

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EFEITO DOS FUNGICIDAS MANCOZEB, CAPTAN E DITHIANON
SOBRE *Saccharomyces cerevisiae*

FERNANDO JOEL SCARIOT

CAXIAS DO SUL

2016

FERNANDO JOEL SCARIOT

EFEITO DOS FUNGICIDAS MANCOZEB, CAPTAN E DITHIANON
SOBRE *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

CAXIAS DO SUL

2016

S285e Scariot, Fernando Joel

Efeito dos fungicidas mancozeb, captan e dithianon sobre
Saccharomyces cerevisiae / Fernando Joel Scariot. – 2016.
106 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.

Orientação: Sergio Echeverrigaray.

Coorientação: Ana Paula Longaray Delamare.

1. Morte celular. 2. Fungicidas. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4.
Apoptose. I. Echeverrigaray, Sergio, orient. II. Delamare, Ana Paula
Longaray, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

FERNANDO JOEL SCARIOT

EFEITO DOS FUNGICIDAS MANCOZEB, CAPTAN E DITHIANON

SOBRE *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 13 DE DEZEMBRO DE 2016.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Prof. Dr. Diego Bonatto

Profa. Dra. Mirian Salvador

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ernestina e Dorvalino, e às minhas irmãs Andressa e Catiane pelo carinho e apoio.

Aos professores Dr. Sergio Echeverrigaray e Dra. Ana Paula Longaray Delamare, que acreditaram na minha capacidade desde a época da graduação, quando eu entrei no laboratório, e que aceitaram me orientar nesta etapa.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada, que de alguma forma auxiliaram na realização do trabalho, seja de forma direta na bancada ou dando sugestões pertinentes.

Gostaria de agradecer especialmente a aluna de graduação Luciane Maria Jahn, que foi minha bolsista durante o mestrado, me auxiliando na realização da maioria dos experimentos.

Às professoras que fizeram parte da minha banca de acompanhamento, Dra Mariana Roesch Ely e Dra Mirian Salvador, pelas correções e sugestões realizadas.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, que de forma direta contribuíram na minha formação intelectual.

Aos funcionários, pelo auxílio prestado.

À Universidade de Caxias do Sul pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Cytogene Diagnóstico Moleculares pelo acesso ao citometro de fluxo.

À CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

*It is uniform, how nature enters life, but there are
thousand ways to die.*

August Graf von Platen (1796-1835)

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
NOMENCLATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ASBTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Fungicidas.....	18
2.1.1 Forma de ação dos fungicidas.....	18
2.1.1.1 Inibidores da biossíntese de esteróis	18
2.1.1.2 Inibidores da respiração celular.....	19
2.1.1.3 Interferentes na divisão celular e mitose.....	19
2.1.1.4 Atividade em múltiplos alvos.....	20
2.1.2 Mancozeb.....	20
2.1.3 Captan.....	24
2.1.4 Dithianon.....	26
2.1.5 Interferência de fungicidas em fermentações vínicas.....	27
2.2 Sistemas de morte celular.....	28
2.2.1 Apoptose.....	28
2.2.2 Autofagia.....	32
2.2.3 Necrose.....	32
2.3 Sistemas de resposta.....	33
2.3.1 O sistema de resposta ao estresse oxidativo.....	34
2.3.1.1 Yap1.....	35

2.3.1.2 <i>Skn7</i>	35
2.3.1.3 <i>Msn2/4</i>	36
2.3.2 Defesas antioxidantes.....	36
2.3.2.1 <i>Superóxido dismutase</i>	36
2.3.2.2 <i>Catalases</i>	37
2.3.2.3 <i>Tiorredoxinas</i>	37
2.3.2.4 <i>Peroxirredoxinas</i>	38
2.3.2.5 <i>Sistema glutationa</i>	39
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 CAPÍTULO 1 - The fungicide Mancozeb induces metacaspase-dependent apoptotic cell death in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741.....	44
4.2 CAPÍTULO 2 - Captan toxicity on <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : a dual necrotic and apoptotic cell death.....	54
4.3 CAPÍTULO 3 - The effect of the fungicide captan on <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and wine fermentation.....	71
4.4 CAPÍTULO 4 - Morte celular necrótica induzida pelo fungicida dithianon em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76
5 DISCUSSÃO GERAL.....	88
6 CONCLUSÕES.....	93
BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR.....	94
ANEXOS.....	105

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 Annexin V and 7AAD staining flow cytometry analysis of wild-type yeast and an isogenic $\Delta yca1$ mutant in the absence (Control) and presence of 100 μ M MZ (6 h)..... **48**

Table 2 Cell cycle of wild-type yeast and an isogenic $\Delta yca1$ mutant strain in the absence (Control) and presence of 100 μ M MZ (6 h)..... **50**

CAPÍTULO 3

Table 1. Viability, thiol content, membrane integrity, and ROS accumulation on control and 20 μ M captan treated (6 hours) exponential growing yeast cells..... **73**

Table 2. Wine fermentation parameters, cell mass and cellular thiols in the absence and presence of captan..... **74**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do mancozeb.....	21
Figura 2. Estrutura química do captan.....	24
Figura 3. Estrutura química do dithianon.....	26
Figura 4. Vias de indução de apoptose em <i>S. cerevisiae</i> (Madeo <i>et al.</i> , 2009).....	29

CAPÍTULO 1

Fig. 1 Effect of MZ concentration and exposure time on the cell viability of <i>S. cerevisiae</i> BY4741. Results are the average of three independent experiments. Legend: MZ concentrations (μM).....	47
---	-----------

Fig. 2 Viability (% c.f.u./cell count) of wild-type BY4741 and mutants exposed to 100 μM MZ for 6 h (a). Results are the average of three independent experiments, standard deviation are indicated as error bars. Inset showing the attenuated loss in cell viability for the metacaspase-1 defective mutant $\Delta yca1$ following MZ treatment compared to wild-type (b).....	47
---	-----------

Fig. 3 Cell membrane integrity (% PI negative) and cell viability (% c.f.u.) of wild-type BY4741 yeast, and $\Delta yca1$ mutant strain treated for 6 h with 100 μM MZ. Values are mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments. Means comparison: ***significantly different ($p < 0.001$); ns: non-significant difference.....	48
--	-----------

Fig. 4 ROS intracellular concentration (fluorescence intensity) in untreated yeast (<i>grey area</i>) versus cells treated with MZ (<i>white area</i>) for 6 h with 100 μM MZ. Left panels, a and c , correspond to the wild- type BY4741 yeast. <i>Right panels b</i> and d , correspond to $\Delta yca1$ mutant yeast. The stains are indicated in the X axis as dihydroethidium (DHE) and dihydro-rhodamine 123 (DHR123). <i>Numbers within figures</i> indicate the median peak fluorescence for 10,000 cells.....	49
---	-----------

Fig. 5 Changes in yeast mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$) induced by MZ treatment revealed by staining with 3,3'- dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6). a BY4741 wild-type yeast, and b $\Delta yca1$ mutant strain. <i>Grey area</i> represents untreated control cells, and <i>white area</i> represents cells treated with 100 μM (6 h). Ten thousands cells were computed for each treatment.....	49
--	-----------

Supplementary Fig. 1 Flow cytometry results for annexin V/7AAD-stained <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : (A) wild type untreated cells, (B) wild type cells treated with 100 μM MZ (6h), (C) $\Delta yca1$ untreated cells, (D) $\Delta yca1$ cells treated with 100 μM MZ (6h). Values within figures indicate the percentage of events per quadrant.....	52
---	-----------

Supplementary Fig. 2 Cell cycle analysis based on DNA content (SYTO9 staining) of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cells: (A) wild type untreated cells, (B) wild type cells treated	
--	--

with 100µM MZ (6h), (C) *Δyca1* untreated cells, (D) *Δyca1* cells treated with 100 µM MZ (6h)..... 53

CAPÍTULO 2

Figure 1- Effect of Captan concentration and exposure time on the cell viability of *S. cerevisiae* BY4741. Results are the average of three independent experiments. Legend: Captan concentrations (µM).....60

Figure 2- Effect of Captan on reduced thiol pool (R-SH) of *S. cerevisiae* (A), and the protective effect of antioxidants on *S. cerevisiae* Captan (20 µM)-treated cells (B). NP-SH – non-protein thiols; P-SH – protein thiols. The data are mean ± SD values of three independent experiments.....61

Figure 3- Cell membrane integrity (% PI negative) of wild-type BY4741 yeast: (A) control, (B) treated for 6 h with 20 µM Captan. A total of 10,000 cells were analyzed, and numbers within figures indicate the percentage of cell within each quadrant..... 62

Figure 4- ROS intracellular concentration (fluorescence intensity) in untreated yeast (grey area) versus cells treated with Captan (white area) for 6 h with 20 µM Captan..... 62

Figure 5- Annexin V and 7AAD staining flow cytometry analysis of wild-type yeast in the absence (Control) and presence of 20 µM Captan (A), and viability (CFU %) of wild-type BY4741 and mutants exposed to 20 µM MZ for 6 h (B). AnnV/7AAD values are the percentage of cells in the four quadrants (10,000 cell counts/treatment). White (AnnV-negative/7AA- negative), light gray (AnnV- positive/7-AAD- negative), dark gray (Ann-V negative/7-AAD- positive), striped (Ann-V positive/7-AAD- positive)..... 64

CAPÍTULO 3

Figure 1. Fermentation behavior in increased concentrations of captan. Values are mean of three replications..... 73

Figure 2. Yeast population and fermentation kinetics in sub-inhibitory concentrations of captan. Values are mean of three replications.....74

CAPÍTULO 4

Figura 1. Avaliação da viabilidade de leveduras tratadas com diferentes concentrações de dithianon e incubadas por 3 h.....81

Figura 2. Avaliação da integridade da membrana citoplasmática utilizando o *kit Live/Dead*. A leveduras sem tratamento com fungicida; B leveduras tratadas com 2,0 µM de dithianon. Os números internos são a porcentagem de cada quadrante de um total de 10.000 células.....82

Figura 3. Avaliação da viabilidade de células tratadas previamente com antioxidantes e posteriormente tratadas com 2,0 µM de dithianon por 3 h (**A**). Quantificação do conteúdo intracelular de grupos SH não proteicos (SH-NP) e proteicos (SH-P) em células tratadas com 2,0 µM de dithianon por 3 h (**B**). Quantificação por citometria de fluxo da produção de ROS em células sem tratamento (*cinza*) e tratadas com 2,0 µM de dithianon (*branco*) utilizando os corantes DHE (**C**) e DHR123 (**D**). Os ensaios foram realizados em triplicata.....83

Figura 4. Avaliação por citometria de fluxo da externalização de fosfatidiliserina utilizando os corantes AnnexinV-PE/7AAD. **A** levedura sem tratamento com fungicida; **B** leveduras tratadas com 2,0 µM de dithianon; **C** leveduras tratadas com 10,0 µM de dithianon. Os valores internos indicam porcentagem de cada quadrante, foram analisadas 10.000 células.....85

DISCUSSÃO GERAL

Figura 5. Esquema da reação do captan com grupos tióis (Adaptado de Roberts & Hutson, 1999).....90

Figura 6. Esquema da hidrólise do mancozeb e formação dos compostos intermediários. (Adaptado de López-Fernández *et al.*, 2016).....91

Figura 7. Produtos da hidrólise do dithianon (Adaptado de FAO, 2014)..... 92

NOMENCLATURAS

7AAD	7-aminoactinomycin D
AIF	fator indutor de apoptose
AnnV	Annexina V-PE
ATP	adenosina trifosfato
CFU	unidade formadora de colônia
DHE	dihydroethidium
DHR123	dihydro-rhodamine-123
DiOC ₆	3,3'-dihexyloxacarbo- cyanine iodide
DMSO	dimetilsulfoxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
EBDC	etileno bis-ditiocarbamato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
MIC	Concentração inibitória mínima
MRL	Limite máximo de resíduos
MZ	Mancozeb
NADPH	nicotinamina adenina dinucleotideo fosfato
NP-SH	tióis não proteicos
OD	densidade óptica

PI	iodeto de propídio
P-SH	tióis proteicos
ROS	espécies reativas de oxigênio
SOD	superóxido dismutase
THPI	1,2,3,6-tetrahydrophthalimide
T-SH	tióis totais
WT	<i>wild type</i>

RESUMO

Os fungicidas são normalmente utilizados para o controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos em diversas culturas, incluindo frutas. Estes compostos, especialmente os descritos com atividade em múltiplos alvos, podem afetar organismos não alvos como leveduras, levando elas à morte por diferentes vias. O objetivo deste trabalho foi determinar o mecanismo de ação e de morte de três diferentes fungicidas utilizados na viticultura (mancozeb, captan e dithianon) sobre *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados mostraram que leveduras expostas ao mancozeb (100 μ M, 6 h) levam a uma drástica redução da viabilidade, mas sem modificações na integridade da membrana celular. As células tratadas com mancozeb apresentaram marcadores apoptóticos como aumento na concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS), hiperpolarização da membrana mitocondrial e externalização de fosfatidilserina, indicando que a morte celular de *S. cerevisiae* ocasionada por mancozeb é apoptótica e conforme observado pelo comportamento de linhagens mutantes, segue a via metacaspase dependente. Aproximadamente 80% das leveduras tratadas com captan (20 μ M, 6 h) apresentaram disfunções na membrana citoplasmática, e a drástica redução na concentração de grupos tiólicos proteicos e não proteicos. Além disso, as células que mantiveram sua integridade de membrana após a exposição ao captan, exibiram externalização de fosfatidilserina e acumulação de ROS. Mutantes com deleção em YCA1 apresentaram resistência parcial ao captan, indicando a ativação da cascata apoptótica metacaspase dependente. Em fermentações vínicas o captan (2,5 μ M) atrasa o início da fermentação de maneira dose dependente, devido à drástica redução na viabilidade celular. Porém, em dosagens subletais, as células remanescentes se adaptam ao fungicida e completam a fermentação sem alterações evidentes nas características físico-químicas do produto final. Da mesma forma, leveduras tratadas com dithianon (2 μ M; 3 h) mostraram aumento no número de células com permeabilização da membrana citoplasmática, aumento de ROS e redução na quantidade de tióis, mas sem sinais de apoptose. De forma geral, os resultados indicam que o mancozeb induz apoptose em *S. cerevisiae* via metacaspase dependente, enquanto o captan leva a morte por necrose e apoptose e o dithianon mata as células por necrose.

ABSTRACT

Fungicides are currently used to control fungal phytopathogenic diseases in many crops, including fruits. These compounds, especially those described as multisite activity fungicides, can affect non-target organisms like yeasts leading to their cell death by different pathways. The objective of this work was determining the mechanism of action and death of three fungicides used in viticulture (captan, dithianon and mancozeb) on *Saccharomyces cerevisiae*. The results showed that yeast exposition to the mancozeb (100 μ M, 6 h) lead to a drastic reduction of cell viability, but no modification of cell membrane integrity. Mancozeb treated cells shown apoptotic markers as increase of intracellular reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane hyperpolarization, and phosphatidylserine externalization, indicating that mancozeb induced cell death in *S. cerevisiae* is apoptotic and as shown by mutants strains, follow metacaspase-dependent pathway. Almost 80% of captan treated yeasts (20 μ M, 6 h) showed cytoplasmatic membrane dysfunction, and a drastic reduction on both non-proteic and proteic thiol concentrations. Moreover, the cells that retain their membrane integrity after exposure to the captan exhibited phosphatidylserine externalization and ROS accumulation, indicating apoptosis. *YCA1* deletion mutant exhibited partial resistance to captan, suggesting a metacaspase dependent apoptotic cascade. In wine fermentations captan (2,5 μ M) delays the beginning of alcoholic fermentations in a dose dependent manner, associated with a drastic reduction on yeast viability. However, in sub-lethal dosages, the reminiscent viable cells adapted to the fungicide, grow and complete fermentation with non-evident modifications on the physicochemical characteristics of the final product. Similarly, yeast cells treated with dithianon (2 μ M; 3 h) showed cell membrane permeabilization, ROS increase, and decrease of cellular thiol compounds, but no signs of apoptosis. In general, the results indicated that mancozeb induces metacaspase dependent apoptotic cell death in *S. cerevisiae*, where captan leads to a dual necrotic and apoptotic cell death, and dithianon kills cells by necrosis.

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial existe uma elevação proporcional na demanda por alimentos, porém, restrições relacionadas com a expansão de fronteiras agrícolas exigem o aumento na produtividade. Nesse contexto, o controle químico é uma ferramenta crítica na prevenção de perdas associadas à fitopatógenos.

No Brasil, a comercialização de agroquímicos é um mercado que movimenta anualmente US\$ 12,25 bilhões e deste total US\$ 2,91 bilhões são vinculados à venda de fungicidas. As culturas de lavoura que representam o maior consumo de fungicidas são a soja, o milho e os cereais, e as frutíferas maçã, cítricos e uva (MAPA, 2016).

Quando um fungicida é utilizado, os seus alvos são os fungos fitopatogênicos, porém outros organismos acabam entrando em contato com o fungicida por estarem no mesmo ambiente que esses fungos. Portanto, conhecer a forma como os fungicidas atuam sobre organismos não alvos é importante para estabelecer os perigos associados à utilização deles na agricultura. A produtividade e o retorno econômico serão maximizados com a utilização de agroquímicos que controlem eficazmente fungos fitopatogênicos preservando organismos benéficos.

