

A análise do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em células de *Y. lipolytica* cultivadas na presença do Al por um mesmo período de tempo que em experimentos para determinação de atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase é necessária a fim de se poder correlacionar as mudanças da homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  com morfogênese.

## 7. RESUMOS E CONCLUSÕES

Neste trabalho foi verificado o efeito do Al no fungo dimórfico *Y. lipolytica*. Altas concentrações de Al não alteraram o cultivo das células indicando uma parcial resistência ao Al. Sendo assim, *Y. lipolytica* pode ser utilizada como modelo de estudo de tolerância ao Al.

A transição dimórfica levedura-hifa de *Y. lipolytica* foi inibida pelo Al. Desse modo, o sistema Yarrowia × Al pode ajudar na elucidação dos mecanismos celulares que regem a morfogênese envolvida da patogenicidade dos fungos.

O Al estimula a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células de *Y. lipolytica*.

O transporte de  $\text{H}^+$  mediado pela  $\text{H}^+$ -ATPase tipo P de membrana plasmática foi estimulado pelo Al. Desta forma, a enzima pode ser utilizada como marcador bioquímico de tolerância ao Al.

Os dados sugerem que o pH do meio extracelular controlado pela  $\text{H}^+$ -ATPase de membrana plasmática regula a transição dimórfica.

Os dados apontam para a investigação de um possível sensor de pH na membrana plasmática e vias de sinalização associadas, bem como para a investigação da sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada pelo estresse causado pelo Al.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamikova, L., Straube A., Schulz I., Steinberg G. (2004). Calcium signaling is involved in dynein-dependent microtubule organization. *Mol. Biol. Cell.* 15: 1969-1980.
- Ahn, S.J., Sivaguru, M., Osawa H., Chung, G.C., Matsumoto, H. (2001) Aluminum inhibits the H<sup>+</sup>-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiol.* 126: 1381-1390.
- Alcantara-Sanchez, F., Reynaga-Pena, C.G., Salcedo-Hernandez, R., Ruiz-Herrera, J. (2004) Possible role of ionic gradients in the apical growth of *Neurospora crassa*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 86:301-11.
- Alfrey, A.C., LeGendre, G.R., Kaehny, W.D. (1976) The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *New Engl. J. Med.* 294: 184-188.
- Aniol, A. (1990). Genetics of tolerance to aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell). *Plant Soil* 123:223-227.
- Anoop, V.M., Basu, U., Mccammon, M.T., Mcalister-Henn, L., Taylor, G.J. (2003) Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol.* 132: 2205-2217.
- Archambault, D.J., Zhang, G., e Taylor, G.J. (1996) A comparison of the kinetics of aluminum (Al) uptake and distribution in roots of wheat (*Triticum aestivum*)

using different aluminum sources: a revision of the operational definition of symplastic aluminum. *Physiol. Plant.* 98: 578–586.

Avery, S.V. (2001) Metal toxicity in yeasts and role of oxidative stress. *Adv. Appl. Microbiol.* 49: 111-142.

Avrova, S.V., Borovikov, Y.S., Efimova, N.N., Chacko, S. (1998) Calcium modulates conformational changes in F-actin induced by smooth muscle heavy meromyosin. *FEBS Lett.* 430:266-268.

Bala Gupta, V., Anitha, S., Hegde, M.L., Zecca, L., Garruto, R.M., Ravid, R., Shankar, S.K., Stein, R., Shanmugavelu, P. e Jagannatha Rao, K.S. (2004) Aluminium in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad? *Cell. Mol. Life Sci.* 62:143-158.

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

Basu, U., Good, A.G., Aung, T., Slaski, J.J., Basu, A., Briggs, K.G., e Taylor, G.J. (1999) A 23-kDa, root exudate polypeptide co-segregates with aluminum resistance in *Triticum aestivum*. *Physiol. Plant.* 106: 53-61.

Basu, U., Good, A.G., e Taylor, G.J. (2001) Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium. *Plant Cell Environ.* 24: 1269-1278.

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

Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-325.

Bertazzon, A., G. H. Tian, A. Lamblin, e T. Y. Tsong. (1990) Enthalpic and entropic contributions to actin stability: calorimetry, circular dichroism, and fluorescence study and effects of calcium. *Biochemistry* 29:291-298.

