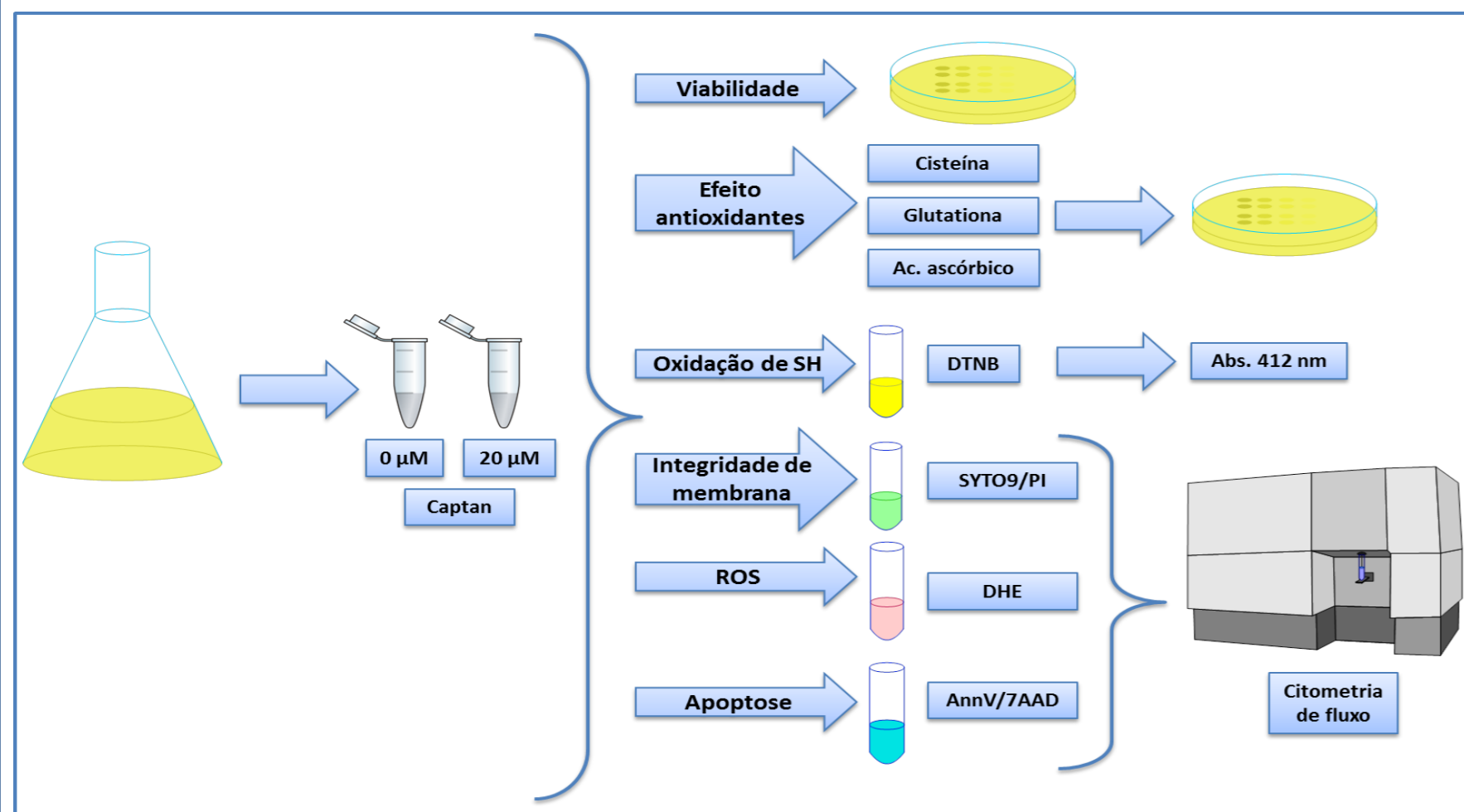


Luciane Maria Jahn (PIBIC – CNPq), Fernando Joel Scariot, Ana Paula Longaray Delamare, Sergio Echeverrigaray (orientador).
Laboratório de Microbiologia Aplicada, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.