Fungicidas que atuam em vários alvos na célula são amplamente utilizados nas atividades agrônomicas, devido seu amplo espectro de ação e efetividade no controle de doenças fitopatogênicas, evitando a seleção de fungos resistentes. Porém, fungicidas com essa forma de ação podem interferir em organismos que não são o alvo primário. Além disso, os efeitos desses fungicidas nem sempre são bem definidos, fazendo-se necessários estudos mais aprofundados. No grupo de fungicidas com atividade em múltiplos alvos se encontram o captan, o dithianon e o mancozeb. Estabelecer a forma como os fungicidas com atividade em múltiplos alvos atuam sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é importante, pois ela é

utilizada em fermentações vínicas que eventualmente podem estar contaminadas com fungicidas desse grupo.

S. cerevisiae se destaca como modelo para a avaliação de efeitos tóxicos, pois é um organismo simples de ser manipulado e apresenta uma coleção de mutantes para cada um dos seus mais de 6.000 genes (Winzeler et al., 1999). Além disso, a avaliação de efeitos tóxicos de fungicidas em *S. cerevisiae* permite traçar um paralelo para prever a forma como eles poderão interferir em outros eucariotos.

Definir a forma como os fungicidas levam a morte celular é importante, pois eventos de morte celular como a apoptose estão relacionados com diversas doenças humanas como os distúrbios neurológicos causados pela doença de Alzheimer, mal de Parkinson e doença de Huntington, vários tipos de câncer e distúrbios cardiovasculares (Favaloro et al., 2012).

Neste contexto, o trabalho buscou elucidar o mecanismo de a  o e morte de fungicidas utilizados na viticultura (mancozeb, captan e dithianon) sobre *S. cerevisiae*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungicidas

O controle de doenças fúngicas utilizando compostos químicos começou a ser utilizado durante a metade do século XIX com o emprego de compostos sulfurados e cúpricos para o controle do míldio (*Plasmopara vitícola*) em videiras. Durante a primeira metade do século seguinte, diversos compostos orgânicos começaram a ser utilizados como fungicidas, incluindo os ditiocarbamatos e clorados (Knight *et al.*, 1997). A partir da segunda metade do século XX os fungicidas com ação específica em um único alvo passaram a ser utilizados.

Desde então, a utilização de fungicidas tornou-se uma prática comum na agricultura, onde eles têm sido utilizados amplamente para o controle de doenças fúngicas em pomares e lavouras, permitindo assim um aumento na produtividade (Hirooka & Ishii, 2013).

2.1.1 Forma de ação dos fungicidas

Atualmente a forma mais aceita para a classificação dos fungicidas esta relacionada à forma como eles atuam nos fungos e a probabilidade de promover a seleção de fungos resistentes a determinado fungicida, conforme determinado pelo *Fungicide Resistance Action Committee* (FRAC, 2016). As principais formas de ação dos fungicidas estão descritas a seguir.

2.1.1.1 Inibidores da biossíntese de esteróis

A membrana celular realiza diversas funções biológicas nas células, incluindo a passagem de moléculas, manutenção do formato celular e transmissão de sinais (Alberts *et al.*, 2010). Portanto, impactos negativos na membrana celular acabam matando a célula. Esteróis são componentes essenciais para a regulação da permeabilidade e estabilidade da membrana

celular fúngica. A inibição de enzimas envolvidas na formação de ergosterol leva a redução na quantidade de ergosterol e a acumulação de precursores e esteróis anormais, resultando em fungitoxicidade causada por alterações na membrana e nas funções metabólicas (Debieu *et al.*, 1998).

Os fungicidas inibidores da biossíntese de esteróis atuam inibindo enzimas na via de biossíntese, como os passos catalizados pela C14-desmetilase (piperazinas, piridinas, pirimidinas, imidazóis e triazóis), Δ 14-redutase (morfolinas, piperidinas e espirocetalaminas), C4-desmetilase (hidroxianilidos), Δ 8,7-isomerase e esqualeno epoxidase (morfolinas e alilaminas) (Ziogas & Malandrakis, 2015).

2.1.1.2 Inibidores da respiração celular

A respiração mitocondrial em fungos fitopatogênicos é idêntica aos outros organismos eucariotos. Os principais fungicidas que atuam interferindo na respiração celular inibem a enzima complexo II (succinato desidrogenase) ou o complexo III (complexo citocromo bc1) da cadeia transportadora de elétrons, mas também podem inibir a ATPase ou atuar como um desacoplador da fosforilação oxidativa (Sierotzki, 2015). Exemplos de fungicidas que atuam dessa forma incluem azoxistrobina, fenamidona, boscalida e piraclostrobina.

2.1.1.3 Interferentes na divisão celular e mitose

Neste grupo encontram-se os fungicidas que interferem na formação de microtúbulos pela tubulina durante a divisão nuclear, estando incluídos benzimidazoles, N-fenilcarbamatos e benzamidas. Os microtúbulos são o componente base do citoesqueleto e estão presente em todas as células eucariotas, tendo papel importante em vários processos celulares como a sinalização celular, a motilidade celular, o transporte de organelas e a divisão celular (Kapoor & Compton, 2002).

2.1.1.4 Atividade em múltiplos alvos

Fungicidas incluídos neste grupo possuem em comum a capacidade de atuar sobre diferentes alvos na célula. Por atuar em diversos alvos e possuir efeito protetivo, os fungicidas desse grupo não levam a seleção de fungos com resistência a eles, portanto acabam sendo utilizados com alta frequência durante o período vegetativo das plantas (Gisi & Sierotzki, 2008).

Esses fungicidas interagem inespecificamente com vários passos no metabolismo fúngico, como na formação de complexos com enzimas que possuem grupos sulfidríla, consequentemente essas enzimas são inativadas causando distúrbios no metabolismo e integridade celular (Gisi, 2002).

Neste grupo estão incluídos fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos (mancozeb), ftalimidas (captan), isoftalonitrilas (clorotalonil), sulfaminas (diclofluanide), guanidinas (dodine), triazinas (anilazina) e quinonas (dithianon), além dos compostos inorgânicos enxofre e cobre (FRAC, 2016).

2.1.2 Mancozeb

O mancozeb (zinco;manganês(2+);N-[2-(sulfidocarbottiolamino)etil]carbamoditioato) é um fungicida que pertence à família dos etilenos bis-ditiocarbamatos (EBDC), formado por mistura de moléculas de etileno bis-ditiocarbamato contendo átomos de manganês (Fig. 1a) ou zinco (Fig. 1b) associados. Os ditiocarbamatos são derivados do ácido carbâmico, composto sintetizado em 1920 para ser utilizado como catalizador na vulcanização de borracha. Na década seguinte verificou-se que compostos derivados desse ácido possuíam propriedades fungicidas, porém somente em 1940 foi comercializado o primeiro fungicida ditiocarbamato, chamado de tiram (dissulfeto de tetrametiltiuram). Por apresentar-se pouco eficiente para a aplicação foliar, novas moléculas foram sintetizadas, desta vez contendo

metais em sua estrutura. Então surgiu o zineb em 1945 e finalmente o mancozeb foi desenvolvido em 1961 por Rohm & Haas, sendo comercializado até hoje (Gullino *et al.*, 2010).

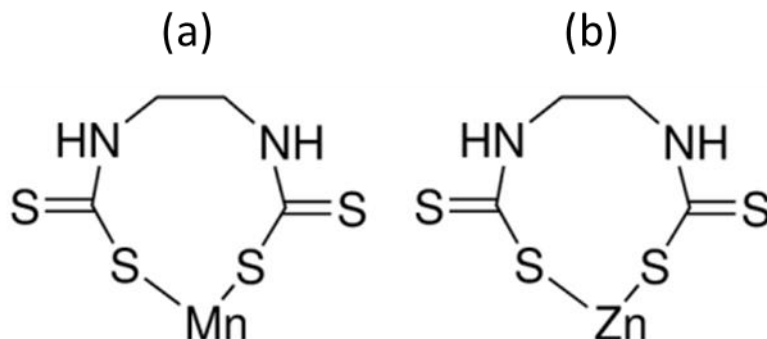


Figura 1. Estrutura química do mancozeb, mistura de maneb (a) e zineb (b).

O mancozeb é um fungicida de contato com amplo espectro de ação. Atualmente o mancozeb possui registro para a sua utilização como fungicida em 46 culturas no Brasil, possuindo 34 diferentes formulações comercializadas no país e sendo indicado para o controle de 43 espécies de fungos fitopatogênicos (MAPA, 2016). Dessa forma, o mancozeb é um dos fungicidas mais comercializados no país com 8,4 mil toneladas vendidas em 2013 (IBAMA, 2013).

Em um estudo avaliando o resíduo de agroquímicos em frutas e verduras no período de 2001 a 2010 no Brasil, os fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos foram os que apresentaram o maior número de amostras contaminadas, correspondendo a 41,6% das contaminações encontradas (Jardim & Caldas, 2012).

Em ensaios onde ratos foram tratados com mancozeb de forma crônica, o fungicida mostrou-se um agente carcinogênico multipotente capaz de induzir a formação de tumores malignos como mamários, pancreáticos e da glândula tireoide, hepatocarcinomas, osteosarcomas e neoplasias hemolinforeticulares (Belpoggi *et al.*, 2002).

Calviello *et al.* (2006) mostraram o efeito pró-apoptótico do mancozeb sobre células de ratos, o efeito apoptótico do fungicida foi relacionado a um aumento na produção de ROS e uma elevação de danos ao DNA. A exposição ao mancozeb alterou a expressão de genes relacionados à modulação da cascata apoptótica.

O efeito apoptótico de mancozeb foi observado em culturas de linfócitos humanos, cujo efeito apoptótico foi associado a um aumento na concentração intracelular de ROS, que ocorreu de forma dose dependente. Além disso, como consequência à exposição ao fungicida, foi diagnosticado um aumento significativo na frequência de células com aberrações cromossômicas e micronúcleos (Srivastava *et al.*, 2012).

Ensaios *in vitro*, utilizando células neuronais mesoencefálicas, que foram tratadas com mancozeb, mostraram que as mesmas apresentaram toxicidade, o que foi associado com perturbações na função mitocondrial, com o mancozeb atuando como um desacoplador da cadeia transportadora de elétrons. Foi mostrado também que, tanto a parte orgânica quanto a parte metálica da molécula contribuem para o efeito tóxico do mancozeb (Domico *et al.*, 2006). Embora o mancozeb seja uma mistura de dois etilenos bis-ditiocarbamatos (contendo manganês ou zinco) a parte contendo manganês parece ter um efeito mais tóxico quando comparado com a porção contendo zinco, sendo o principal responsável pela formação de ROS quando aplicada sobre culturas de células neuronais (Domico *et al.*, 2007).

Culturas de células de cólon humanas tratadas com mancozeb apresentaram peroxidação lipídica, ativação de caspases 3/7, 8 e 9, além de um aumento na concentração intracelular de manganês e zinco, indicando que as duas porções da molécula (metálica e orgânica) contribuem para o efeito tóxico (Hoffman & Hardej, 2012).

O mancozeb afetou culturas de células de folículos de ovário, induzindo alterações morfológicas e modulando a expressão de p53, sugerindo uma condição pré-tumoral das

células expostas ao fungicida, fato que ocorreu tanto em células de humanos, quanto de camundongos (Paro *et al.*, 2012).

Embora o mancozeb não tenha leveduras como seus organismos alvos ele apresenta toxicidade sobre *S. cerevisiae* atuando como um composto com reatividade a tióis, levando a oxidação de cisteínas proteicas. Como forma de proteção a célula apresenta genes envolvidos na biossíntese e redução de glutatona e na degradação de proteínas (Dias *et al.*, 2010).

Diferente dos resultados encontrados em células de mamíferos, nos quais a indução da formação de ROS pelo mancozeb parece ser o principal fator relacionado ao seu efeito tóxico (Calviello *et al.*, 2006; Domico *et al.*, 2007; Srivastava *et al.*, 2012), em leveduras não ficou evidenciado esse comportamento, os autores justificam este fato devido ao baixo nível respiratório nas leveduras em condição fermentativa e consequente redução da atividade da cadeia transportadora de elétrons (Dias *et al.*, 2010).

Além de estudos avaliando efeitos tóxicos do mancozeb sobre leveduras, foram realizadas pesquisas visando avaliar a forma de resistência ao fungicida, no qual ficou evidenciado a necessidade da expressão do gene *FLR1*, um transportador responsável pela resistência a múltiplas drogas, sendo a ativação da transcrição mediada por Yap1p (Teixeira *et al.*, 2008).

Em um estudo utilizando proteômica para avaliar a resposta das leveduras a exposição ao mancozeb, foi observado que as proteínas com expressão alterada estavam relacionadas principalmente a resposta antioxidante, metabolismo de carboidratos e energético, síntese e degradação de proteínas e chaperonas, em que mais de 90% dos genes com expressão alterada são coordenados pelo fator de transcrição Yap1p (Santos *et al.*, 2009).

2.1.3 Captan

O captan (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida) é um fungicida organoclorado da família química das dicarboximidas (Fig 2). Começou a ser comercializado como fungicida no início da década de 50, sendo utilizado no controle de diversas doenças fúngicas em lavouras e pomares, sendo também recomendado para o tratamento de sementes e plantas ornamentais (Fisher *et al.*, 1992).

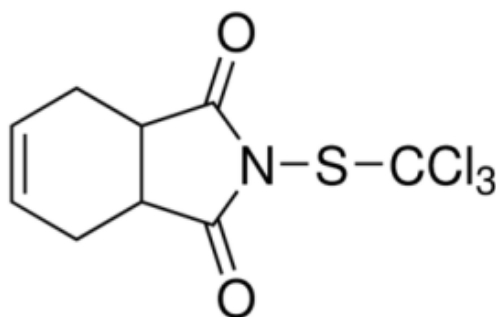


Figura 2. Estrutura química do captan

No Brasil existem oito produtos registrados que possuem em sua composição o captan como princípio ativo, sendo indicado para o controle de 27 diferentes espécies de fungos fitopatogênicos, em 21 culturas (MAPA, 2016).

O fator que determina a atividade fungicida do captan é o balanço entre a reatividade do grupo triclorometiltiol e a estabilidade da ligação do anel imida, uma vez que análogos com ligações muito estáveis são ineficientes como fungicidas, enquanto análogos com ligações fracas são espontaneamente degradados. De forma geral o captan interage com grupos tíois devido à hidrólise e liberação do grupo triclorometiltiol (Gordon, 2010).

A exposição de larvas de anfíbios (*Xenopus laevis* e *Pleurodeles waltl*) ao captan mostrou que o fungicida foi genotóxico, no qual o efeito foi dependente da concentração

utilizada e do tempo de exposição, os resultados foram obtidos a partir de ensaios de micronúcleos e cometa (Mouchet *et al.*, 2006).

Boran *et al.* (2012) mostraram que o captan apresentou toxicidade aguda em formas jovens de trutas, com os efeitos letais iniciando após seis horas de exposição. Marcadores histopatológicos também foram observados, como a necrose de células epiteliais, separação do epitélio da lamela e hipertrofia. Os peixes expostos também apresentaram inflamação e necrose no fígado, rins e baço.

Em hepatócitos de ratos, o captan induziu citotoxicidade e peroxidação de lipídios, sendo os efeitos dependentes do tempo de exposição e da dose aplicada. O tratamento com alfa-tocoferol preveniu os efeitos citotóxicos do fungicida, indicando uma ação pró-oxidante do captan (Suzuki *et al.*, 2004).

O captan induz mutação gênica em modelos microbianos e em sistemas *in vitro* utilizando células de mamíferos, nos quais também foram observados danos cromossômicos. Quando o fungicida foi avaliado em testes *in vivo* não foram constatados efeitos genotóxicos (Arce *et al.*, 2010).

Efeitos ambientais em organismos não alvos são observados em áreas onde ocorre a aplicação de captan, como a inibição do crescimento de bactérias desnitrificantes (Milenkovski *et al.*, 2010) e inibindo a respiração de bactérias não alvo (Rousk *et al.*, 2009).

O captan tem como principais alvos fungos filamentosos, porém ele também pode afetar leveduras. Os primeiros estudos, ainda na década de 50, mostraram que uvas com resíduo de captan atrasavam o início da fermentação em até dois dias, porém após esse período a fermentação continuava até o fim, sem alterações organolépticas (Castor *et al.*, 1957).

2.1.4 Dithianon

O dithianon (5,10-dihidro-5,10-dioxonafto[2, 3-b]-1,4-dithiine-2,3-dicarbonitrila) é um fungicida de amplo espectro de ação pertencente ao grupo das quinonas (Fig. 3). O fungicida foi introduzido no mercado em 1963 como um fungicida protetivo contra um amplo espectro de doenças fúngicas foliares. O dithianon é utilizado na cultura do pêssego, maçã e uva, sendo recomendado para o controle de cinco doenças diferentes (MAPA, 2016).

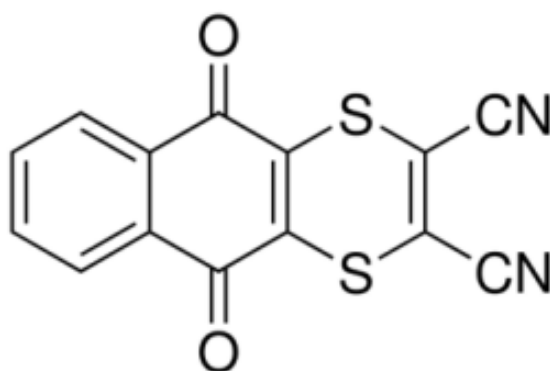


Figura 3. Estrutura química do dithianon

Em regiões de clima seco foi detectado que o dithianon permanece na superfície de uvas por um período de até 14 dias, mantendo sua concentração inicial de aplicação, entretanto quando o fungicida é adicionado ao mosto seu tempo de permanência não supera 24 horas (Allinson *et al.*, 1999).