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

- Bohnen, H. (1995) Acidez e calagem. *In: Gianello, C., Bissani, C.A., Tedesco, M.J. Princípios de fertilidade de solo.* Porto Alegre: Dep. de Solos. Fac. de Agronomia. UFRGS. p.51-76.
- Bolan, N.S., Hedley, M.J. (2003) Role of Carbon, Nitrogen, and Sulfur Cycles in Soil Acidification. *In: Rengel Z, ed. Handbook of soil acidity. New York, NY, USA: Marcel Dekker, 29-56.*
- Bolan, N.S., Hedley, M.J., White, R.E. (1991) Process of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pasture. *Plant Soil* 134: 54-63.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principal of dye binding. *Ann. Biochem.*72:248-254.
- 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.* Feb 17:347-52.
- Braun, M., Hauslage, J., Czogalla, A., Limbach, C. ( 2004) Tip-localized actin polymerization and remodeling, reflected by the localization of ADF, profilin and villin, are fundamental for gravity-sensing and polar growth in characean rhizoids. *Planta* 219:379-88.
- Bush, D.S. (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 46:95–122.
- Calba, H., e Jaillard, B. (1997) Effect of aluminium on ion uptake and H<sup>+</sup> release by maize. *New Phytol.*, 137: 607–616.
- Caldwell, C.R. (1989) Analysis of aluminum and divalent cation binding to wheat root plasma membrane proteins using terbium phosphorescence. *Plant Physiol.* 91: 233-241.
- Carafoli, E. (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56:395–433.



- Carnero, E., Ribas J.C., Garcia B., Duran A., Sanchez Y. (2000) *Schizosaccharomyces pombe* ehs1p is involved in maintaining cell wall integrity and in calcium uptake. *Mol. Gen. Genet.* 264:173-83.
- Carrión, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellstrom, B., Naranjo, JR. (1999) DREAM is a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor. *Nature.* 398:80-84.
- 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.* 53:152-158.
- Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. *Cell.* 80:259-268.
- Corbett, E.F. e Michalak M. (2000) Calcium, a signalling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem. Sci.* 25:307-311.
- Cunningham, K.W. e Fink, G.R. (1994a). Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMC1*, a homolog of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J. Cell Biol.* 124:351-363.
- Cunningham, K.W. e Fink, G.R. (1994b). Ca<sup>2+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Exp. Biol.* 196:157–166.
- Davis, D., Wilson, R.B. e Mitchell, A.P. (2000) *RIM101*-Dependent and -Independent Pathways Govern pH Responses in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 971-978.
- Degenhardt, J., Larsen, P.B., Tai, C.Y., Stenzler, L.M., Howell, S.H., e Kochian, L.V. (1998) Aluminum-resistant Arabidopsis mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol.*, 117: 9-17
- Delhaize, E., Hebb, D.M. e Ryan, P.R. (2001) Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol.* 125: 2059-2067.
- Delhaize, E., Ryan, P.R., Randall, P.J. (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103: 695-702.

- Dinkelaker, B., Römheld, V., and Marschner, H. (1989) Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell Environ.* 12: 285-292.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I. de Montigny, J., Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E., *et al.* (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, [430:25-26](#).
- Durr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S.K., Catty, P., Wolf, D.H. e Rudolph, H.K. (1998) The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol. Biol. Cell.* 9:1149-1162.
- Exley, C.A. (1999) Molecular mechanisms of aluminum-induced Alzheimer's disease? *J. Inorg. Biochem.* 76: 133-140.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y. e Matsumoto, H. (2000) Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* 122: 657-665.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Kondo, H., e Matsumoto, H. (1998) Protective roles of two aluminum (Al) induced genes, *HSP150* and *SED1* of *Saccharomyces cerevisiae*, in AL and oxidative stresses. *FEMS Microbiol. Lett.*, 159: 99-105.
- 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.* 157:1029-1039.
- Façanha, A.R. e Okorokova-Façanha, A.L. (2002). Inhibition of phosphate uptake in corn roots by aluminum-fluoride complexes. *Plant Physiol.* 129: 1763-1772.
- Façanha, A.R. e Okorokova-Façanha, A.L. (2004) Al Tolerance Mechanisms: Beyond of Al<sup>3+</sup>-Induced Organic Acids Secretion. *In: Hemantaranjan, A. Advances In Plant Physiology.* Jodhpur: Scientific Publishers, v. 7, p. 347-379.
- Finogenova, T.V., Kamzolova, S.V., Dedyukhina, E.G., Shishkanova, N.V., Ilchenko, A.P., Morgunov, I.G., Chernyavskaya, O.G. e Sokolov, A.P. (2002).