INTRODUÇÃO

O captan é um fungicida amplamente utilizado para controle de diversas doenças fúngicas em videiras, pomares e lavouras, assim como outros fungicidas do grupo ftalimidas ele é definido como um fungicida com ação em múltiplos alvos e reatividade à tióis. O captan pode afetar organismos não alvos, como *S. cerevisiae* e interferir em processos fermentativos. Nesse contexto, o trabalho teve como objetivo compreender como o captan desencadeia a morte celular de *S. cerevisiae* e avaliar efeitos desencadeados pelo fungicida, como reatividade à tióis, acumulação de ROS e a presença de marcadores apoptóticos.

METODOLOGIA



As leveduras utilizadas neste trabalho foram: wt (BY4741), $\Delta aif1$, $\Delta nuc1$ e $\Delta yca1$. O efeito do captan sobre a viabilidade celular de *S. cerevisiae* foi avaliado em leveduras crescidas até fase exponencial e tratadas com distintas concentrações de captan (0 a 40 μM), avaliadas em diferentes tempos. A determinação do efeito do captan sobre a integridade da membrana celular, acumulação de ROS, oxidação de grupos tióis, efeito protetivo de antioxidantes e exposição de fosfatidilserina (marcador apoptótico) foi realizada conforme a figura 1.

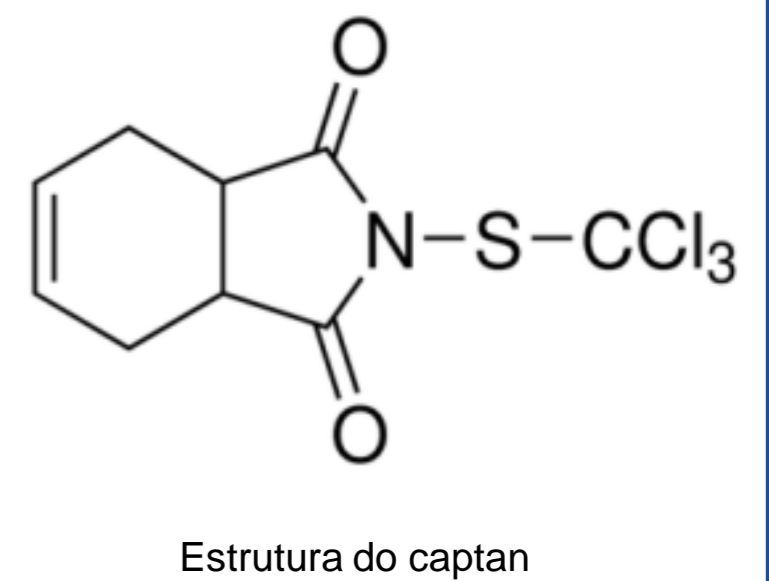


Fig. 1: Esquema representativo das metodologias utilizadas neste trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A redução da viabilidade de leveduras tratadas com captan mostrou um efeito dependente da dose e do tempo. O tratamento com 20 μM de fungicida, por um período de seis horas foi a condição selecionada para os outros ensaios, por ter reduzido a viabilidade celular próximo a 90% (Fig. 2).