O dithianon, quando testado sobre a linhagem celular BALB/c 3T3, apresentou efeitos citotóxicos em ensaios *in vitro*, observou-se que a adição de S9 ao sistema potencializava o efeito citotóxico do fungicida (Perocco *et al.*, 1993).

O efeito do dithianon em células de mamíferos está associado com alterações no citocromo P-450 (Paolini *et al.*, 1997). Alterações em enzimas como as testosteronas hidroxilases foram observadas em camundongos expostos ao fungicida (Pozzetti *et al.*, 1999).

O fungicida dithianon apresenta atividade toxica sobre leveduras, sendo ativo contra leveduras encontradas normalmente na superfície de maçãs (Gildemacher *et al.*, 2004).

2.1.5 Interferência de fungicidas em fermentações vínicas

Durante o processo de vinificação, as leveduras estão sujeitas a uma variedade de condições de estresse que incluem: alta osmolaridade, concentrações elevadas de etanol e ácidos orgânicos, limitação de nutrientes, acúmulo de metabólitos tóxicos e exposição a fungicidas, estes compostos podem induzir as leveduras a morte celular (Attfield, 1997; Bauer & Pretorius, 2000).

Embora os fungicidas sejam utilizados para o controle de fungos patogênicos para as videiras, eles acabam por interferir na população de leveduras presente nas uvas, como foi comprovado por Cadez *et al.* (2010), que avaliaram o efeito de fungicidas sobre a quantidade e diversidade de leveduras presentes na superfície de uvas e observaram que ocorria redução de ambos os fatores.

A utilização de fungicidas em estágios finais de maturação das uvas pode fazer com que eles sejam transferidos para os mostos e dessa forma interferir no processo de vinificação, conforme foi observado por Calhelha *et al.* (2006), que constataram a interferência de fungicidas no processo de vinificação, associados a redução da viabilidade das leveduras utilizadas no processo, ocasionando inclusive um atraso no início do processo fermentativo.

O fungicida pirimetanil quando aplicado em videiras para a produção de uvas que seriam posteriormente vinificadas de forma espontânea, sem a inoculação de leveduras, apresentou efeito negativo na diversidade de leveduras presentes no mosto, reduzindo a velocidade fermentativa e interferindo na conclusão da fermentação espontânea (Cus & Raspor, 2008).

Noguerol-Pato *et al.* (2014) avaliaram o efeito de fungicidas sobre a capacidade fermentativa de leveduras *S. cerevisiae* e mostraram que os fungicidas ametoctradin, dimetomorfe e mepanipirim, quando utilizados no nível máximo de resíduo permitido pela união europeia, interferiram na velocidade fermentativa, além de interferirem na biossíntese de compostos voláteis pelas leveduras, tendo como principal prejuízo à redução das características frutadas no vinho.

2.2 Sistemas de morte celular

A morte celular é um processo que pode ocorrer de forma natural ou induzida por fatores externos, podendo ocorrer de forma programada (apoptose e autofagia) ou de forma catastrófica (necrose).

2.2.1 Apoptose

Apoptose é um sistema de morte celular programada com papel importante no desenvolvimento e homeostase de organismos eucariotos, tendo como principais objetivos a eliminação de células danificadas, supérfluas ou infectadas. O termo apoptose foi sugerido inicialmente por Kerr *et al.* (1972), sendo utilizado para descrever alterações morfológicas observadas em células apoptóticas de mamíferos, que incluíam redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e nos estágios finais observa-se o engolfamento dessas células pelos fagócitos.

Embora o termo apoptose, na sua descrição original, se aplique a organismos pluricelulares, este fenômeno também é observado em leveduras. Conforme descrito por Madeo *et al.* (1997), uma linhagem de *S. cerevisiae* com uma mutação em *CDC48* (gene envolvido no ciclo celular durante a divisão) apresentou marcadores referentes ao processo apoptótico, como a exposição de fosfatidilserina, fragmentação nuclear, condensação da

cromatina e alterações na estrutura celular. As principais vias de indução de apoptose em *S. cerevisiae* estão apresentadas na figura 4.

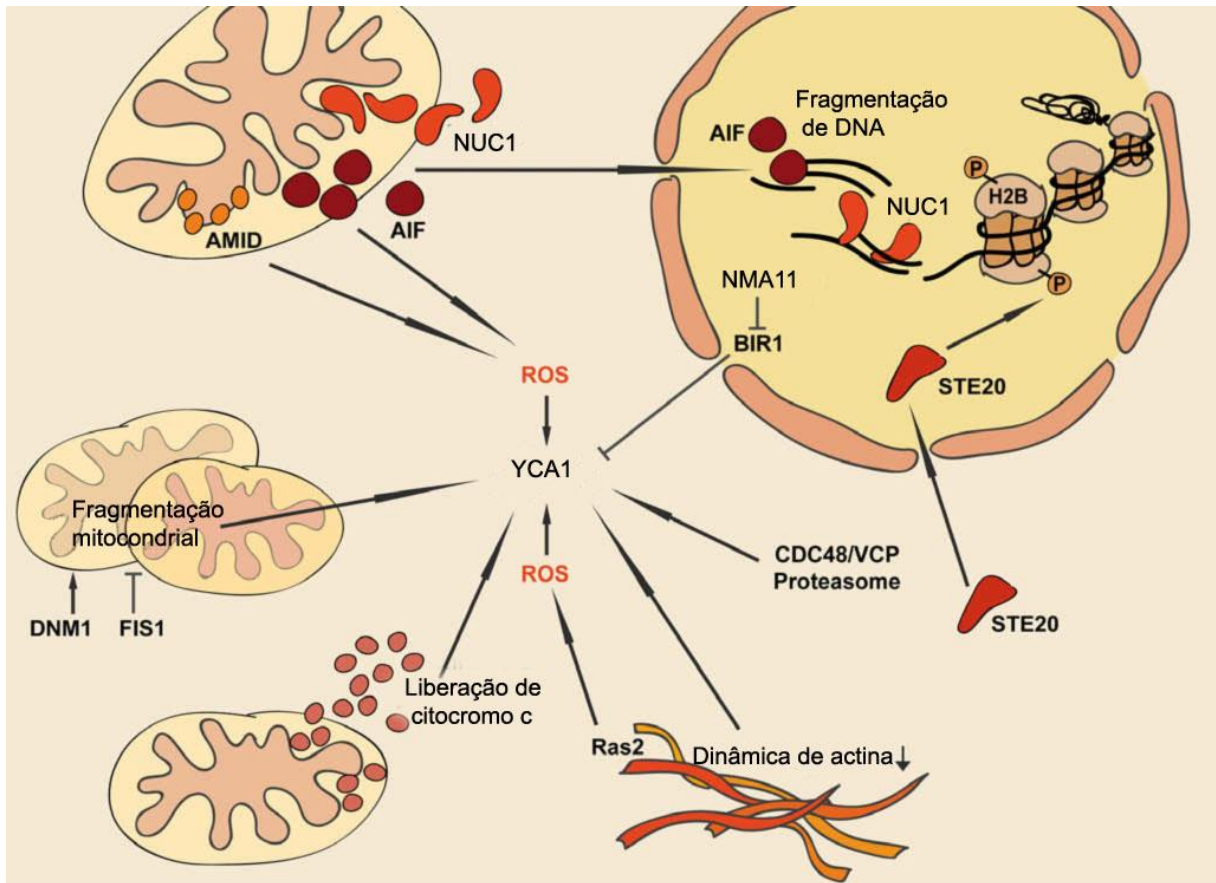


Figura 4. Vias de indução de apoptose em *S. cerevisiae* (Adaptado de Madeo *et al.*, 2009).

Assim como em mamíferos, espécies reativas de oxigênio apresentam papel central na regulação da apoptose em *S. cerevisiae* (Madeo *et al.*, 1999). A morte celular por apoptose é tipicamente acompanhada pela ativação de caspases, processo que depende da liberação do citocromo c, que atua como sinalizador para ativação das caspases (Ludovico *et al.*, 2002).

S. cerevisiae possui uma proteína que apresenta a função de caspase, sendo denominada metacaspase (*YCA1*). *YCA1* é o único gene homólogo as caspases em *S. cerevisiae*, ele codifica uma metacaspase que cliva substratos diferentes das caspases

tradicionais e exibe atividade endopeptidásica específica em resíduos de arginina e lisina (Wilkinson & Ramsdale, 2011).

Yca1p teve sua função descrita por Madeo *et al.* (2002), que mostraram que leveduras tratadas com doses reduzidas de H₂O₂ apresentavam marcadores apoptóticos, enquanto a linhagem que não possuía o gene *YCA1* funcional era menos afetada pelo tratamento com H₂O₂. Além disso, a superexpressão de *YCA1* leva a um aumento dos marcadores apoptóticos, resultando em uma morte celular prematura.

Estímulos externos são capazes de induzir apoptose com ativação da metacaspase em *S. cerevisiae*, como a exposição ao ácido valpróico (Mitsui *et al.*, 2005), ao arsênico (Du *et al.*, 2007), alguns íons metálicos também apresentam efeito, como o manganês (Liang & Zhou, 2007), o chumbo (Bussche & Soares, 2011) e o cádmio (Nargund *et al.*, 2008).

A indução de morte celular programada é observada em diferentes condições fisiológicas nas leveduras, como a presença de pequenas quantidades de feromônios de conjugação (Severin & Hyman, 2002), durante o desenvolvimento de colônias em meio sólido (Vachova & Palkova, 2005), a exposição a toxinas *killer* (Reiter *et al.*, 2005) e durante o processo de envelhecimento (Herker *et al.*, 2004).

Algumas substâncias são capazes de induzir apoptose em *S. cerevisiae*, porém não dependem, ou dependem parcialmente, da funcionalidade de Yca1p. O ácido acético induz leveduras à morte celular apoptótica (Ludovico *et al.*, 2001), sendo relacionado com a indução de *YCA1* (Madeo *et al.*, 2002), porém leveduras com deleção no gene *YCA1*, assim como leveduras tratadas com z-VAD-fmk (inibidor de caspases), continuaram a exibir marcadores apoptóticos de forma similar à linhagem selvagem (Guaragnella *et al.*, 2006), indicando vias alternativas de indução apoptótica por ácido acético.

Uma dessas vias alternativas que levam à apoptose é o fator indutor de apoptose (AIF1), uma flavoproteína com atividade oxidoredutase, que está localizada no espaço

intermembranas na mitocôndria (Susin *et al.*, 1999). *S. cerevisiae* apresenta um homólogo à AIF encontrada em mamíferos (*AIF1*), que está localizada na mitocôndria e é translocada para o núcleo das células em resposta a estímulos apoptóticos. No núcleo Aif1p leva a fragmentação do DNA e condensação da cromatina. Leveduras com *AIF1* não funcional apresentam maior resistência ao estresse oxidativo e atrasam os efeitos apoptóticos ocasionados em células velhas. Observa-se também que a superexpressão de Aif1p estimula a morte celular por apoptose em leveduras tratadas com H₂O₂ (Wissing *et al.*, 2004).

Outra proteína que atua no processo de morte celular em *S. cerevisiae* é a Nuc1p, uma proteína ortóloga a endonuclease G de mamíferos. Assim como a Aif1p, Nuc1p também está localizada originalmente nas mitocôndrias e é translocada para o núcleo a partir de estímulos apoptóticos. Nuc1p induz apoptose em leveduras independentemente da ativação da metacaspase ou de Aif1p, embora haja a necessidade da fosforilação da histona H2B (Büttner *et al.*, 2007).

Nma111p (mediador nuclear de apoptose) é outra proteína importante durante a morte celular apoptótica. Células de leveduras com *NMA111* não funcional sobrevivem melhor em condições de estresse por temperatura e não apresentam marcadores apoptóticos após tratamento com H₂O₂. A função letal de Nma111p depende de sua atividade serina-protease, sendo encontrado apenas no núcleo das leveduras (Fahrenkrog *et al.*, 2004).

Um dos substratos de Nma111p é Bir1p, o único inibidor de apoptose conhecido em *S. cerevisiae*. Em condições de estresse oxidativo, linhagens com deleção em *BIR1* apresentam aumento na apoptose, enquanto a superexpressão de Bir1p reduz a morte celular, efeito que pode ser revertido pela superexpressão simultânea de Nma111p (Walter *et al.*, 2006).

Os marcadores utilizados para determinar a presença de apoptose em leveduras incluem a exposição da fosfatidilserina, produção de ROS, condensação da cromatina,

quebras de fita simples de DNA (Madeo *et al.*, 1999), alteração no potencial de membrana mitocondrial (Fannjiang *et al.*, 2004), e fosforilação da histona H2B (Ahn *et al.*, 2005).

2.2.2 Autofagia

A autofagia evoluiu provavelmente como um mecanismo celular para a sobrevivência em ambientes com limitações nutricionais, estando ativa em níveis basais na maioria das células, como mecanismo de manutenção da homeostase celular. A autofagia é rapidamente ativada quando a demanda energética da célula aumenta e não é capaz de ser suprida pelos combustíveis contidos na célula, por exemplo, durante os períodos de fome (Kourtis & Tavernarakis, 2009).

O principal marcador morfológico da autofagia é a formação do autofagossomo, uma vesícula com membrana dupla, onde os componentes citoplasmáticos são sequestrados de forma aleatória (autofagia não-seletiva) ou de forma seletiva (autofagia seletiva).

A autofagia seletiva promove a sobrevivência da célula, pois remove agregados proteicos, mitocôndrias (mitofagia), peroxissomos (pexofagia), lipídios e retículo endoplasmático. Após a fusão com o vacúolo o material é degradado a moléculas mais simples, que são liberadas para o citoplasma onde são reutilizadas (Suzuki, 2013).

Apesar da autofagia ser um sistema essencial para a sobrevivência da célula, a autofagia também pode levar à morte celular. A morte celular por autofagia é morfolologicamente caracterizada como uma forma de morte celular que ocorre na ausência de condensação da cromatina, sendo acompanhada por uma vasta vacuolização autofágica de citoplasma (Galluzzi *et al.*, 2012).

2.2.3 Necrose

O processo de morte celular programada requer a ativação orquestrada e sequencial de eventos, sendo regulado de forma específica pela célula. De forma geral, esse processo confere ao organismo, ou no caso de leveduras à população de células, uma vantagem no ambiente (Büttner *et al.*, 2006). Entretanto, a morte celular pode ocorrer de forma catastrófica, onde não há uma programação para que a célula seja destruída, esse processo é denominado necrose.

A necrose foi inicialmente descrita por Walker *et al.* (1988), sendo considerada uma forma de morte acidental e sem controle. A célula necrótica é morfológicamente caracterizada por um aumento no volume celular, alterações em organelas e rupturas na membrana plasmática, seguido por perda de componentes intracelulares. Alterações no balanço energético e degradação não específica do DNA também são características observadas (Zong & Thompson, 2006).

Existem várias substâncias que induzem a necrose em leveduras, algumas atuam como indutores apoptóticos quando utilizadas em doses baixas, porém as células apresentam marcadores tipicamente necróticos quando essa dose é elevada, nesse grupo estão o ácido acético e o H_2O_2 (Madeo *et al.*, 1999; Ludovico *et al.*, 2001). Metais como o cobre e o manganês também apresentam esse comportamento (Liang & Zhou, 2007).

A morte celular por necrose é identificada pela ausência de marcadores apoptóticos, de forma particular a observação da perda da integridade da membrana plasmática. Marcadores adicionais incluem liberação da proteína Nhp6Ap (HMGB1) do núcleo para o citosol e a completa desintegração das estruturas celulares, observada por microscopia (Eisenberg *et al.*, 2009).

2.3 Sistemas de resposta

As leveduras estão constantemente expostas a uma infinidade de variações ambientais,

incluindo flutuações de nutrientes, desbalanço osmótico, exposição a moléculas tóxicas e variações de temperaturas. Enquanto organismos multicelulares conseguem alterar estas condições alterando sua fisiologia ou alterando seu posicionamento no ambiente, organismos unicelulares devem se adaptar ou perecer (Morano *et al.*, 2012).

2.3.1 O sistema de resposta ao estresse oxidativo

A exposição ao oxigênio atmosférico facilitou a evolução da vida como se conhece hoje, porém formas reduzidas de oxigênio, denominadas espécies reativas de oxigênio (ROS), podem apresentar propriedades tóxicas e mutagênicas. Para mitigar o efeito deletério de ROS, as células desenvolveram um complexo sistema de resposta e montagem de mecanismos defensivos (Diezmann, 2014).

A produção intrínseca de radicais livres ocorre principalmente através do metabolismo aeróbico, via fosforilação oxidativa, sistema utilizado para a produção de ATP, onde elétrons são transportados por proteínas até seu aceptor final, o oxigênio molecular, formando água. O escape desses elétrons da cadeia respiratória pode resultar na redução do oxigênio gerando ROS nas células da levedura (Murphy, 2009). A levedura também pode induzir a geração de ROS pela exposição a vários agentes exógenos, incluindo luz ultravioleta, radiação ionizante e xenobióticos (Halliwell, 2006).