- Biosynthesis of Citric and Isocitric Acids from Ethanol by Mutant *Yarrowia lipolytica* N1 Under Continuous Cultivation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 493-500.
- Fiske, C.F. e Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.
- Foy, C.D. (1988) Plant adaptation to acid, Al-toxic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19: 959–987.
- Foy, C.D. (1996) Tolerance of barley cultivars to an acid, aluminum-toxic subsoil related to mineral element concentrations in their shoots. *J. Plant Nutr.* 10/11:1361-1380.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C. (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29: 511-56.
- Frantzios, G., Galatis, B., Apostolakos, P. (2000) Aluminum effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum*. I. Mitotic cells. *New Phytol.* 145: 211-224.
- Gasch, A.P. (2002) Yeast genomic expression studies using DNA microarrays. *Methods Enzymol.* 350: 393-414.
- Gerendás, J. e Schurr, U. (1999) Physicochemical aspects of ion relations and pH regulation in plants - a quantitative approach. *J. Exp. Bot.*, 50: 1101-1114.
- Goffeau, A. e Slayman, C.W. (1981) The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 639: 197-223.
- Graschopf, A., Stadler., J.A., Hoellerer, M.K., Eder, S., Sieghardt, M., Kohlwein, S.D., e Schweyen, R.J. (2001) The yeast membrane protein Alr1 controls Mg<sup>2+</sup> homeostasis and is subject to Mg. *J. Biol. Chem.*, 273: 1727-1732.
- Halachmi, D. e Eilam, Y. (1989) Cytosolic and vacuolar Ca<sup>2+</sup> concentrations in yeast cells measured with the Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluorescence dye indo-1. *FEBS Lett.* 256:55-61.

- Halachmi, D. e Eilam, Y. (1993) Calcium homeostasis in yeast cells exposed to high concentrations of calcium, roles of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and cellular ATP. *FEBS Letters* 316:73-78.
- Haug, A. R. (1984). Molecular aspects of aluminium toxicity. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 1: 345-373.
- Haynes, R.J. (1990). Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant Soil* 126: 247-264.
- Hiraga, K., Tahara, H., Taguchi, Tsuchiya, E., H., Fukui, S. e Miyakawa, T. (1991) Inhibition of membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by mating pheromone alpha-factor *in vitro*. *J. Gen. Microbiol.* 137:1-4.
- Hirano, Y., Walthert, L., Brunner, I. (2006) Callose in root apices of European chestnut seedlings: a physiological indicator of aluminum stress. *Tree Physiol.*, 26:431–440.
- Hoffland, E., Findenegg, G.R., and Nelemans, J.A. (1989) Solubilization of rock phosphate by rape. II. Local root exudation of organic acids as a response to P-starvation. *Plant Soil* 113: 161-165.
- Horst, W., Asher, C., Cakmak, I., Szulkiewicz, P., Wissemeier, A.H. (1992) Short-term responses of soybean roots to aluminium. *J. Plant Physiol.* 140:174–78.
- Houeland, T. (1990). Aluminum and Alzheimer's disease: is there a casual connection? *Env. Geochem. Helth* 12: 173-178.
- Huang, J.W., Sha, J.E., Grunes, D.L., Kochian, L.V. (1992) Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol.* 98: 230-237.
- Huang, J.W., Pellet, D.M., Papernik, L.A., Kochian, L.V. (1996) Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and -resistant wheat cultivars. *Plant Physiol.* 110: 561.569.