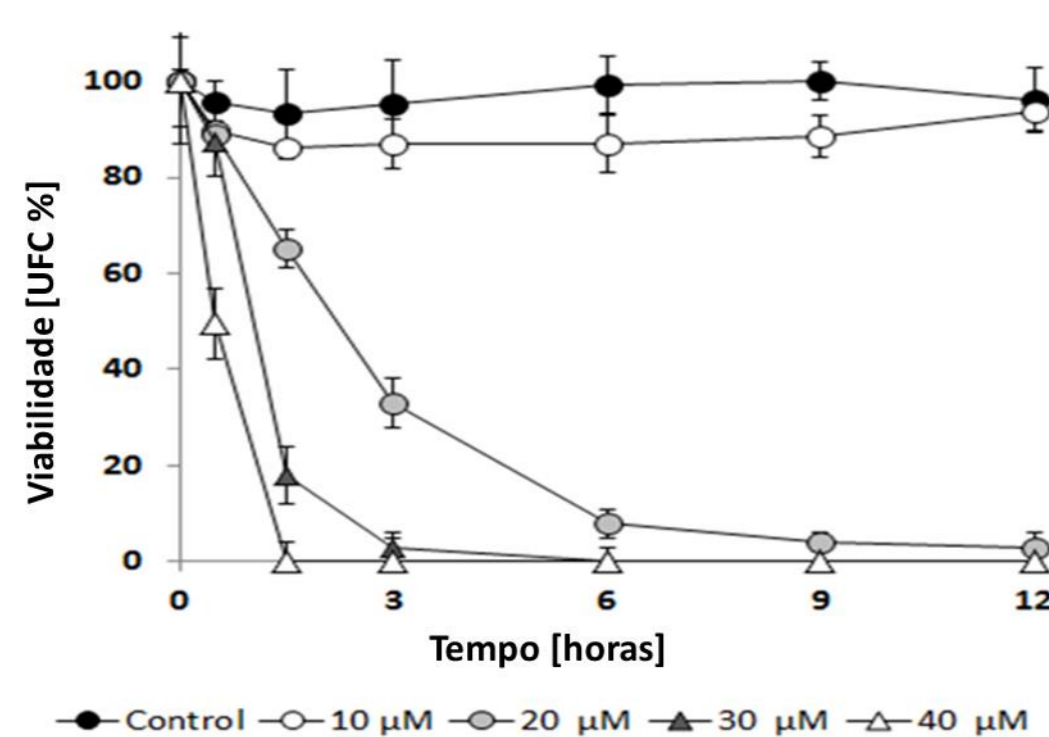


Fig. 2 – Efeito de distintas concentrações de captan em diferentes tempos de exposição sobre *S. cerevisiae*.

Leveduras tratadas com captan apresentaram um redução dose dependente na quantidade de grupos SH-P e SH-NP, indicando que o modo de ação do captan em *Saccharomyces* envolve a oxidação de tióis (Fig. 3A). Leveduras induzidas à morte por captan foram protegidas quando tratadas com cisteína e glutaciona, compostos com grupos tióis, porém esse efeito não ocorreu com o ácido ascórbico (Fig. 3B). O efeito protetivo de compostos tiólicos contra o captan já foi revisado por Arce *et al* (2010).

A coloração com SYTO9/PI revelou que a maioria das células de *S. cerevisiae* tratadas com captan apresentaram perda de integridade da membrana 81,7% (Fig. 4), sendo um indicativo de morte celular por necrose (Wloch-Salomon & Bem 2012).