A proteção das leveduras a níveis elevados de ROS envolve a montagem de um sistema defensivo de reposta, dessa forma prevenindo a morte celular pela desestruturação do balanço redox da célula. Essa resposta ao estresse oxidativo envolve a regulação transcricional de genes que irão formar proteínas para estabilizar o estado redox da célula e protege-la do dano oxidativo (Halliwell, 2006). Como fatores de transcrição envolvidos na resposta ao estresse oxidativo em *S cerevisiae* existem três sistemas: Yap1, Skn7 e Msn2/4.

2.3.1.1 Yap1

Em *S. cerevisiae* o fator de transcrição Yap1 tem papel central na resposta antioxidante. Yap1 é essencial para tolerância da levedura a agentes oxidantes como H₂O₂ e metais pesados como o cádmio (Kuge & Jones, 1994; Vido *et al.*, 2001).

A proteína Yap1p é regulada pela sua localização subcelular. Em uma condição sem estresse o receptor de exportação Crm1p se liga a Yap1p nuclear e exporta Yap1p do núcleo para o citoplasma (Kuge *et al.*, 1997; Kuge *et al.*, 2001). O estresse por peróxido de hidrogênio leva a formação de pontes dissulfeto entre cisteínas em uma região carboxi-terminal rica em cisteínas e uma região amino-terminal rica em cisteínas causando alterações conformacionais que impedem a interação de Yap1p com Crm1p resultando em uma acumulação nuclear de Yap1p (Yan *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 2003a).

A presença de peróxido de hidrogênio é inicialmente detectada pela peroxidase Gpx3p, que envia um sinal para Yap1p pela formação de um intermediário Yap1p-Gpx3p que são conectados por uma ligação de dissulfeto (Delaunay *et al.*, 2002). Além de Gpx3p, Ybp1p também é requerido para a ativação de Yap1p por peróxido de hidrogênio, pois o intermediário Yap1p-Gpx3p não é formado em ausência de Ybp1p (Veal *et al.*, 2003).

2.3.1.2 Skn7

O fator de transcrição Skn7p está localizado constitutivamente no núcleo da célula e regula a expressão tanto de genes de resposta ao estresse osmótico, quanto genes de resposta ao estresse oxidativo, embora atue de forma diferente nas duas situações (He *et al.*, 2009).

A ativação de Skn7p pelo estresse osmótico depende da fosforilação do domínio receptor aspartato pela histidina quinase Sln1 (Ketela *et al.*, 1998), enquanto sua ativação em resposta ao estresse oxidativo induz um sistema fosforilativo de serina/treonina (He *et al.*, 2009), além de uma co-ativação com Yap1p (Mulford & Fassler, 2011).

2.3.1.3 Msn2/4

Em respostas a várias formas de estresse como choque osmótico, hipersalinidade, estresse por temperatura e estresse oxidativo, Msn2p e Msn4p são reversivelmente translocadas para o núcleo, onde elas se ligam aos elementos de resposta ao estresse (STRE) (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt & McEntee, 1996).

A importância de Msn2/4 na resposta ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae* foi observada em leveduras mutantes $\Delta msn2\Delta msn4$, que apresentam sensibilidade à concentrações elevadas de H_2O_2 e deficiência na adaptação às baixas concentrações de H_2O_2 (Hasan *et al.*, 2002).

2.3.2 Defesas antioxidantes

As defesas antioxidantes constituem um conjunto de enzimas e moléculas que protegem as células dos efeitos danosos de espécies reativas (Halliwell, 2006). A seguir estão descritos os principais sistemas de defesa antioxidante presente em *S. cerevisiae*.

2.3.2.1 Superóxido dismutase

Superóxido dismutases (SODs) convertem o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que posteriormente pode ser reduzido à água pelas catalases ou peroxidases. SODs são antioxidantes que atuam de forma ampla, que diferem em sua localização intracelular e metais requeridos como cofatores nos diferentes organismos. A atividade enzimática das SODs é dependente do ciclo redox e do cofator metálico associado. As leveduras possuem uma SOD citoplasmática dependente de cobre e zinco (*SOD1*) e uma SOD da matriz mitocondrial dependente de manganês (*SOD2*), que apresentam função similar durante condições de estresse oxidativo (Culotta *et al.*, 2006).

Células com deleção em *SOD1* são hipersensíveis a agentes formadores de superóxido como o paraquat e apresentam vários fenótipos relacionados com o estresse oxidativo (Culotta, 2000). Embora Sod1p seja predominantemente citosólico, ele também é encontrado na mitocôndria no espaço intermembranas, cuja função é a desintoxicação do superóxido formado durante a respiração (Sturtz *et al.*, 2001).

Leveduras mutantes deletadas em *SOD2* são menos afetadas por condições de estresse oxidativo quando comparadas com mutantes em *SOD1*, mas ainda assim apresentam limitações no crescimento em condições não-fermentativas (van Loon *et al.*, 1986). Sod2p é requerido durante o crescimento em fase estacionária, que pode ser relacionado com a geração de superóxido pela respiração mitocondrial (Longo *et al.*, 1996).

2.3.2.2 Catalases

Catalases são enzimas que catalisam a conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Leveduras possuem duas dessas enzimas, uma catalase A peroxissomal (*CTA1*), e uma catalase T citosólica (*CTT1*).

A expressão de *CTA1* está relacionada com o metabolismo de ácidos graxos nos peroxissomos, indicando que Cta1p atua na desintoxicação do peróxido de hidrogênio formado durante a β -oxidação de ácidos graxos (Hiltunen *et al.*, 2003).

Enquanto isso Ctt1p atua de forma mais geral na sua ação antioxidante, uma vez que a expressão de *CTT1* é induzida por diversos fatores de estresse incluindo calor, pressão osmótica, falta de nutrientes, e estresse por peróxido de hidrogênio (Martinez-Pastor *et al.*, 1996).

2.3.2.3 Tiorredoxinas

A levedura possui duas tiorredoxinas citoplasmáticas, denominadas Trx1 e Trx2, cuja

transcrição é induzida por diversos fatores ambientais, incluindo o estresse oxidativo e a fase de crescimento. As tioredoxinas citoplasmáticas oxidadas são reduzidas posteriormente pela tioredoxina redutase Trr1 com o consumo de NADPH (Kuge & Jones, 1994; Garrido & Grant, 2002). Além do sistema citoplasmático da tioredoxina, a levedura também possui um conjunto na matriz mitocondrial que corresponde a tioredoxina Trx3 e a tioredoxina redutase Trr2 (Pedrajas *et al.*, 1999).

Em leveduras com deleção em ambas tioredoxinas citoplasmáticas ($\Delta tr1\Delta trx2$) observam-se três comportamentos distintos. O primeiro é um prolongamento da fase S e uma redução da fase G1 durante o ciclo celular (Muller, 1991). O segundo fenótipo observado é uma auxotrofia para os aminoácidos contendo enxofre, pois as tioredoxinas são essenciais para a atividade da enzima 3'-fosfoadenilsulfato redutase, responsável pela assimilação de sulfato inorgânico (Vignols *et al.*, 2005). O terceiro fenótipo é uma redução na tolerância a peróxidos, como consequência de múltiplos defeitos na via dos peróxidos (Garrido & Grant, 2002).

2.3.2.4 Peroxirredoxinas

As peroxirredoxinas possuem um papel amplo na proteção de estresses, atuando como antioxidante, chaperonas e sistema de regulação (Wood *et al.*, 2003b). As peroxirredoxinas utilizam os resíduos de cisteína com atividade redox para reduzir o peróxido, são divididas em dois grupos, caracterizados pelo número de resíduos de cisteína envolvidos diretamente na atividade catalítica.

Um grupo possui duas cisteínas no sítio catalítico e de forma geral as peroxirredoxinas deste grupo são ativas na forma de dímeros, atuando na redução do peróxido pela oxidação de um resíduo de cisteína a ácido sulfênico, que condensa com outra cisteína para formar um dissulfito reduzido posteriormente pela tioredoxina (Chae *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2000).

Três peroxirredoxinas citoplasmáticas deste grupo foram descritas em *S. cerevisiae* (Tsa1, Tsa2 e Ahp1). As três apresentam atividade tiorredoxina peroxidase, mas atuam de forma diferente na célula. Tsa1 é a peroxirredoxina mais abundante e é crucial para a resistência a peróxido de hidrogênio exógeno, sendo requerido durante o crescimento aeróbico, onde sua deleção leva a um aumento no número de mutações espontâneas, como resultado da produção intrínseca de espécies reativas (Iraqi *et al.*, 2009). Tsa1 é importante para a longevidade de leveduras e é requerido para a extensão do *lifespan* induzido pela restrição calórica (Molin *et al.*, 2011), atuando também na estabilização de espécies reativas produzidas em decorrência da formação de agregados proteicos (Weids & Grant, 2014). Tsa2 possui alta homologia com Tsa1 e apresenta atividade peroxidásica similar, mas é expressa em níveis menores do que Tsa1 (Jang *et al.*, 2004). A peroxirredoxina Ahp1 atua como antioxidante, mas possui maior eficiência catalítica com hidroperóxidos de alquila do que com peróxido de hidrogênio (Lee *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000).

O segundo grupo de peroxirredoxinas possui somente uma cisteína no sítio catalítico e em *S. cerevisiae* apresenta apenas um representante, Prx1. Como Prx1 não apresenta as duas cisteínas que catalisam a redução do peróxido, Prx1 faz apenas parte do processo, não conseguindo formar o dissulfito, portanto ele precisa de algum outro agente doador de elétrons (Wood *et al.*, 2003b). Posteriormente, observou-se que o resíduo de cisteína catalítico quando oxidado por peróxido de hidrogênio formava o ácido sulfênico que era estabilizado por GSH formando Prx1 glutathionilado (Greetham & Grant, 2009). A regeneração de Prx1 ocorre pela ação de Trx2 (Greetham & Grant, 2009), que o reduz, ou alternativamente pela glutarredoxina Grx2 (Pedrajas *et al.*, 2010).

2.3.2.5 Sistema glutathiona

A glutathiona (γ -glutamilcisteína glicina) é um dos antioxidantes mais abundantes e

importantes atuando no interior das células eucarióticas. Embora a glutathione atue principalmente na estabilização de espécies reativas, ela possui outras funções no metabolismo celular, incluindo o transporte de aminoácidos, a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, a modulação da atividade de algumas enzimas e o metabolismo de xenobióticos (Schafer & Buettner, 2001).

A biossíntese de glutathione em *S. cerevisiae* ocorre em duas etapas, na primeira uma cisteína é ligada com um glutamato pela γ -glutamylcysteína sintetase (codificado por *GSH1*) para formar γ -glutamylcisteína. Na segunda etapa uma glicina é adicionada ao intermediário pela glutathione sintetase (codificado por *GSH2*) formando glutathione (Mendoza-Còzatl *et al.*, 2005).

No interior da célula a glutathione se encontra na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). Durante um processo de estresse oxidativo grande quantidade de GSSG pode ser formada, que posteriormente é convertida novamente a GSH pela ação da glutathione redutase (Glr1), com a utilização de uma molécula de NADPH (Collinson & Dawes, 1995).

A glutathione redutase é uma oxidoredutase NADPH dependente que converte GSSG em GSH utilizando o poder redutor da via das pentoses fosfato. *GLR1* não é essencial para o crescimento aeróbico de leveduras, mas é requerido para manter a viabilidade durante condições de estresse oxidativo e períodos de limitação nutricional (Grant *et al.*, 1996).

Além da capacidade de varredura de radicais livres, a glutathione atua como doador de elétrons para enzimas antioxidantes, incluindo glutathione transferases, glutathione peroxidases e glutathione redoxinas (Galiano *et al.*, 1987; Inoue *et al.*, 1999).

Glutathione transferases formam uma família de proteínas que estão envolvidas na detoxificação de vários compostos xenobióticos. Elas catalisam a conjugação de compostos não polares, que contenham um átomo eletrofílico de carbono, enxofre ou nitrogênio, com GSH. Então ocorre a remoção dos mesmos da célula, pela bomba Ycf1 (Sheehan *et al.*, 2001).

Glutathione peroxidases são enzimas que atuam na defesa contra o estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos. Três glutathione peroxidases são encontradas em *S. cerevisiae*, Gpx1, Gpx2 e Gpx3 (Inoue *et al.*, 1999). Análises genéticas e fenotípicas mostram que *GPX1* foi induzida por limitação de glicose, *GPX2* foi induzida por estresse oxidativo e o gene *GPX3* apresentou expressão constitutiva (Avery & Avery, 2001).

Existem duas glutaredoxinas em leveduras, Grx1 e Grx2, que apresentam funções distintas na célula. Linhagens de leveduras com deleção em *GRX1* são sensíveis ao estresse oxidativo causado pelo íon superóxido, enquanto linhagens com deleção em *GRX2* apresentam sensibilidade ao peróxido de hidrogênio (Luikenhuis *et al.*, 1997).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos fungicidas mancozeb, captan e dithianon sobre a levedura *S. cerevisiae*, elucidando a forma de morte celular ocasionada pelos mesmos.

3.2 Objetivos específicos

- determinar a viabilidade de leveduras expostas a distintas concentrações dos fungicidas captan, dithianon e mancozeb em diferentes tempos;
- avaliar a integridade da membrana celular de leveduras tratadas com os fungicidas;
- quantificar a acumulação de espécies reativas de oxigênio em leveduras tratadas com fungicidas;
- verificar a atividade dos fungicidas sobre grupos tióis e avaliar o efeito protetivo de antioxidantes em leveduras tratadas com fungicidas;
- avaliar a presença de marcadores necróticos e apoptóticos e definir a via apoptótica seguida em leveduras expostas aos fungicidas;
- avaliar a interferência dos fungicidas em fermentações vínicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de capítulos, onde cada capítulo engloba um artigo.

- The fungicide Mancozeb induces metacaspase-dependent apoptotic cell death in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741

- Captan toxicity on *Saccharomyces cerevisiae*: a dual necrotic and apoptotic cell death

- The effect of the fungicide captan on *Saccharomyces cerevisiae* and wine fermentation

- Morte celular necrótica induzida pelo fungicida dithianon em *Saccharomyces cerevisiae*

4.1 CAPÍTULO 1

The fungicide Mancozeb induces metacaspase-dependent apoptotic cell death in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741

F. J. Scariot; L. M. Jahn; J. P. Maianti; A. P. L. Delamare; S. Echeverrigaray

Artigo publicado na revista **Apoptosis** (2016) 21:866–872.

The fungicide Mancozeb induces metacaspase-dependent apoptotic cell death in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741

F. J. Scariot¹ · L. M. Jahn¹ · J. P. Maianti² · A. P. L. Delamare¹ · S. Echeverrigaray^{1,3}

Published online: 9 May 2016

© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Mancozeb (MZ), a mixture of ethylene-bis-dithiocarbamate manganese and zinc salts, is one of the most widely used fungicides in agriculture. Toxicologic studies in mammals and mammalian cells indicate that this fungicide can cause neurological and cytological disorders, putatively associated with pro-oxidant and apoptotic effects. Yeast adaptation to sub-inhibitory concentrations of MZ has been correlated with oxidative response, proteins degradation, and energy metabolism, and its main effect on yeast has been attributed to its high reactivity with thiol groups in proteins. Herein, we show that acute MZ treatments on aerobic exponentially growing yeast of wild type (BY4741) and deletion mutant strains, coupled with multiplex flow cytometry analysis, conclusively demonstrated that MZ displays the typical features of pro-oxidant activity on *Saccharomyces*, elevating mitochondrial ROS, and causing hyper-polarization of mitochondrial membranes leading to apoptosis. A drastic reduction of cellular viability associated with the maintenance of cell membrane integrity, as well as phosphatidyl serine

externalization on yeast cells exposed to MZ, also supports an apoptotic mode of action. Moreover, abrogation of the apoptotic response in *yca1* deficient mutants indicates that metacaspase-1 is involved in the programmed cell death mechanism induced by MZ in yeast.

Keywords Dithiocarbamate · Programmed cell death · Yeast · ROS · Mitochondrial membrane potential

Introduction

Mancozeb (MZ) is an agricultural fungicide formed by a mixture of manganese and zinc salts of the organosulfur compound ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC). The broad spectrum of MZ against phytopathogenic fungi has led to the wide application of this fungicide in agriculture worldwide, particularly on several fruits, including vineyards [1]. Despite its relatively low acute toxicity and limited environmental persistence, acute exposure to MZ and other dithiocarbamates has been putatively linked to adverse effects such as skin diseases, immune disorders, neurotoxicity, and Parkinson's Disease, as well as several forms of cancer [2–6].

Experimental data using mammalian cell lines indicate that MZ induces mitochondrial dysfunction, DNA damage, and apoptosis in rat cells [5, 6], as well as in human lymphocytes [7]. These effects have been associated with MZ's pro-oxidant activity [5, 6, 8]. Although not completely understood, the mode of action of MZ on mammalian cells has been attributed to both the EBDC and manganese components. The metal is capable of induction of reactive oxygen species (ROS) via an oxidase-dependent redox cycling [6], while the organosulfur component may inhibit the activity enzymes and introduce unspecific

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10495-016-1251-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ S. Echeverrigaray
selaguna@ucs.br

¹ Laboratory of Applied Microbiology, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Rua Francisco G. Vargas 1130, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul 95070-560, Brazil

² Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA

³ Cytogene Diagnósticos Moleculares Ltda., Lageado, Rio Grande do Sul, Brazil

protein damage due to its high reactivity with thiol groups [9].