- Iida, H., Yagawa, Y., Anraku, Y. (1990) Essential role for induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx followed by  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise in maintaining viability of yeast cells late in the mating pheromone response pathway. *J. Biol. Chem.* 265:13391-13399.
- Jones, D.L., Kochian, L.V. (1995) Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? *Plant Cell* 7: 1913-1922.
- Jung, H.I., Lee, Y.Y., Lim, H.W., Ahn, K.S., Park, E.H., e Lim, C.J. (2002) Regulation of the manganese-containing superoxide dismutase gene from fission yeast. *Mol. Cells*, 14: 300-304.
- Kadosh, D. e Johnson, A.D. (2005). Induction of the *Candida albicans* Filamentous Growth Program by Relief of Transcriptional Repression: A Genome-wide Analysis. *Mol. Cell. Biol.* 16: 2903-2912.
- Katsumata, K.S., Shintani, H., Meshitsuka, G. (2003) Mechanism of detoxification of aluminum ions by kraft lignin treated with alkaline oxygen. *J. Wood Sci.*, 49: 93-99.
- Kaur, S., Mishra, P. e Prasad, R. (1988) Dimorphism-associated changes in intracellular pH of *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 972:277-282.
- Kawano T., Kadono T., Furuichi T., Muto S., Lapeyrie F. Aluminum-induced distortion in calcium signaling involving oxidative bursts and channel regulation in tobacco BY-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308: 35-42, 2003.
- Kawasse, F.M., Amaral, P.F., Rocha-Leão, M.H., Amaral, A.L., Ferreira, E.C., Coelho, M.A. (2003) Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25:371-5.
- Kinraide, T.B. (1993) Aluminum enhancement of plant-growth in acid rooting media - a case of reciprocal alleviation of toxicity by 2 toxic cations. *Physiol. Plant* 88: 619-625.
- Kinraide, T.B., e Parker, D.R. (1987). Cation amelioration of aluminum toxicity in wheat. *Plant Physiol.*, 83: 546-551.

- Kinraide, T.B., Yermiyahu, U., e Rytwo, G. (1998) Computation of surface electrical potentials of plant cell membranes: correspondence to published zeta potentials from diverse plant sources. *Plant Physiol.*, 118: 505-512.
- Kochian, L.V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum and resistance in plants. *Annu. Ver. Plant Physiol.* 46: 237-260.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Pineros, M.A. (2004) How Do Crop Plants Tolerate Acid Soils? Mechanisms of Aluminum Tolerance and Phosphorous Efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:459-93.
- Kollmeier, M., Felle, H.H., e Horst, W.J. (2000). Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiol.* 122: 945-956.
- Kulakovskaya, T.V., Matyashova, R.N., Shishkanova, N.V., Finogenova, T.V. and Okorokov, L.A. (1993) Change in transport activities of vacuoles of the yeast *Yarrowia lipolytica* during its growth on glucose. *Yeast* 9:121-126.
- Lepidi, H., Zaffran, Y., Ansaldi, J.L., Mege, J.L., Capo, C. (1995) Morphological polarization of human polymorphonuclear leucocytes in response to three different chemoattractants: an effector response independent of calcium rise and tyrosine kinases. *J Cell Sci.* 108:1771-8.
- Li, L.G., Tutone, A.F., Drummond, R.S.M., Gardner, R.C., and Luan, S. (2001). A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13: 2761-2775.
- Li, W., Mitchell, A.P. (1997). Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics*, 145:63–73.
- Liu, G.J., Martin, D. K., Gardner, R.C., e Ryan, P.R. (2002). Large Mg<sup>2+</sup>-dependent currents are associated with the increased expression of *ALR1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 213: 231-237.
- Lobão, F A. (2005). *Efeito do Alumínio na acumulação de Ca<sup>2+</sup>, no crescimento de células de levedura de fissão Schizosaccharomyces pombe e clonagem do gene yc2.1, indicador de Ca<sup>2+</sup>, em vetor de expressão em levedura.*

Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 47p.