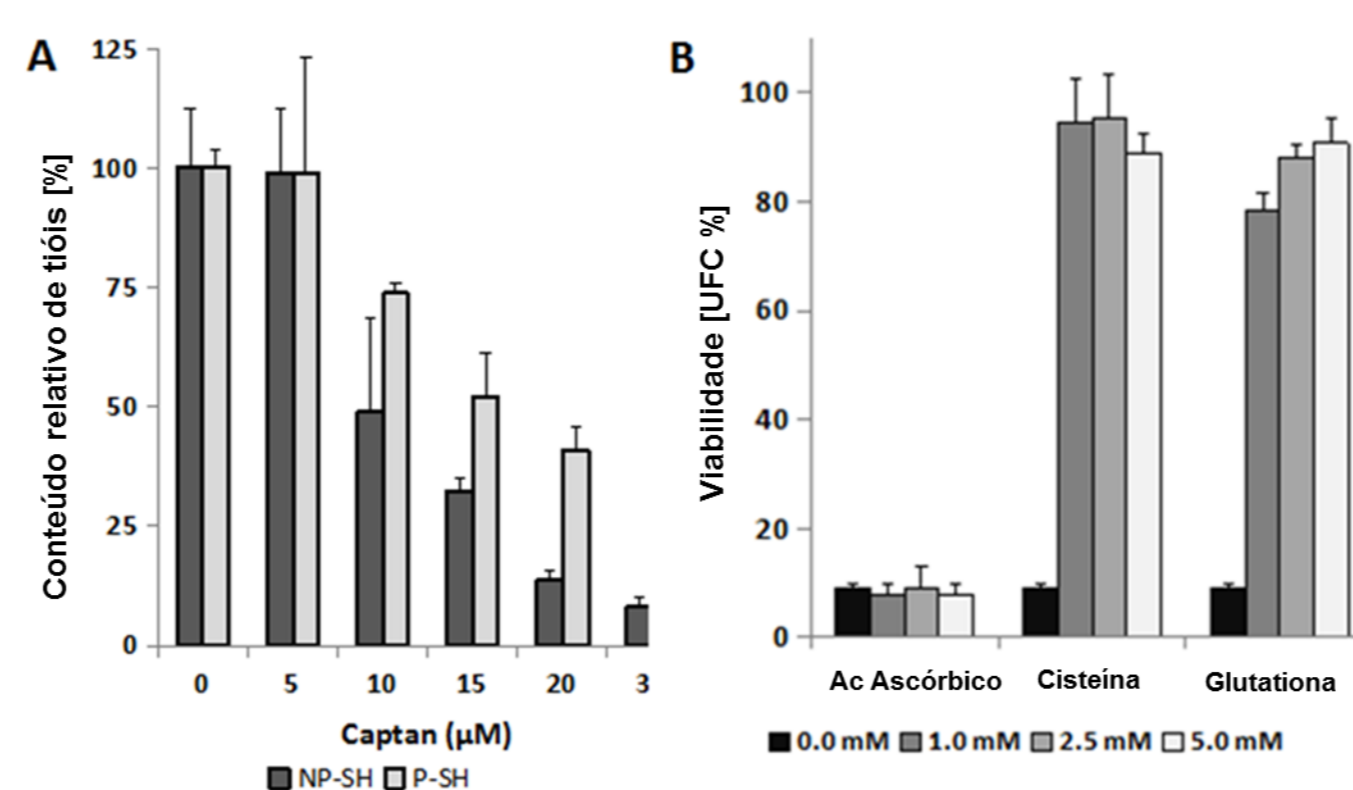


Fig. 3 – Efeito do captan sobre os grupos tióis proteicos (P-SH) e não-proteicos (NP-SH) (A) e o efeito protetor antioxidante em leveduras tratadas com 20 μM de captan (B).