Beyond plant pathogens, MZ exhibits antifungal activity against single cell yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and this has been known to negatively affect the fermentation of wine [10]. Studies on this model organism have focused on the mechanisms of resistance with the objective to understand the global response and tolerance to MZ in eukaryotic cells. Proteome analysis of *S. cerevisiae* following adaptation to sub-inhibitory concentrations of MZ showed that upregulated genes were involved with the yeast response to oxidative stress, protein translation, initiation and folding, disassembly of protein aggregates, and degradation of damaged proteins [11]. Subsequently, a chemogenomic approach led to the identification of 286 genes that provided protection against MZ in *S. cerevisiae* [12]. Gene ontology and genetic interaction analysis of this dataset highlighted the role of oxidative stress response, protein degradation, and carbohydrate/energy metabolism in MZ tolerance. Both studies showed that the vast majority of the up-regulated genes under MZ stress were downstream targets of the major oxidative stress regulator in yeast (Yap1p). Moreover, other studies showed that MZ resistance in yeast also involves up-regulation of *FLR1*, a proton-driven multidrug antiporter channel, which is under coordinated control by the transcription factors Yap1p, Rpn4p, Pdr3p, and Yrr1p [13, 14].

Despite the well-established consequences of MZ on mitochondrial dysfunction in mammalian cells [5–7], the corresponding experimental measurements in yeast cells did not reveal elevated ROS production in response to this fungicide [12]. The authors attributed this observation to the low biochemical respiration of fermenting yeasts, assuming an absence of mitochondrial electron leakage under these conditions. However, anoxic conditions are not representative for plant pathogens treated with MZ, and a role for mitochondria should be suspected due to the partial tolerance reported for *petit* mutants compared to wild type *S. cerevisiae* [15].

In the present work, we show that MZ has a pro-oxidant activity on aerobically grown *S. cerevisiae* in exponential phase, triggering an apoptotic metacaspase-dependent cell death mechanism, which demonstrates the induction of oxidative stress response is common to yeast and mammalian cell toxicity of MZ.

Materials and methods

Yeast strains and media

Saccharomyces cerevisiae BY4741 (MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0) and the isogenic mutants Y0233

(*yca1::kanMX4*), Y0233 (*aif1::kanMX4*) and Y01217 (*nuc1::kanMX4*) were obtained from Euroscarf (Frankfurt, Germany).

Yeasts were cultured at 28 °C with orbital shaking (150 rpm) in YEPD broth (2 % yeast extract, 1 % peptone, 2 % glucose, pH 6.5) or SD medium (0.67 % Yeast Nitrogen Base without aminoacids, 2 % glucose, with 20 mg/L histidine, methionine, and uracil, and 60 mg/L leucine, pH 6.5). Mancozeb was purchased from Sigma-Aldrich, and stock solutions (10 mM in dimethylsulfoxide, DMSO) were prepared just before each experiment.

Yeast growth and viability assay

Yeasts from overnight cultures in YEPD broth (OD₆₀₀ ~1.0) were inoculated in the same medium, and grown to exponential phase (OD₆₀₀ up to 0.7) at 28 °C with orbital shaking (150 rpm). Cells were harvested by centrifugation, washed with 0.9 % NaCl, and cell density adjusted to 10⁷ cells/ml in SD medium. Control cultures (untreated) or those treated with MZ in the indicated concentrations were incubated for 360 min (6 h) at 28 °C with shaking (150 rpm), unless the time/concentration in initial experiments.

The viability of MZ-treated and untreated yeasts was determined by spot assay. Cultures were diluted at tenfold series, and aliquots (10 µl) of each dilution were spotted onto YEPD plates. Colony were enumerated after 48 and 72 h incubation at 28 °C, and expressed as percentage of colony forming units (c.f.u.) compared with the control (untreated cells).

Assays for ROS, apoptosis, and other markers

Phosphatidylserine externalization, cell membrane integrity, ROS production, mitochondrial membrane potential, and cell cycle evaluation were performed by flow cytometry using a FACSCalibur (Becton–Dickinson) instrument equipped with an argon-ion laser emitting at 488 nm. For flow analysis, MZ-treated (100 µM) and untreated cultures were harvested, washed, suspended in PBS (pH 7.4), and immediately analyzed (except for Annexin V/7-AAD and cell cycle assays). In all the experiments, yeast cells were initially gated using forward- and side-scatter, and 10,000 cells were included for each analysis.

Apoptosis was measured quantifying the levels of detectable phosphatidylserine on the outer membranes of yeast cells using the Annexin V-PE/7-AAD apoptosis detection kit (BD Pharmingen). Briefly, yeast cells were harvested, and washed in sorbitol buffer (1.2 M sorbitol; 0.5 mM MgCl₂; 35 mM K₂HPO₄; pH 6.8), and spheroplasts were obtained by treatment with Zymolyase (5 U/ml) at 30 °C for 1 h. Spheroplasts were collected by

centrifugation at low speed (1000 rpm), and suspended in 100 μ l of binding buffer (1.2 M sorbitol; 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4; 140 mM NaCl; 2.5 mM CaCl_2). Staining and flow cytometry analysis were performed following the manufacturer instructions. Cells untreated and treated with H_2O_2 (50 mM) were used as negative and positive controls, respectively.

Cell membrane integrity was evaluated using the LIFE/DEAD FungaLight Yeast Viability kit (Invitrogen) that includes two nucleic acid dyes: SYTO[®] 9, a green-fluorescent that stain both integral and damaged cells, and the red-fluorescent propidium iodide, which penetrates only in membrane-damaged cells. Staining and flow cytometry analysis followed kit instructions.

Intracellular ROS were detected using the oxidant-sensitive dyes dihydro-rhodamine-123 (DHR123, Sigma), dihydroethidium (DHE, Sigma), and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA , Sigma). Stock solutions were prepared by dissolving DHR123 at 2 mg/ml in ethanol; and DHE and H_2DCFDA at 5 mg/ml in DMSO. Staining was performed in 500 μ l for MZ-treated and untreated samples using a final concentration of 10, 5 and 5 μ g/ml for each dye, respectively. Samples were evaluated by flow cytometry using FL1 channel (488/533) for DHR123 and H_2DCFDA , and FL3 (488/670) for DHE.

To evaluate mitochondrial membrane potential, cells obtained as described above were suspended in SD medium, and stained with 175 nM of 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6) for 30 min at 30 °C in the dark. After staining, cells were analyzed by flow cytometry using FL1 filter.

Cell cycle phase was evaluated by flow cytometry following the procedure reported by Delobel and Tesnière [16].

Results

First, we established the required concentration of MZ to attain 5 to 10 % viability for exponentially aerobic growing cells of *S. cerevisiae* BY4741 under acute exposure conditions (Fig. 1). We observed a dose- and time-dependent reduction on cell viability and identified the concentration of 100 μ M (26.6 mg/l MZ), which produced a reduction of 95.2 % c.f.u. after 6 h of MZ treatment, and this condition was selected for further analysis.

Provided that the deleterious effect of MZ and other dithiocarbamates on mammalian cells has been associated to pro-apoptotic activity [5, 6, 8], we compared the effect of MZ on the wild-strain (BY4741) and three isogenic mutants bearing deletions of key genes of the apoptotic pathways of *Saccharomyces*: $\Delta yca1$, $\Delta aif1$ and $\Delta nuc1$ [17]. The $\Delta yca1$ mutant strain exhibited significantly lower

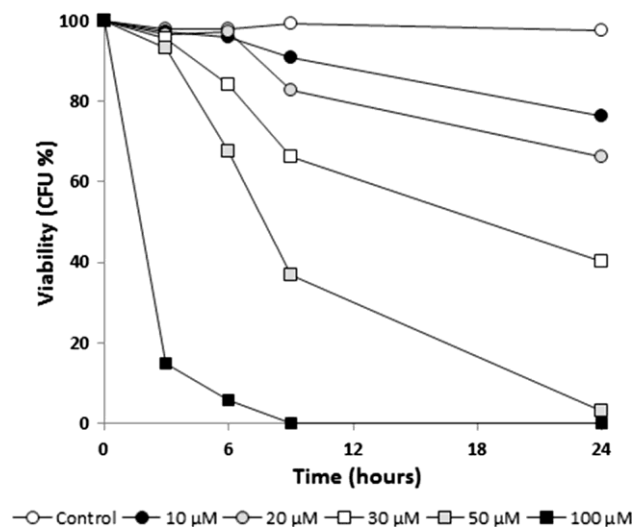


Fig. 1 Effect of MZ concentration and exposure time on the cell viability of *S. cerevisiae* BY4741. Results are the average of three independent experiments. Legend: MZ concentrations (μ M)

sensitivity to MZ compared to the wild-type yeast, as well as the $\Delta aif1$ or $\Delta nuc1$ mutant strains. These results indicated that a Yca1-dependent pathway may be implicated in yeast death induced by MZ (Fig. 2a, b).

We performed staining using the dye pair SYTO9/PI for flow cytometry analysis of untreated controls versus MZ-treated yeast of the wild-type and $\Delta yca1$ mutant strains, and we concomitantly analyzed c.f.u. viability (Fig. 3). The data showed that 82 % of wild-type cells treated with MZ (100 μ M) retain membrane integrity, even though this population shows compromised ability to multiply and form colonies. Contrastingly, we observed no significant differences between the percentage of PI-negative cells and c.f.u. viability for the $yca1$ mutant strain (Fig. 3).

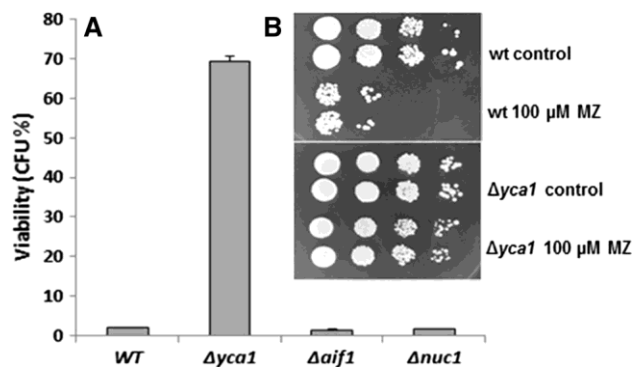


Fig. 2 Viability (% c.f.u./cell count) of wild-type BY4741 and mutants exposed to 100 μ M MZ for 6 h (a). Results are the average of three independent experiments, standard deviation are indicated as error bars. Inset showing the attenuated loss in cell viability for the metacaspase-1 defective mutant $\Delta yca1$ following MZ treatment compared to wild-type (b)

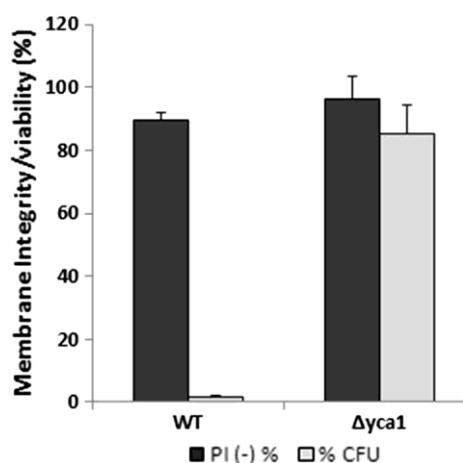


Fig. 3 Cell membrane integrity (% PI negative) and cell viability (% c.f.u.) of wild-type BY4741 yeast, and $\Delta yca1$ mutant strain treated for 6 h with 100 μ M MZ. Values are mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments. Means comparison: ***significantly different ($p < 0.001$); ns: non-significant difference

In order to confirm that MZ induces apoptosis in *Saccharomyces*, we compared wild-type and $\Delta yca1$ mutant yeast before and after MZ exposure, which we evaluated using the stains Annexin V-PE/7-AAD and analyzed by flow cytometry. Annexin V-PE binds to phosphatidylserine, an inner-membrane component externalized in the first steps of the apoptotic process, and 7-AAD is a nucleic acid dye that penetrates only membrane-damaged cells. The combination of these dyes allowed the identification of normal, apoptotic, necrotic, and apoptotic/necrotic cells [18]. Following MZ-treatment in the standard experimental conditions we observed 54 % of cells of the wild-type yeast strain were apoptotic (positive for Annexin V positive and negative for 7AAD), whereas these cells represented only 6.5 % for the $\Delta yca1$ mutant strain. However, the treatment did not produce significant differences in the number of necrotic cells of wild-type and $\Delta yca1$ mutant strains in the presence of MZ (Table 1).

ROS are one of the mayor factors triggering programmed cell death in different organisms, including yeasts [19, 20]. In order to determine whether ROS could be responsible for the apoptotic behavior of yeast cells treated with MZ, we evaluated ROS accumulation in exponentially growing cells of wild type and $\Delta yca1$ yeast strains, before and after MZ treatment. Three standard redox-sensitive probes were used: DH123, DHE, and H_2 -DCFDA (methods section). The results showed that MZ-treated cells of both strains labeled with DHE and DH123 exhibited increased fluorescence, indicating a high concentration of intracellular ROS (Fig. 4). MZ-treated cells stained with H_2 DCFDA showed decreased fluorescence intensity compared to control cells, consistent with

Table 1 Annexin V and 7AAD staining flow cytometry analysis of wild-type yeast and an isogenic $\Delta yca1$ mutant in the absence (Control) and presence of 100 μ M MZ (6 h)

	WT cell counts (%)		$\Delta yca1$ cell counts (%)	
	Control	100 μ M MZ	Control	100 μ M MZ
Annexin V (-) 7AAD (-)	94.60	40.50	94.50	89.45
Annexin V (+) 7AAD (-)	3.87	54.10	3.44	6.54
Annexin V (+) 7AAD (+)	1.11	4.55	1.13	3.34
Annexin V (-) 7AAD (+)	0.42	0.85	0.93	0.67

Values are the percentage of cells in the four quadrants (10,000 cell counts/treatment)

observations reported by Dias et al. [12], (data not shown). Moreover, a comparison of median fluorescence intensity from stains DHE and DH123 (Fig. 4), showed that MZ triggers higher ROS production in the wild-type than in the $\Delta yca1$ strain.

The relationship between mitochondrial dysfunction and apoptosis is well established in yeast and mammalian cells when submitted to oxidative stress. We measured the effect of MZ on the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) of yeast cells using the mitochondria-specific voltage-dependent dye DiOC₆, which aggregates into healthy mitochondria and produces green fluorescence. As shown in Fig. 5, MZ-treated cells of both wild-type and $yca1$ mutant strains exhibited increased fluorescence compared to controls, indicating that MZ induces hyper-polarization of yeast mitochondrial membranes.

To exclude the possibility of interfering effects of MZ fungicide with the yeast cell cycle and proliferation we evaluated MZ-treated and untreated wild-type and $\Delta yca1$ yeast strains by flow cytometry using the nucleic acid binding dye SYTO9. The results showed no significant modification of the percentage of cells in G1, S, and G2 stages, indicating that the fungicide did not interfere with cell cycling (Table 2).

Discussion

Based on the results of initial experiments (Fig. 1), we selected a 6 h treatment with 100 μ M MZ, which is almost tenfold lower than the recommended field spray application of 200–250 g MZ per 100 l of water. This treatment produced the shortest response time to reduce wild-type yeast viability by more than 90 %. This concentration corresponds to twofold the minimal inhibitory concentration (MIC) for MZ, 50 μ M, which was estimated in preliminary

Fig. 4 ROS intracellular concentration (fluorescence intensity) in untreated yeast (grey area) versus cells treated with MZ (white area) for 6 h with 100 μ M MZ. Left panels, **a** and **c**, correspond to the wild-type BY4741 yeast. Right panels **b** and **d**, correspond to $\Delta yca1$ mutant yeast. The stains are indicated in the X axis as dihydroethidium (DHE) and dihydro-rhodamine 123 (DHR123). Numbers within figures indicate the median peak fluorescence for 10,000 cells