- Lobão, FA. (2006). Utilization of yeast *Yarrowia lipolytica* as model study of Aluminum toxicity XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, A36, Águas de Lindóia.
- Locke, E.G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y., Cunningham, K. (2000) A homolog of voltage-gated  $Ca^{+2}$  channels stimulated by depletion of secretory  $Ca^{+2}$  in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 20:6686-6694.
- Ma, J.F., Ryan, P.R., e Delhaize, E. (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6: 273-278.
- MacDiarmid, C.W. e Gardner, R.C. (1996). Al toxicity in yeast - A role for Mg? *Plant Physiol.*, 112: 1101-1109.
- Macdiarmid, C.W. e Gardner, R.C. (1998). Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J. Biol. Chem.* 273: 1727-1732.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2 ed. Academic Press, Londres. 889p.
- Matsumoto, H., Yamamoto, Y. e Kasai, M. (1992) Changes of some properties of the plasma membrane-enriched fraction of barley roots related to aluminum stress: Membrane-associated ATPase, aluminum and calcium. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38: 411-419.
- Matsumoto, H, Yamamoto, Y. e Ezaki, B. (2003) Recent advances in the physiological and molecular mechanism of Al toxicity and tolerance in higher plants. *In: Advances in Plant Physiology: Vol. 5, A. Hemantaranjan. Jodhpur, Scientific Pub.*
- Mild, M. (1990) Resonance energy transfer between points in a reconstituted skeletal muscle thin filament: a conformational change of the thin filament in response to a change in  $Ca^{2+}$  concentration. *Eur. J. Biochem.* 187: 155-162.
- Miyasaka, S.C., e Hawes, M.C. (2001). Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. *Plant Physiol.* 125: 1978-1987.

- Monk, B.C., Niimi, M. and Shepherd, M.G. (1993) The *Candida albicans* plasma membrane and H<sup>+</sup>-ATPase during yeast growth and germ tube formation. *J. Bacteriol.* 175: 5566-5574.
- Muller, E.M., Locke, E.G. e Cunningham, K.W. (2001) Differential regulation of two Ca<sup>(2+)</sup> influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159:1527-1538.
- Ohno T, Koyama H, Hara T. (2003). Characterization of citrate transport through the plasma membrane in a carrot mutant cell line with enhanced citrate excretion. *Plant Cell Physiol.* 44: 156–162.
- Okorokov, L.A. e Lichko, L.P. (1983) The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. ATPase is electrogenic H<sup>+</sup>-translocase. *FEBS Lett.* 155: 102-106.
- Okorokov, L.O. (1994) Several compartments of *Saccharomyces cerevisiae* are equipped with Ca<sup>+2</sup>-ATPase(s). *FEMS Microbiol. Lett.* 117:311-318.
- Okorokov A.L, e Lehle L. (1998). Ca<sup>2+</sup>-ATPases of *Saccharomyces cerevisiae*: diversity and possible role in protein sorting. *FEMS Microbiol Lett*, 162: 83-91.
- Palková, Z., Devaux, F., Icíková, M., Minariková, L., Le Crom, S., Jacq, C. (2002) Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Mol. Biol. Cell.*13:3901-3914.
- Pellet, D.M., Papernik, L.A., e Kochian, L.V. (1996) Multiple Aluminum-Resistance Mechanisms in Wheat (Roles of Root Apical Phosphate and Malate Exudation). *Plant Physiol.* 112: 591-597.
- Pérez-Campo, F.M., Domínguez, A. (2001). Factors Affecting the Morphogenetic Switch in *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Microbiol.*, 43:429–433.
- Petersen, W. e Böttger, M. (1991) Contribution of organic acids to the acidification of the rhizosphere of maize seedlings. *Plant Soil*, 132: 159-163.
- Phan, Q.T., Belanger, P.H. e Filler, S.G. (2000) Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infec. and Imm.*, 68: 3485–3490.