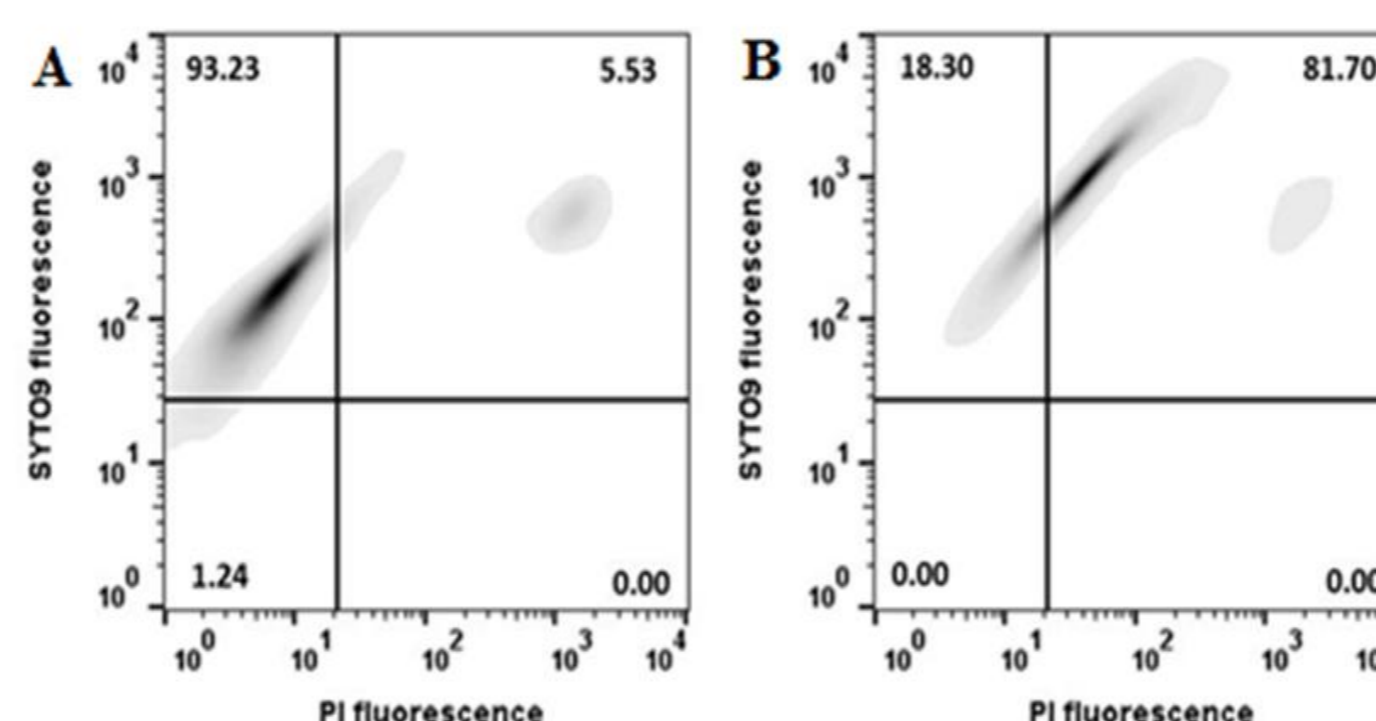


Fig. 4 – Integridade da membrana celular da levedura wt: (A) controle, (B) tratadas com 20 μM de captan durante seis horas. O número no interior das figuras indica a porcentagem de células em cada quadrante

A comparação da produção de ROS no controle e em células tratadas com captan mostrou um aumento no acúmulo deste após a exposição das leveduras à 20 μM de captan (Fig. 5), fato que pode estar relacionado com efeito reativo do captan sobre tióis não proteicos, pois nesse grupo se encontra a glutaciona, um importante antioxidante intracelular que atua na neutralização de ROS, xenobióticos e metabólicos endógenos tóxicos (Penninckx, 2002).

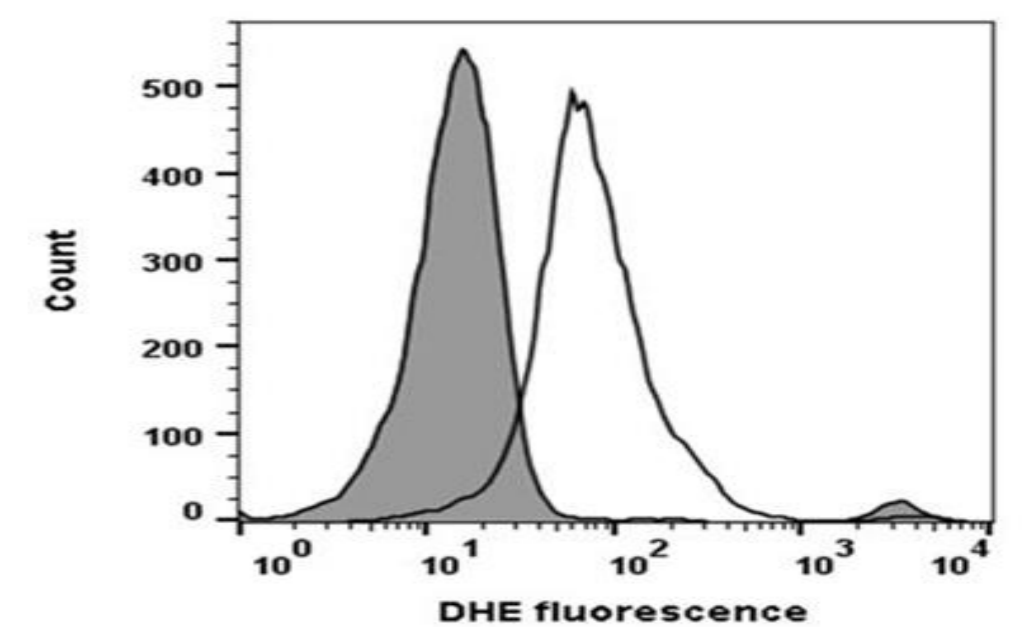


Fig. 5 – Concentração intracelular de ROS (intensidade de fluorescência) em leveduras não tratadas (área cinza) versus células tratadas com 20 μM de captan por seis horas (área branca).

A acumulação de ROS no interior da célula pode ser responsável pela indução de morte apoptótica, então a presença de apoptose foi verificada. Observou-se que a maior parte das leveduras tratadas com captan apresentaram morte necrótica ou apoptose tardia (AnnV -/7AAD + e AnnV +/7AAD -), porém 15,5% das células estavam nos estágios iniciais de apoptose (AnnV +/7AAD -)(Fig. 6A). Constatou-se que a morte celular apoptótica causada pelo captan segue a via metacaspase dependente, uma vez que a linhagem com deleção em *yca1* tratada com captan apresentou viabilidade superior, em comparação com a linhagem selvagem (Fig. 6B).