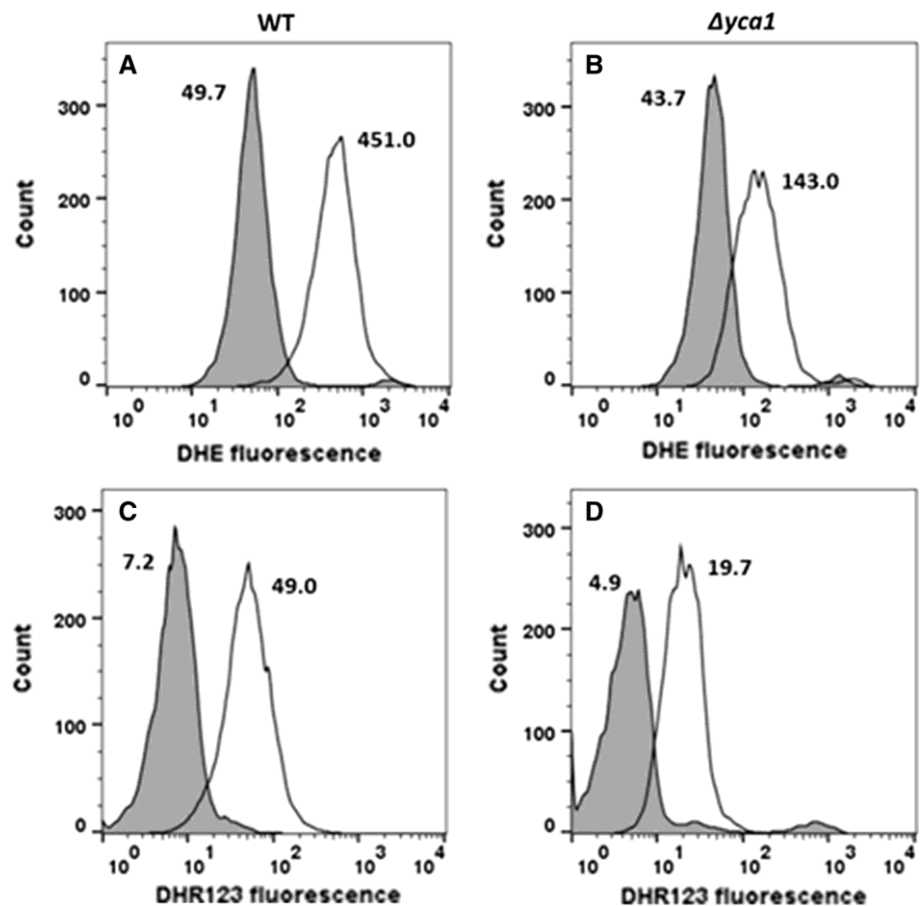
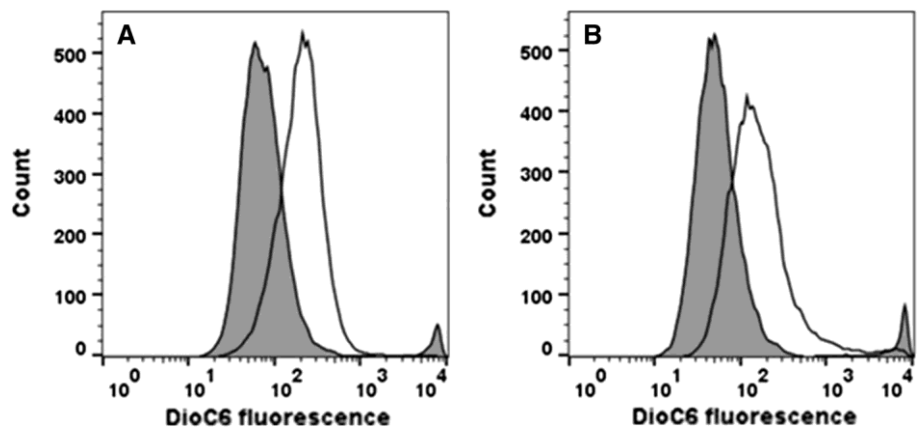


Fig. 5 Changes in yeast mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) induced by MZ treatment revealed by staining with 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC₆). **a** BY4741 wild-type yeast, and **b** $\Delta yca1$ mutant strain. Grey area represents untreated control cells, and white area represents cells treated with 100 μ M (6 h). Ten thousands cells were computed for each treatment



experiments (data non shown), and approximately tenfold higher than the sub-inhibitory treatments used in the MZ-resistance studies [11–13].

Considering that dithiocarbamates show pro-apoptotic activity on mammalian cells [5, 6, 8], we evaluated the effect of MZ on a set of *Saccharomyces* mutant strains lacking specific key genes in apoptotic pathways [17]. Among these strains, the $\Delta yca1$ mutant exhibited significantly lower sensitivity to MZ than the wild-type strain, as

well as other mutants, $\Delta nuc1$ and $\Delta aif1$ (Fig. 2). Transcription of *yca1* is activated in oxidatively and physiologically stressed cells to trigger the apoptotic cascade, and consequently, knock-out of *yca1* results in abrogation of the programmed cell death process and a net increase of viability for this mutant strain following MZ treatment compared with wild-type strains [17, 19]. Moreover, while MZ-treated wild type cells displayed normal plasma membrane integrity (Fig. 3), but lose their culture-ability,

Table 2 Cell cycle of wild-type yeast and an isogenic $\Delta yca1$ mutant strain in the absence (Control) and presence of 100 μ M MZ (6 h)

	WT cell counts (%)		$\Delta yca1$ cell counts (%)	
	Control	100 μ M MZ	Control	100 μ M MZ
G ₀ /G ₁	35.2	34.6	37.6	38.3
S	14.6	12.4	12.5	10.3
G ₂ /M	50.2	53.0	49.9	51.4

Values are the percentage of cells in each phase (10,000 cell counts/treatment)

the $\Delta yca1$ mutation rescued this phenotype and improved viability (Fig. 3). Our results with the dye pair SYTO9/PI are consistent with previous studies that evaluated the apoptotic response to lead in *Saccharomyces* [21]. Together, these results strongly suggest that acute treatment with MZ induces an apoptotic metacaspase-dependent programmed cell death in *S. cerevisiae*.

Several markers have been used to differentiate necrotic, apoptotic and autophagic cell death in yeasts and other organisms [18]. The externalization of phosphatidylserine evaluated by Annexin V binding, in particular when combined with a dye like 7AAD that cannot penetrate intact cells, is considered the method of choice for the quantification of early and late stages of the apoptotic process [22]. Annexin V-positive and 7AAD-negative cells (early apoptotic cells) increased from 3.9 to 54 % after treatment of wild type strain with MZ, whereas the $\Delta yca1$ mutant strain exhibited a modest change from 3.4 to 6.5 % (Table 2). Conversely, the number of necrotic cells (Annexin V- and 7AAD-positive) showed little increase in either of the strains, which is consistent and confirm an apoptotic cell death mechanism induced by the acute treatment with MZ in *Saccharomyces*.

Apoptosis, and in particular the metacaspase-dependent pathway, is triggered by oxidative stress, by elevated mitochondrial membrane potential, and by cytochrome C leakage into the cytoplasm [18–20]. MZ-treated cells of both wild-type and $yca1$ mutant strains exhibited a significant elevation of ROS compared to controls, as evidenced by DHE and DH123 fluorescence (Fig. 4). However, as previously reported by Santos et al. [11], we observed an unexpected reduction of fluorescence using the H₂DCFDA dye. This apparent discrepancy may potentially reveal the sub-cellular location of ROS produced by MZ, provided that DHE and DH123 are considered mitochondrial dyes, whereas H₂DCFDA is mainly distributed throughout the cytoplasm. These conclusions are consistent with programmed cell death observations in mammalian cell culture [5–7].

The higher ROS production exhibited by wild type treated cell compared with the $\Delta yca1$ strain (Fig. 4), can be attributed to a reduction of respiration rate and heme synthesis in $yca1$ mutants [23].

ROS effects on mitochondria induce a sequence of events that include mitochondrial membrane hyper-polarization, oxidative burst, followed by breakdown of membrane potential, and mitochondrial fragmentation [19, 24]. Both wild-type and $yca1$ mutant cells treated with 100 μ M MZ for 6 h displayed a similar level hyper-polarization of mitochondrial membranes (Fig. 5). This effect has been reported on early-apoptotic yeast cells treated with pheromone and amiodarone [25], cadmium [26], among other stress factors [27].

Our data suggest that the cell cycle was not modified by MZ treatment, indicating that the fungicide did not interfere with the mitotic division. Our measurements did not reveal a sub-G₀ population, which was previously observed in yeast apoptotic cells after treatment with cadmium [26]. The pro-oxidant and pro-apoptotic activities of MZ are consistent with the up-regulation of the resistance factor *FLR1*, a plasma membrane transporter induced by oxidants or pro-oxidants [13, 14], as well as the involvement of the transcription factor Yap1p, one of the key regulators of the oxidative stress response during yeast adaptation to sub-inhibitory concentrations of MZ [11]. Using sub-inhibitory treatment of MZ for a chemogenomic study, Dias et al. [12] concluded that MZ acted as a thiol-reactive compound in yeast, rather than a ROS inducer. This mechanistic discrepancy can be attributed to the experimental design using a sub-inhibitory and low-oxygen fermentation growth conditions. However, herein we focused on aerobic growth conditions and treatment with high MZ concentrations that are relevant to the agricultural applications. Other than the dithiocarbamate moiety of the molecule, high MZ concentrations elevate Mn and Zn ions within cells, and like other metals, these are known to cause cellular dysfunctions, increase ROS and induce apoptosis [6, 21, 26, 28]. Both ROS and thiol-reactivity can in fact be involved in MZ action on yeasts, explaining the “multi-site” description of MZ fungicide action.

Taken together, our experimental results provide strong evidence that MZ has pro-oxidant action in *Saccharomyces* growing under exponential aerobic conditions. The specific mechanism involves mitochondrial ROS accumulation, and hyper-polarization of mitochondrial membranes, a well-documented effect on mammalian cells [5, 6]. The drastic reduction of viability despite of intact cell membrane permeability, and the simultaneous externalization of phosphatidylserine by yeast cells treated with MZ also support an apoptotic mechanism. Moreover, the abrogation of this apoptotic response in $yca1$ deficient mutant strain

indicates that metacaspase-1 is involved in the programmed cell death induced by MZ in yeast.

Acknowledgments The authors acknowledge Cytogene Diagnósticos Moleculares Ltda. for access to flow cytometry equipment. F. J. Scariot thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for fellowship support.

Compliance with ethical standards

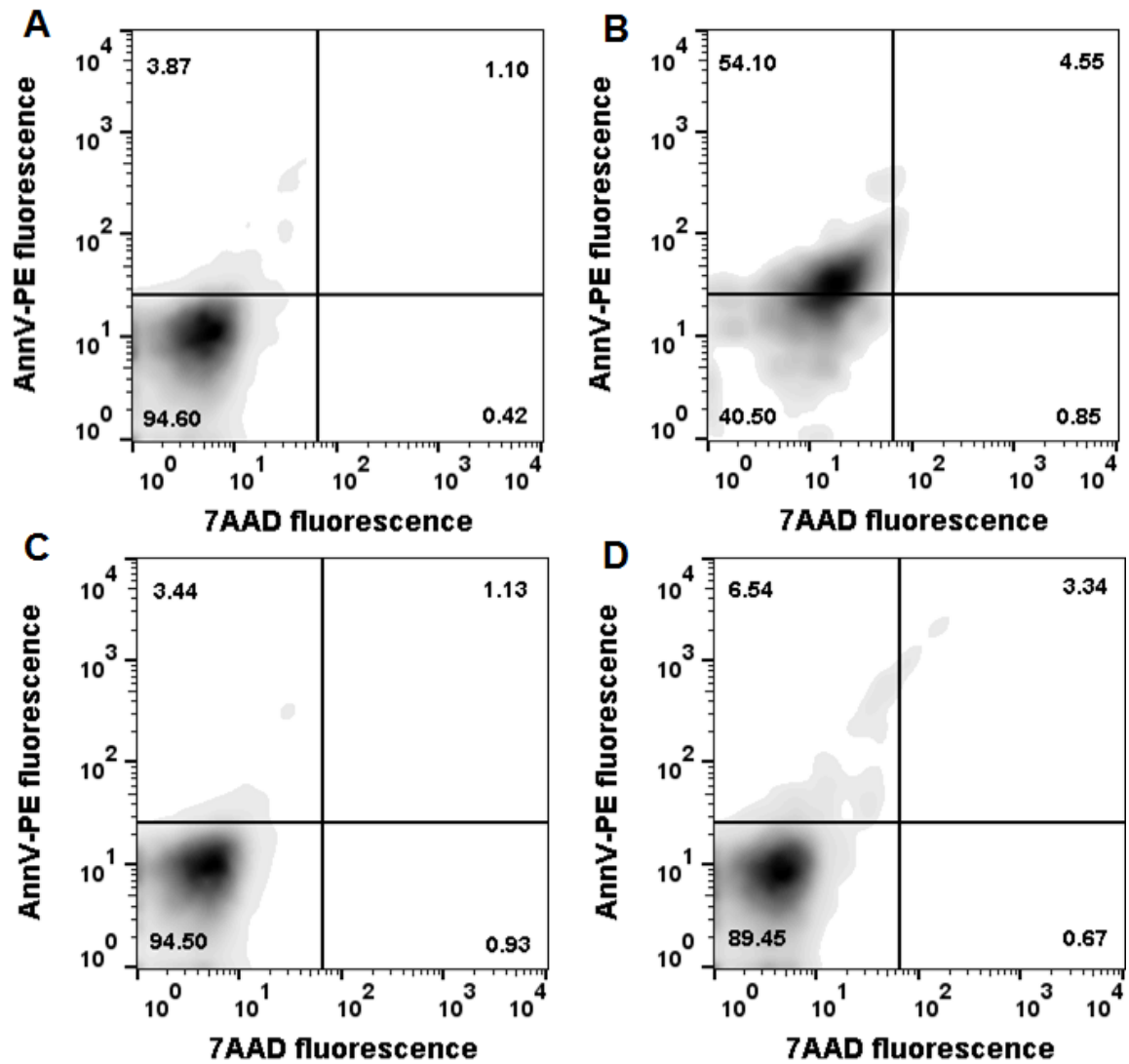
Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Gullino ML, Tinivella F, Garibaldi A, Kemmitt GM, Bacci L, Sheppard B (2010) Mancozeb: past, present, and future. *Plant Dis* 94:1076–1087. doi:10.1094/PDIS-94-9-1076
- Zhou Y, Shei FS, Piccardo P, Montine TJ, Zhang J (2004) Proteosomal inhibition induced by manganese ethylene-bis-dithiocarbamate: relevance to Parkinson's disease. *Neuroscience* 128:281–291. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.048
- Corsini E, Birindelli S, Fustinoni S, De Paschale G, Mammone T, Visentin S, Galli CL, Marinovich M, Colosio C (2005) Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol* 208:178–185. doi:10.1016/j.taap.2005.02.011
- Kamel F, Engel LS, Gladen BC, Hoppin JA, Alavanja MC, Sandler DP (2005) Neurologic symptoms in licensed private pesticide applications in the agricultural health study. *Environ Health Perspect* 113:877–882. doi:10.1289/ehp.7645
- Calviello G, Piccioni E, Boninsegna A, Tedesco B, Maggiano N, Serini S, Wolf FI, Palozza P (2006) DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 211:87–96. doi:10.1016/j.taap.2005.06.001
- Domico LM, Cooper KR, Bernard LP, Zeevalk GD (2007) Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology* 28:1079–1091. doi:10.1016/j.neuro.2007.04.008
- Srivastava AK, Ali W, Singh R, Bhui K, Tyagi S, Al-Khedhairi AA, Srivastava PK, Musarrat J, Shukla Y (2012) Mancozeb induces genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. *Life Sci* 90:815–824. doi:10.1016/j.lfs.2011.12.013
- Fitsanakis VA, Amarnath V, Moore JT, Montine KS, Zhang J, Montine TJ (2002) Catalysis of catechol oxidation by metal-dithiocarbamate complexes in pesticides. *Free Radical Bio Med* 33:1714–1723. doi:10.1016/S0891-5849(02)01169-3
- Xie J, Potter A, Xie W, Lynch C, Seefeldt T (2014) Evaluation of a dithiocarbamate derivative as a model of thiol oxidative stress in H9c2 rat cardiomyocytes. *Free Radical Biol Med* 70:214–222. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.022
- Cabras P, Angioni A (2000) Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *J Agric Food Chem* 48:967–973. doi:10.1021/jf990727a
- Santos PM, Simões T, SáCorreia I (2009) Insights into yeast adaptive response to the agricultural fungicide mancozeb: a toxicoproteomics approach. *Proteomics* 9:657–670. doi:10.1002/pmic.200800452
- Dias PJ, Teixeira MC, Telo JP, SáCorreia I (2010) Insights into the mechanisms of toxicity and tolerance to the agricultural fungicide Mancozeb in yeast, as suggested by a chemogenomic approach. *OMICS* 14:211–227. doi:10.1089/omi.2009.0134
- Teixeira MC, Dia PJ, Simões T, SáCorreia I (2008) Yeast adaptation to mancozeb involves the up-regulation of *FLR1* under the coordinate control of Yap1, Rpn4, Pdr3, and Yrr1. *Biochem Biophys Res* 367:249–255. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.056
- Monteiro PT, Dias PJ, Ropers D, Oliveira AL, SáCorreia I, Teixeira MC, Freitas AT (2011) Qualitative modelling and formal verification of the *FLR1* gene mancozeb response in *Saccharomyces cerevisiae*. *IET Syst Biol* 5:308–316. doi:10.1049/iet-syb.2011.0001
- Casalone E, Bonelli E, Polsinelli M (2010) Effects of Mancozeb and other dithiocarbamate fungicides on *Saccharomyces cerevisiae*: the role of mitochondrial petite mutants in dithiocarbamate tolerance. *Folia Microbiol* 55:593–597. doi:10.1007/s12223-010-0095-5
- Delobel P, Tesnière C (2014) A simple FCM method to avoid misinterpretation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle assessment between G0 and sub-G1. *PLoS One* 9:e84645. doi:10.1371/journal.pone.0084645
- Carmona-Gutierrez D, Eisenberg T, Büttner S, Meisinger C, Kroemer G, Madeo F (2010) Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ* 17:763–773. doi:10.1038/cdd.2009.219
- 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. doi:10.1111/jam.12024
- Perrone GG, Tan SX, Dawes IW (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochem Biophys Acta* 1783:1354–1368. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.01.023
- Farrugia G, Balzan R (2012) Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front Oncol* 2:1–21. doi:10.3389/fonc.2012.00064
- Bussche JV, Soares EV (2011) Lead induces oxidative stress and phenotypic markers of apoptosis in *Saccharomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:679–687. doi:10.1007/s00253-010-3056-7
- Madeo F, Frohlich E, Frohlich KU (1997) A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* 139:729–734. doi:10.1083/jcb.139.3.729
- Lefevre S, Sliwa D, Auchère F, Brossas C, Ruckenstein C, Boggetto N, Lesuisse E, Madeo F, Camadro JM, Santos R (2012) The yeast metacaspase is implicated in oxidative stress response in frataxin-deficient cells. *FEBS Lett* 586:143–148. doi:10.1016/j.febslet.2011.12.002
- Zdravlevic M, Guaragnella N, Antonacci L, Marra E, Giannattasio S (2012) Yeast as a tool to study signaling pathways in mitochondrial stress response and cytoprotection. *ScientificWorldJournal*. doi:10.1100/2012/912147
- Pozniakovskiy AI, Knorre DA, Markova OV, Hyman AA, Skulachev VP, Severin F (2005) Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J Cell Biol* 168:257–269. doi:10.1083/jcb.200408145
- Nargund AM, Avery SV, Houghton JE (2008) Cadmium induces a heterogeneous and caspase-dependent apoptotic response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Apoptosis* 13:811–821. doi:10.1007/s10495-008-0215-8
- Pereira C, Silva RD, Saraiva L, Johansson B, Sousa MJ, Côrte-Real M (2008) Mitochondria-dependent apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1783:1286–1302. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.03.010
- Pagani MA, Casamayor A, Serrano R, Atrian S, Ariño J (2007) Disruption of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* by high zinc levels: a genome-wide study. *Mol Microbiol* 65:521–537. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.03.010