- Pineros, M., Tester, M. (1993) Plasma membrane channels in roots of higher plants and role in aluminum toxicity. *Plant Soil* 155/156: 119-122.
- Pineros, M.A., Magalhães, J.V., Carvalho Alves, V.M., Kochian, L.V. (2002) The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiol.*129: 1194-206.
- Putney, J.W. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*. 7:1-12.
- Putney, J. W. e McKay, R.R. (1999) Capacitive calcium entry channels. *Bioassays*. 21:38-46.
- Rangel, L.C. (2005) *Efeito do Alumínio na citocinese de levedura de fissão, Schizosaccharomyces pombe*. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, 58p.
- Rao, K.S.J., e Easwaran, K.R.K. 1997. Al-27-NMR studies of aluminum transport across yeast cell membranes. *Mol. Cell Biochem*. 175: 59-63.
- Rengel, Z. (1996) Uptake of aluminum by plant cells. *New Phytol*. 137: 389–406.
- Rengel, Z. (2000). Ecotypes of *Holcus lanatus* tolerant to zinc toxicity are also tolerant to zinc deficiency. *Ann. Bot.* 86:1119-1126.
- Rengel, Z. e Elliott, D.C. (1992a) Mechanism of aluminum inhibition of net  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by *Amaranthus* protoplasts. *Plant Physiol*. 98:632-638,
- Rengel, Z. e Elliott, D.C. (1992b) Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol*, 12: 499-513.
- Rengel., Z., Ma, F., Kuo, J. (2002) Aluminium toxicity in rye (*Secale cereale*): root growth and dynamics of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in intact root tips. *Annu. Botany* 89: 241-244.
- Rengel, Z. e Zhang, W-H. (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytol*. 159: 295-314.

- Rincon, M., e Gonzales, R.A. (1992) Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Physiol.* 99: 1021-1028.
- Rudolph, H.K., Antebi, A., Fink, G.R., Buckley, C.M., Dorman, T.E., Le Vitre, J., Davidow, L.S., Jen-i-Mao & Moir, D.T. (1989) The yeast secretory pathway is perturbed by mutation in *PMR1*, a member of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase family. *Cell* 55:133–145.
- Ruffy, T.W., MacKown, C.T., Lazof, D.B, Carter, T.E. (1995) Effects of aluminium on nitrate uptake and assimilation. *Plant Cell Environ.* 18: 1325–1331.
- Ruiz-Herrera, J. (1991) Biosynthesis of beta-glucans in fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* 60:72-81.
- Ruiz-Herrera, J. e Sentandreu, R. (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiol.* 178: 477-483.
- Ryan, P.R. e Kochian, L.V. (1993) Interaction between aluminum toxicity and calcium uptake at the root apex in near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in aluminum tolerance. *Plant Physiol.* 102: 975–982.
- Samuels, T.D., Kucukakyuz, K., e Rincon-Zachary, M. (1997). Al partitioning patterns and root growth as related to Al sensitivity and Al tolerance in wheat. *Plant Physiol.* 113: 527-534.
- Sanders, D., Brownlee, C. e Harper, J.F. (1999) Communicating with calcium. *The Plant Cell.* 11:691–706.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. e Harper J.F. (2002) Calcium at the crossroads of signaling *The Plant Cell* 401–417.
- Schott, E.J., e Gardner, R.C. (1997) Aluminum-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genetics* 254: 63-72.
- Schwarzerova, K., Zelenkova, S., Nick, P., e Opatrny, Z. (2002) Aluminum-induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. *Plant Cell Physiol.* 43: 207-216.

- Serrano R. (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 165:1-52.
- Shen, H., He, L.F., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Zheng, S.J., Ligaba, A., Yan, X.L., Ahn, S.J., Yamaguchi, M., Sasakawa, H., Matsumoto, H. (2005) Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H<sup>+</sup>- ATPase. *Plant Physiol* 138: 287–296.
- Silverman-Gavrila, L.B., Lew, R.R. (2002) Regulation of the tip-high [Ca<sup>2+</sup>] gradient in growing hyphae of the fungus *Neurospora crassa*. *Eur. J. Cell. Biol.* 80:379-90.
- Silverman-Gavrila, L.B., Lew, R.R. (2003) Calcium gradient dependence of *Neurospora crassa* hyphal growth. *Microbiology* 149:2475-85.
- Sivaguru, M., Pike, S., Gassmann, W., Baskin, T. I. (2003) Aluminum rapidly despolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasm membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant Cell Physiol.* 44: 667-675.
- Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Rengel, Z., Anh, S.J., Matsumoto, H. (2005). Early events responsible for aluminum toxicity symptoms in suspension-cultured tobacco cells. *New Phytol*, 165:99-109.
- Stewart, E., N.A.R. Gow, e D.V. Bowen. (1988) Cytoplasmic alkalinization during germ tube formation in *C. albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1079-1087.
- Sudbery, P.E., Gow, N.A.R. e Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 12: 317-324.
- Szabo, R., Štofániková, V. (2002). Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Lett*, 206:45-50.
- Sze, H., Liang, F., Hwang, I., Curran, A.C., Harper, J.F. (2000) Diversity and regulation of plant Ca<sup>2+</sup> pumps: insights from expression in yeast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:433-462.