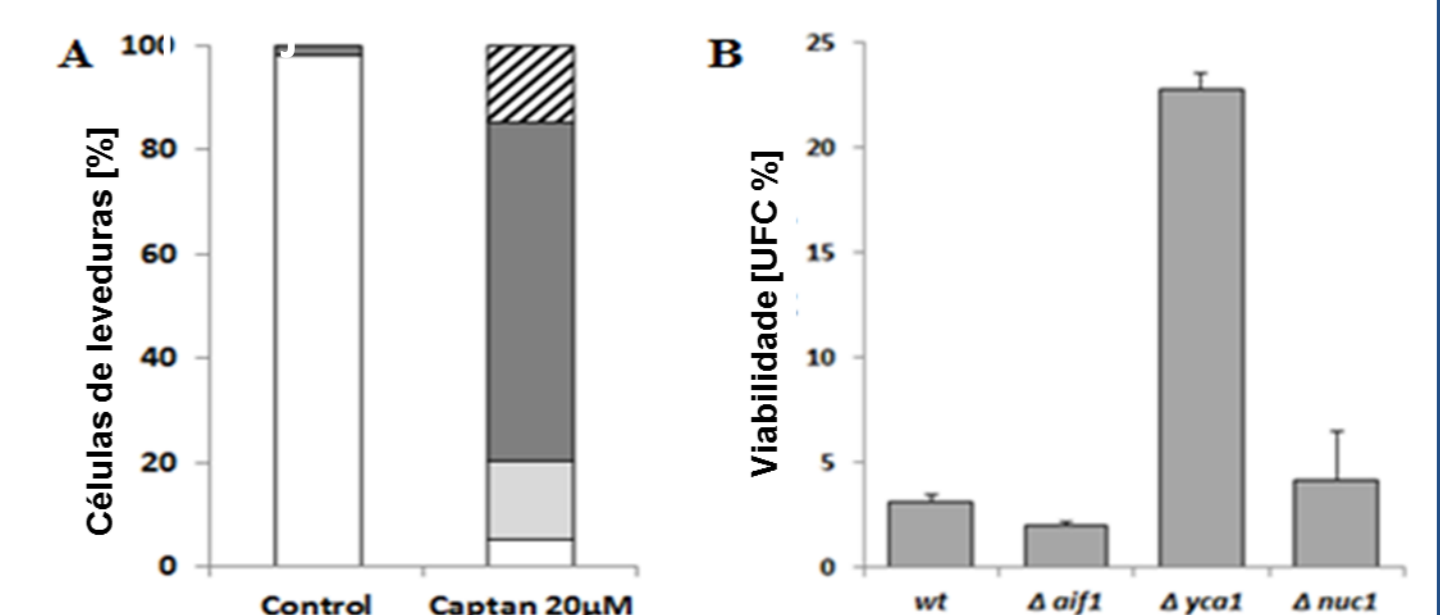


Fig. 6 – Análise de AnnV/7AAD em leveduras sem tratamento e tratadas com 20 μM de captan (A), branco (AnnV -/7AAD -), cinza claro (AnnV +/7AAD -), cinza escuro (AnnV -/7AAD +) e listrada (AnnV +/7AAD -). (B) Viabilidade (UFC %) da linhagem selvagem (wt) e mutantes tratadas com 20 μM de captan por seis horas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostram que a toxicidade do captan em *S. cerevisiae* está relacionada com a oxidação de grupos tióis, acumulação de ROS e perda da integridade da membrana celular num mecanismo típico de morte celular por necrose, mas parte da população segue um comportamento diferente, sendo afetada pelo aumento na concentração intracelular de ROS, que induz a morte por apoptose metacaspase dependente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Arce GT, Gordon EB, Cohen SM & Singh P (2010) Genetic toxicology of folpet and captan. *Crit Rev Toxicol.* 40: 546-574.
Penninckx MJ (2002) An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-convencional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2: 295-305.
Wloch-Salomon DM & Bem AE (2012) Types of cell death and methods of their detection in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* 114: 287-298.

AGRADECIMENTOS