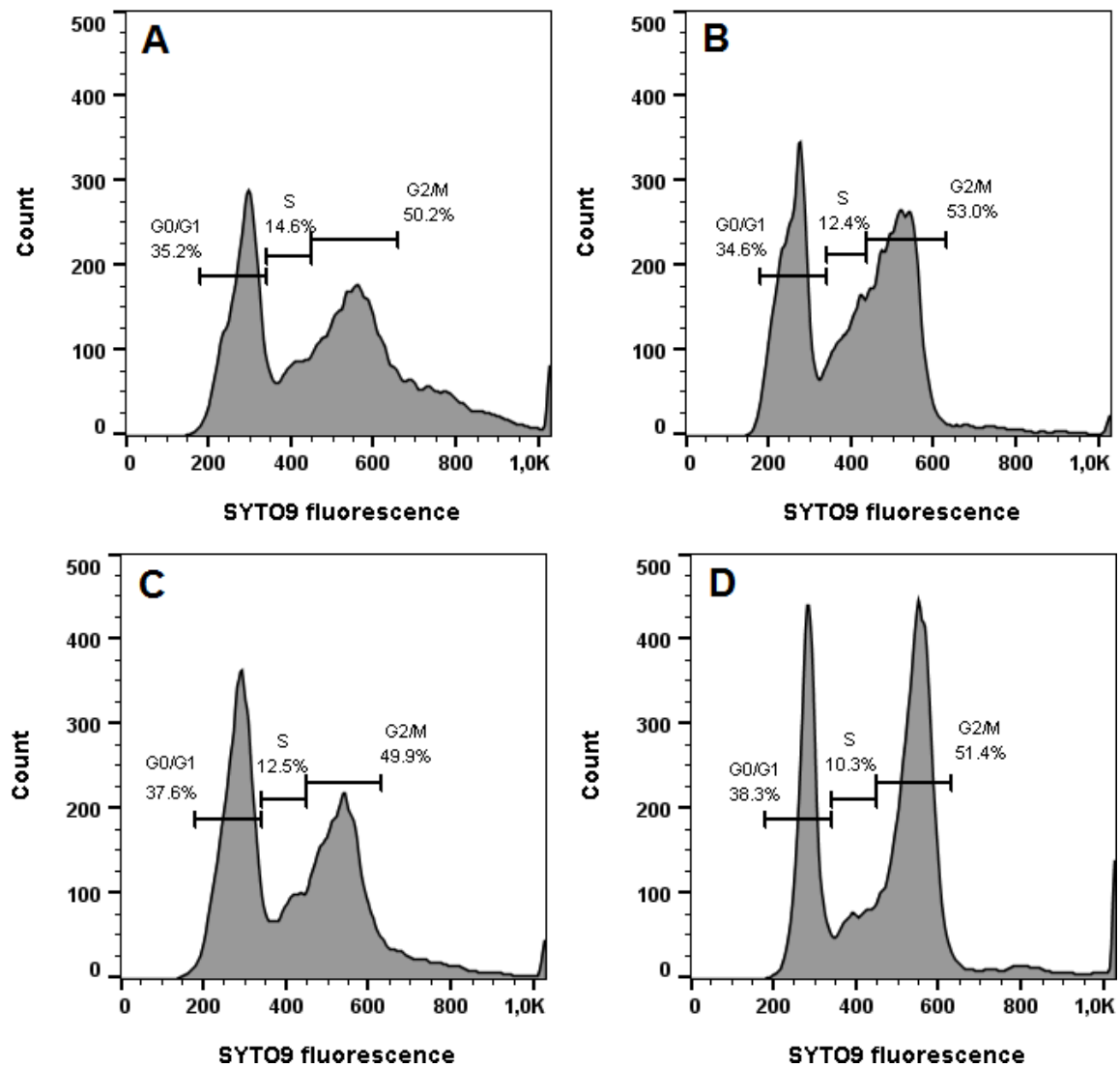
Supplementary material

Supplementary Fig. 1



Supplementary Fig. 1 Flow cytometry results for annexin V/7AAD-stained *Saccharomyces cerevisiae*: (A) wild type untreated cells, (B) wild type cells treated with 100 μ M MZ (6h), (C) $\Delta yca1$ untreated cells, (D) $\Delta yca1$ cells treated with 100 μ M MZ (6h). Values within figures indicate the percentage of events per quadrant.

Supplementary Fig. 2



Supplementary Fig. 2 Cell cycle analysis based on DNA content (SYTO9 staining) of *Saccharomyces cerevisiae* cells: (A) wild type untreated cells, (B) wild type cells treated with 100 μ M MZ (6h), (C) $\Delta yca1$ untreated cells, (D) $\Delta yca1$ cells treated with 100 μ M MZ (6h).

4.2 CAPÍTULO 2

Captan toxicity on *Saccharomyces cerevisiae*: a dual necrotic and apoptotic cell death.

Scariot, F.J.; Jahn, L.; Delamare, A.P.L.; Echeverrigaray, S.

Artigo submetido à revista **FEMS Yeast Research**.

Captan toxicity on *Saccharomyces cerevisiae*: a dual necrotic and apoptotic cell death.

Scariot, F.J.¹; Jahn, L.¹; Delamare, A.P.L.¹; Echeverrigaray, S.^{1,2}

¹Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Cytogene Diagnósticos Moleculares Ltda., Lageado, Rio Grande do Sul, Brazil.

Abstract

Captan is a broad-spectrum fungicide widely applied to control several early and late diseases of grapes, apples, and other fruits and vegetables, and as other phthalimide fungicides is defined as a multisite compound with thiol-reactivity. Captan can affect non-target organisms as yeasts modifying microbial populations and fermentation processes. In this study we asked whether Captan thiol-reactivity and other mechanisms are involved in acute Captan-induced cell death on aerobic growing *S. cerevisiae*. Thus for, we analyze cellular protein and non-protein thiols, cell membrane integrity, reactive oxygen species accumulation, phosphatidyl serine externalization, and apoptotic mutants behavior. The results showed that when submitted to acute Captan treatment most cells loss their membrane integrity and die by necrosis due Captan reaction with thiols. However, part of the cells even maintaining their membrane integrity lost their culture ability. These cells showed an apoptotic behavior that may be the result of non-protein thiol depletion and consequent increase of the reactive oxygen species detected, which in turn triggers a metacaspase-dependent apoptotic cascade, as shown by the higher viability of the *yca1* deleted mutant. Together, necrosis and apoptosis are responsible for the high mortality detected after acute Captan treatment of aerobically growing cells of *S. cerevisiae*.

Key-words: yeast, phthalimide fungicide, ROS, membrane integrity, metacaspase, thiol-reactivity.

Introduction

Captan (N-cyclohex(trichloromethylthio)-4-ene-1,2-dicarboximide) is a broad spectrum fungicide of the phthalimide class, wide world used to control a large number of fungal diseases of fruits, vegetables, and ornamental plants. In grapes, Captan is recommended for the control of several late-diseases like bunch rots, grey rot, black rot, phomopsis, and mildew, and can be present in fruits and musts. Although in use for over 60 years, captan and other fungicides of the same class are still described as multisite fungicides, indicating that these molecules affects a number of different non-well described metabolic sites within phytopathogenic fungi (Yang et al., 2011).

Captan reaction with proteic and non-proteic thiol groups is pointed as the main mechanism of action of the fungicide, responsible for the reduction of overall enzymatic activity, respiration, and many other physiological and morphological changes in fungi (Lukens, 2013). In fact, in biological systems, captan is degraded to its reactive thiophosgene moiety (trichloromethylthio functional group, SCCl_3), along with a 1,2,3,6-tetrahydrophthalimide (THPI) ring structure (Gordon, 2010). This irreversible non-enzymatic reaction occurs as a result of hydrolysis in the presence of exposed thiol groups (Arce et al., 2010), but thiophosgene can also react with other functional groups, like amines, amides, imides, and alcohols (Sharma, 1986).

First *in vitro* microbial studies on captan, and its sister molecule folpet, genotoxicity indicated that these fungicides were responsible for base pair mutations, gene conversion, and recombination events (Bignami et al., 1977; Simmon et al., 1977; Bertoldi et al., 1980), supporting their classification as group B2, probable human carcinogens. However, more recent studies using improved genetic, molecular, and *in vivo* tests lead to their reclassification as non-genotoxic compounds (Zeiger, 2004; Arce et al., 2010).

Captan, like other broad spectrum fungicides, has important impact in non-target

microorganisms like denitrifying bacteria (Milenkovski et al., 2010), epiphytic yeast (Cadez et al., 2010; Vadkertiova and Slavikova, 2011), and wine yeasts (Conner, 1983; Chiba et al., 1987), affecting microbial communities and fermentative processes. Evaluation of captan and its metabolite THPI in grapes, musts, and wines showed that the fungicide is efficiently transferred from fruit to must, where it is progressively degraded so that only THPI is found in wines (Angioni et al., 2003). However, the presence of phtalamide fungicides in grape must can drastically reduce yeast viability causing fermentation delay, increasing wine cloudiness, or stuck fermentations (Caboni and Cabras, 2010).

In this context, the present study attempts to understand the cell death mechanism of Captan on *Saccharomyces cerevisiae*, fusing on thiol reactivity, ROS accumulation, apoptotic markers, and mutants response.

Material and Methods

Yeast strains and media

Saccharomyces cerevisiae BY4741 (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0) reference strain and their isogenic mutants Y06233 (*yca1::kanMX4*), Y0233 (*aif1::kanMX4*) and Y01217 (*nuc1::kanMX4*) with deletions in metacaspase-1, apoptotic inducing factor-1, and mitochondrial nuclease genes, respectively, were obtained from Euroscarf (Frankfurt, Germany). Yeasts were cultured at 28°C with orbital shaking (150 rpm) in YEPD broth (2% yeast extract, 1% peptone, 2% glucose, pH 6.5) or SD medium (0.67% Yeast Nitrogen Base without aminoacids, 2% glucose, with 20 mg/L histidine, methionine, and uracil, and 60 mg/L leucine, pH 6.5). Captan (Pestanal[®]) was purchased from Sigma-Aldrich, and stock solutions (10 mM in dimethylsulfoxide, DMSO) were prepared just before each experiment.

Yeast growth and viability assay

Yeasts from overnight cultures in YEPD broth ($OD_{600} \sim 1.0$) were inoculated in the same medium, and grown to exponential phase (OD_{600} up to 0.7) at 28°C with orbital shaking (150 rpm). Cells were harvested by centrifugation, washed with 0.9% NaCl, and cell density adjusted to 10^7 cells/ml in SD medium. Control cultures (untreated) or those treated with Captan in the indicated concentrations were incubated for 360 min (6 hours) at 28°C with shaking (150 rpm), unless the time/concentration in initial experiments.

To evaluate the protective effect of antioxidants (ascorbic acid, cysteine, and glutathione), yeast cells were incubated for 30 min with 0 to 5mM of each antioxidant compound, washed twice with SD medium, and treated with 20 μ M Captan for 6 hours at 28°C with shaking.

The viability of Captan-treated and untreated yeasts was determined by spot assay. Cultures were diluted at 10-fold series, and aliquots (10 μ l) of each dilution were spotted onto YEPD plates. Colony were enumerated after 48 and 72 h incubation at 28°C, and expressed as percentage of colony forming units (CFU) compared with the control (untreated cells).

Assays for sulfhydryl groups, membrane integrity, ROS, and apoptosis

Protein-thiol levels (P-SH) were measured according to the DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) method of Sedlak and Lindsay (1967), by subtracting the non-protein-thiol (NP-SH) content from the total sulfhydryl (T-SH) content, and following the procedure adopted by Demasi et al. (2006).

Cell membrane integrity, ROS production, and phosphatidylserine externalization, were performed by flow cytometry using a FACSCalibur (Becton-Dickinson) instrument equipped with an argon-ion laser emitting at 488 nm.

For flow analysis, Captan-treated (20 μ M) and untreated cultures were harvested, washed, suspended in PBS (pH 7.4), and immediately analyzed (except for AnnexinV/7-AAD). In all the experiments, yeast cells were initially gated using forward- and side-scatter, and 10

thousand cells were included for each analysis.

Cell membrane integrity was evaluated using the LIFE/DEAD FungaLight Yeast Viability kit (Invitrogen) that includes two nucleic acid dyes: SYTO[®] 9, a green-fluorescent that stain both integral and damaged cells, and the red-fluorescent propidium iodide, which penetrates only in membrane-damaged cells. Staining and flow cytometry analysis followed kit instructions.

Intracellular ROS were detected using the oxidant-sensitive dyes dihydroethidium (DHE, Sigma). Stock solution was prepared by dissolving DHE at 5 mg/ml in DMSO. Staining was performed in 500 µl for Captan-treated and untreated samples using a final dye concentration of 5 µg/ml. Samples were evaluated by flow cytometry using FL3 (488/670).

Apoptosis was measured quantifying the levels of detectable phosphatidylserine on the outer membranes of yeast cells using the Annexin V-PE (AnnV) and 7-AAD apoptosis detection kit (BD Pharmingen) according to Scariot et al. (2016). Staining and flow cytometry analysis were performed following the manufacturer instructions. Cells untreated and treated with H₂O₂ (50 mM) were used as negative and positive controls, respectively.

Results

First, we established the required concentration of Captan to attain 5 to 10% viability for exponentially aerobic growing cells of *S. cerevisiae* BY4741 in short term exposure times. As can be observed in Fig. 1, Captan treatments resulted in a dose- and time-dependent reduction on cell viability and allowed to identified the concentration of 20 µM (6.01 mg/L Captan), which produced a reduction of 92.0% CFU after 6 h of fungicide treatment, for further analysis.

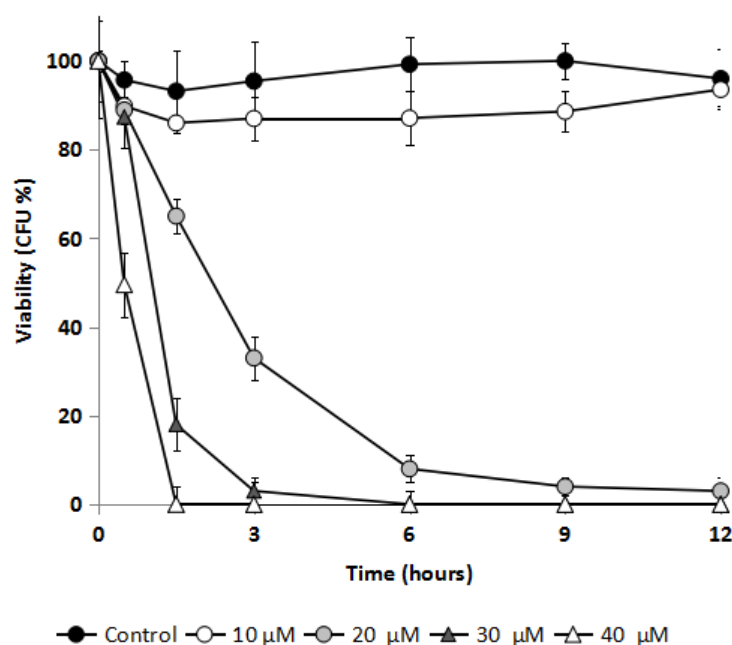


Figure 1- Effect of Captan concentration and exposure time on the cell viability of *S. cerevisiae* BY4741. Results are the average of three independent experiments. Legend: Captan concentrations (μ M).

Based on previous information that show that Captan reaction with thiol groups is the main effect of this class of fungicides on fungal and mammalian cells, we evaluated the effect of Captan on the concentration of proteic (P-SH) and non-proteic sulphidrilic (NP-SH) groups in *S. cerevisiae*. The results (Fig. 2A) show a clear dose dependent reduction of both NP-SH and P-SH on yeast cells, indicating that the primary mode of action of Captan on *Saccharomyces* involves the oxidation of thiols. As an additional test to substantiate these observations, we evaluated the protective effect of ascorbic acid, cysteine and glutathione on Captan induced yeast death, and observed a clear increase in yeast cell viability when yeast cells were previously treated with the thiol containing molecules, cysteine and glutathione, but not ascorbic acid (Fig. 2B).