- Tamas, L., Huttova, J., Mistrik, I., Simonovicova, M., Siroka, B. (2006). Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots. *J. Plant Physiol.*, 163:781-784.
- Tan, K., Keltjens, W. G., and Findenegg, G.R. (1991) Role of magnesium in combination with liming in alleviating acid-soil stress with the aluminum-sensitive sorghum genotype-cv323. *Plant Soil*, 136: 65-71.
- Tang, C. e Rengel, Z. (2003). Role of plant cation/anion uptake ratio in soil acidification. *In: Rengel Z, Handbook of soil acidity*. Nova lorque, USA: Marcel Dekker, 57-81.
- Taylor, G.J. (1988) The physiology of aluminum phytotoxicity. *In H Sigel. Metal Ions in Biological Systems: Aluminum and Its Role in Biology*. Marcel Dekker, New York, 123–163.
- Taylor, G.J., McDonald-Stephens, J.L., Hunter, D.B., Bertsch, P.M., Elmore, D., Rengel, Z., Reid, R.J. (2000) Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* 123: 987-996.
- Tice, K.R., Parker, D.R., Demason, D.A. (1992) Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root-tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol.* 100: 309-318.
- Torralba, S., Heath, I.B. (2001) Cytoskeletal and Ca<sup>2+</sup> regulation of hyphal tip growth and initiation. *Cur. Top Dev. Biol.* 51:135-87.
- Vassilev, P.M., Peng, J.B., Hediger, M.A. e Brown, E.M. (2001) Single-channel activities of the human epithelial Ca<sup>2+</sup> transport proteins CaT1 and CaT2. *J. Membr. Biol.* 184: 113-120.
- Vitorello, V.A. e Haug, A. (1996) Short-term aluminium uptake by tobacco cells: Growth dependence and evidence for internalization in a discrete peripheral region. *Physiol Plant.* 97: 536-544.
- Vitorello, V.A. e Haug, A. (1997) An aluminum-morin fluorescence assay for the visualization and determination of aluminum in cultured cells of *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2. *Plant Sci.* 122: 35-42.

- von Uexküll, H.R., Mutert, E. (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *In: Plant-Soil Interactions at Low pH: Principles and Management*, ed. RA Date, NJ Grundon, GE Raymet, ME Probert, pp. 5–19. Dordrecht, The Neth: Kluwer Academic.
- Yan, F., Feuerle, R., Schaffer, S., Fortmeier, H., Schubert, S. (1998) Adaptation of Active Proton Pumping and Plasmalemma ATPase Activity of Corn Roots to Low Root Medium pH. *Plant Physiol.* 117: 311-319.
- Yokel, R.A. (2000). The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology*, 21: 813-28.
- Yoshida, T., Toda, T. e Yanagida, M. (1994) A calcineurin-like gene *ppb1<sup>+</sup>* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J. Cell Sci.* 107:1725-1735.
- Zatta, P., Lucchini, R., Van Rensburg, S.J., Taylor A. (2003). The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res. Bull.* 62: 15-28.
- Zel, J., Svetek, J., Crne, H., *et al.* (1993) Effects of Aluminum on membrane fluidity of the micorrryzal fungus *Amanita muscaria*. *Physiol. Plant.* 89 : 172-176.
- Zhang, G. e Taylor, G.J. (1989) Kinetics of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. *Plant Physiol.* 91: 1094-1099.
- Zhang, G. e Taylor, G.J. (1990) Kinetics of aluminum uptake in *Triticum aestivum* L.: identity of the linear phase of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars. *Plant Physiol.* 94: 577-584.
- Zhang, X.K. e Rengel, Z. (2003). Soil solution composition in association with the toxicity of banded di-ammonium phosphate to wheat and amelioration by CaCO<sub>3</sub>. *Aust. J. Agric. Res.* 54: 183-191.
- Zhao, X-J., Sucoff, E., e Stadelmann, E.J. (1987) Al<sup>3+</sup> and Ca<sup>2+</sup> alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. *Plant Physiol*, 83: 159-162.