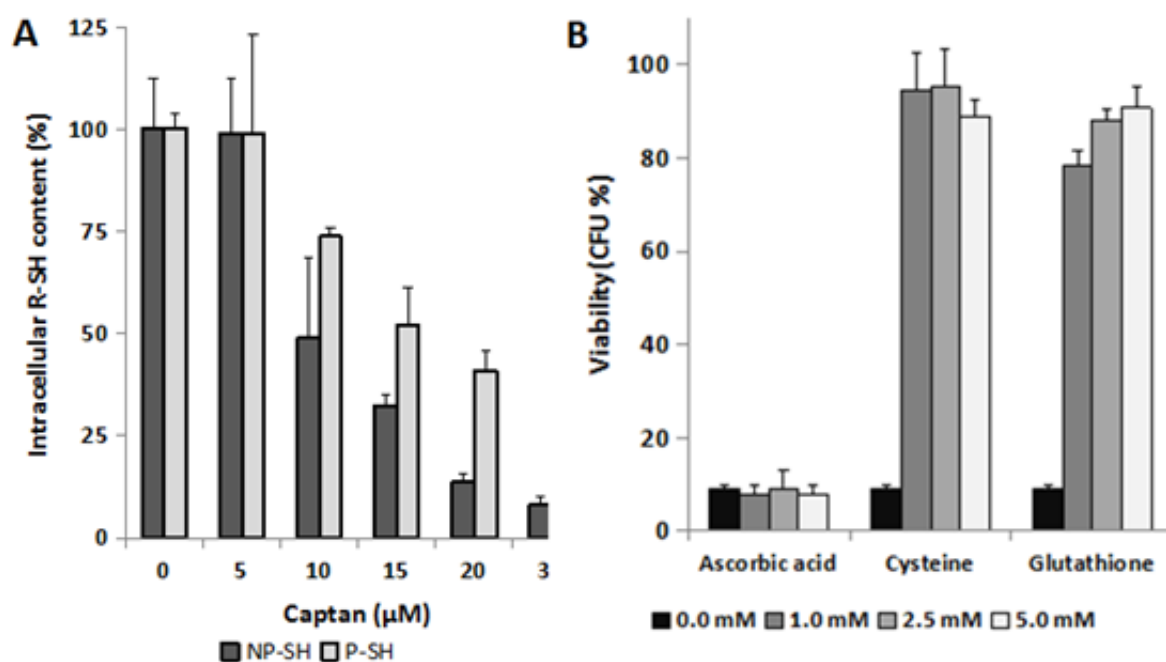


Figure 2- Effect of Captan on reduced thiol pool (R-SH) of *S. cerevisiae* (A), and the protective effect of antioxidants on *S. cerevisiae* Captan (20 µM)-treated cells (B). NP-SH – non-protein thiols; P-SH – protein thiols. The data are mean $\pm$ SD values of three independent experiments.

In the sequence, we performed staining using the dye pair SYTO9/PI for flow cytometry analysis of untreated control and Captan-treated yeast cells (Fig. 3A). The data showed that 81.7% of the cell treated with Captan (20 µM) lose their membrane integrity (PI positive), a typical necrotic cell death phenotype. However, in the same experiments, yeast viability evaluated by colony counting showed a reduction of 95.7%, and this difference can indicate a secondary effect of the fungicide on yeasts.

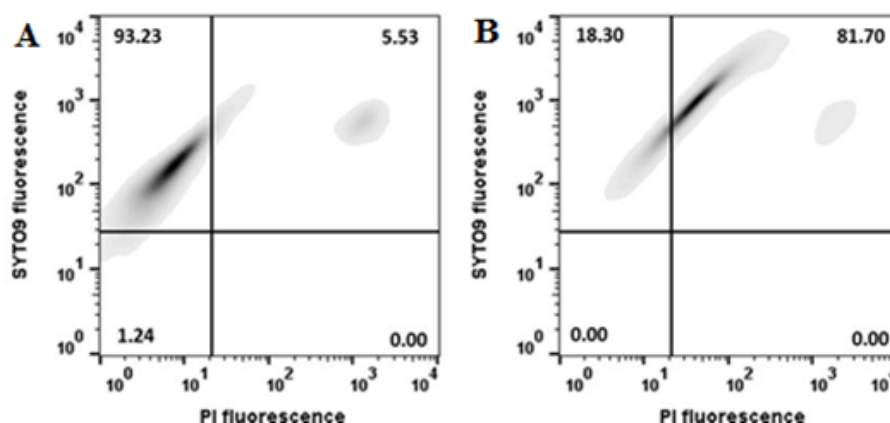


Figure 3- Cell membrane integrity (% PI negative) of wild-type BY4741 yeast: (A) control, (B) treated for 6 h with 20 μ M Captan. A total of 10,000 cells were analyzed, and numbers within figures indicate the percentage of cell within each quadrant.

As glutathione (G-SH) is the most abundant reducing compound in yeast cells, and fulfills several functions, including directly scavenging of reactive oxygen species, we evaluated ROS accumulation on untreated *versus* Captan-treated *S. cerevisiae* cells using the redox-sensitive DHE probe. The results showed that Captan-treated cells exhibited increased fluorescence (Fig. 4), denoting ROS accumulation.

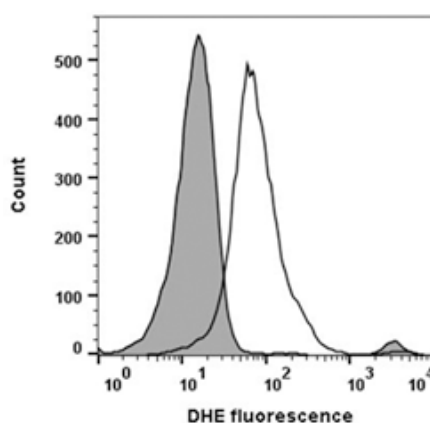


Figure 4- ROS intracellular concentration (fluorescence intensity) in untreated yeast (grey area) versus cells treated with Captan (white area) for 6 h with 20 μ M Captan.

In order to evaluate if ROS accumulation on Captan-treated cell can be responsible for apoptotic death in *Saccharomyces*, we analyzed phosphatidylserine externalization using AnnV, a classical apoptotic marker, and 7-AAD, a nucleic acid dye that penetrates only membrane-damaged cells. Following Captan-treatment in the standard experimental conditions we observed that where most cells (65%) exhibited a necrotic phenotype (AnnV negative/7-AAD positive), 15.2% of the cells were AnnV positive/7-AAD negative, and 14.8% were AnnV and 7AAD positives, indicating early and late apoptotic behavior, respectively.

Programmed or apoptotic cell death in yeasts can follow two different ways: a metacaspase dependent and a metacaspase independent pathways. To define which of this routs are responsible for Captan induced apoptotic death, we evaluated Captan effect on the wild type (BY4741) and three isogenic strains of *S. cerevisiae* deleted in key genes of apoptotic pathways. The results showed a significant higher viability of the *yca1* mutant (22.8%) compared with the wild type and the other mutants (2.0 to 4.2%) (Fig. 5B), indicating that ROS stress caused by Captan depletion of R-SH protective molecules on those cells that survive the initial necrotic effect, triggered a metacaspase dependent cell death in aerobically growing *Saccharomyces* cells.

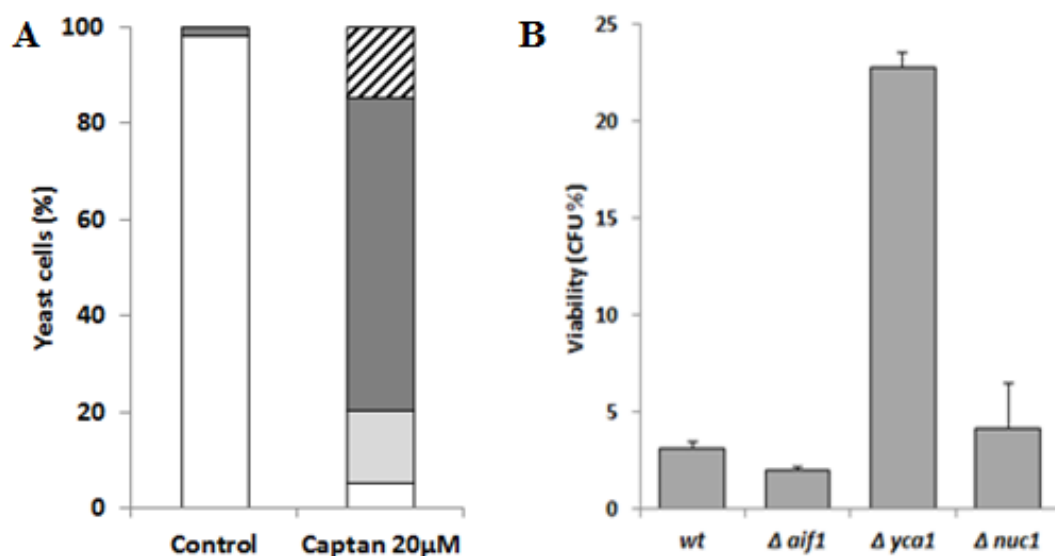


Figure 5- Annexin V and 7AAD staining flow cytometry analysis of wild-type yeast in the absence (Control) and presence of 20 μM Captan (A), and viability (CFU %) of wild-type BY4741 and mutants exposed to 20 μM MZ for 6 h (B). AnnV/7AAD values are the percentage of cells in the four quadrants (10,000 cell counts/treatment). White (AnnV- negative/7AAD- negative), light gray (AnnV- positive/7-AAD- negative), dark gray (Ann-V negative/7-AAD- positive), striped (Ann-V positive/7-AAD- positive).

Discussion

Based on the initial experiments (Fig.1), we selected a 6 h treatment with 20 μM Captan (6.01 mg/L) for further analysis. This concentration and exposure time reduced yeast viability by approximately 90%, and represents half the minimal inhibitory concentration (MIC) of Captan on *S. cerevisiae* BY4171 (40 μM) estimated by growth inhibition after 72h on YEPD medium (data not shown). The selected concentration is 200-fold lower than the field spray application dosage (1200-1250 mg Captan/L water) recommended for fruits. The maximum residual level (MRL) of Captan for fruits recommended by the Codex varies between 3 and 25 mg/kg (Boyd, 2006). With a pre-harvest interval of 24h to 30 days depending on specific national legislations, experimental data showed that Captan residue in grapes varies between 0.74 to 22 mg/kg (FAO Report, 1997).

Considering that the main mechanism of action of phthalamide fungicides in mammalian cells, bacteria and filamentous fungi is their reaction with thiol (R-SH) groups (Arce et al., 2010; Lukens, 2013), we evaluated the proteic and non-proteic thiol pool in control and Captan treated cells of *S. cerevisiae*. The results showed a dose dependent reduction of both non-proteic and protein thiols (Fig. 2A). This dose behavior of thiol reduction is explained by the stoichiometric chemical reaction of Captan with thiols, which can be simplified as: $\text{Captan} + 2(\text{R-SH}) \rightarrow \text{RSSR} + \text{tetrahydrophthalamide} + \text{thiophosgene} + \text{HCl}$ (Arce et al., 2010). Furthermore, to confirm the thiol involvement in Captan toxicity on yeasts, we analyzed the protective effect of ascorbic acid, cysteine and glutathione on Captan (20 μM) exposed *Saccharomyces* cells. The data (Fig. 2B) showed an almost complete protection of yeast cells by cysteine and glutathione, two thiol molecules, but not by the antioxidant ascorbic acid. The protective effect of thiol compounds (cysteine and glutathione) and thiol rich fluids (rat liver S9 and rat blood) against Captan effects was reviewed by Arce et al. (2010).

SYTO9/PI staining and flow cytometry analysis revealed that the high majority (81.7%) of Captan-treated *Saccharomyces* cells exhibited loss of membrane integrity (Fig. 3), an indicative of necrotic cell death (Wloch-Salomon and Bem, 2012). Studies on trichloromethylthio group of Folpet indicated that only a small portion of fungicide accumulate in yeast cells (Siegel and Sisler, 1968), supporting membrane cell as the primary target of phthalamide fungicides.

A comparison of ROS in control and Captan-treated cell (Fig. 4) showed an important increase in ROS accumulation after exposure to 20 μM Captan, indicating that ROS accumulation in yeasts. These results associated with the difference of 14% between the percentage of cells that loss their membrane integrity (81.7%) and those that loss their culture-ability (95.7%) can be attributed to a programmed cell death process, a mechanism previously reported for Mancozeb, another thiol-reactive fungicide (Scariot et al., 2016). As Captan

drastically reduce the non-proteic thiol content of yeast cells (Fig. 2), and glutathione acts as a cellular redox buffer involved in mitochondrial and membrane integrity, protection against reactive oxygen species (ROS), detoxification of xenobiotics and endogenous toxic metabolites, among other functions (Pennonckx, 2002) apoptosis can be considered as an indirect mechanism of action of Captan triggered by ROS accumulation due glutathione depletion. A dual effect of dicarboximides fungicides was suggested by Ellner (1996) in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*.

To confirm this hypothesis, we analyzed phosphatidylserine externalization using AnnV. The results (Fig. 5A) showed that where most cells exhibited a necrotic phenotype (65%), 30% of the cells were AnnV positive and either 7-AAD negative or positive, denoting early and late apoptotic behaviors, respectively.

Yeast programmed cell death has been associated with many chemical and physiological conditions as ageing, pheromones, salt stress, metals, drugs, acetic acid, hydrogen peroxide (Carmona-Gutierrez, 2010), and fungicides (Scariot et al., 2016). Despite the large variety of cell death scenarios, several studies implicate ROS and redox homeostasis as some of the most important early and regulatory steps in many of the apoptotic processes in yeasts (Perrone et al., 2005, 2008).

A comparison of Captan induced cell death in wild type and deleted mutants in key genes of the apoptotic pathways showed that only the *yca1* deficient mutant exhibited a significant higher viability (Fig. 4B), that approximately corresponds to the apoptotic fraction observed in AnnV/7-AAD experiments (Fig. 4A). Apoptosis, and in particular the metacaspase-dependent pathway, is triggered by oxidative stress, and involves an initial cytochrome C leakage into the cytoplasm, the induction *yca1* expression (yeast metacaspase 1), which initiates a programmed cell death cascade (Perrone et al., 2008; Carmona-Gutierrez et al., 2010).

Taken together, our experimental results provide strong evidence that Captan toxicity in *Saccharomyces* growing under aerobic conditions involves a drastic reduction of the protein and non-protein thiol pools, ROS accumulation, and loss of membrane integrity in a typical necrotic cell death mechanism, but part of the population experience ROS-induced metacaspase apoptotic behavior.

Acknowledgements The authors acknowledge Cytogene Diagnósticos Moleculares Ltda. for access to flow cytometry equipment. F. J. Scariot thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for fellowship support.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Angioni A, Garau VL, Del Real AA., Melis M, Minelli EV, Tuberoso C & Cabras P (2003) GC-ITMS determination and degradation of captan during winemaking. *J Agric Food Chem* **57**: 671-6766.
- Arce GT, Gordon EB, Cohen SM & Singh P (2010) Genetic toxicology of folpet and captan. *Crit Rev Toxicol* **40**: 546-574.
- Bertoldi M de, Griselli M, Giovannetti M & Barale R (1980) Mutagenicity of pesticides evaluated by means of gene-conversion in *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus nidulans*. *Environ Mutagen* **2**: 359-370.
- Bignami M, Aulicino F, Velcich A, Carere A & Morpurgo G (1977). Mutagenic and recombinogenic action of pesticides in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res* **46**:395–402.

- Boyd D (2006) The food we eat: an international comparison of pesticide regulations. David Suzuki Foundation, Vancouver, 42 p.
- Caboni P & Cabras P (2010) Pesticides' influence on wine fermentation. *Adv Food Nutr Res* **59**: 43-62.
- Cadez N, Zupan J & Raspor P (2010) The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Res* **10**: 619-630.
- Carmona-Gutierrez D, Eisenberg T, Büttner S, Meisinger C, Kroemer G & Madeo F (2010) Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ* **17**: 763-773.
- Chiba M, Brown AW & Danic D (1987) Inhibition of yeast respiration and fermentation by benomyl, carbendazin, isocyanates, and other fungicidal chemicals. *Can J Microbiol* **33**: 157-161.
- Conner AJ (1983) The comparative toxicity of vineyard pesticides to wine yeasts. *Am J Enol Vitic* **34**: 278-279.
- Demasi PD, Pereira GAG & Netto LES (2006) Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. *FEBS Journal* **273**: 805–816.
- Ellner EM (1996) The glutathione system a novel target of dicarboximides in *Botrytis cinerea*. In: H. Lyr, P.E. Russel & H.D. Sisler (eds.) *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. Intercept Ltd. pp. 133-140.
- FAO Report (1997)
- http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Reports_1991-2006/Report97.pdf. Accessed on July 2016.
- Gordon EB (2010). Captan and folpet. In: Krieger R, ed. *Hayes Handbook of Pesticide Toxicology*. Elsevier, New York, p. 1915–1949.
- Lukens RJ (2013) The chemistry of fungicidal action. Springer Verlag, New York, 138 p..
- Milenkovski S, Baath E, Lindgren PE & Berglund O (2010) Toxicity of fungicides to natural

- bacterial communities in wetland water and sediment measured using leucine incorporation and potential denitrification. *Ecotoxicology* **19**: 285-294.
- Penninckx MJ (2002) An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res* **2**: 295-305.
- Perrone GG, Grant CM & Dawes IW (2005) Genetic and environmental factors influencing glutathione homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**: 218-230.
- Perrone GG, Tan SX & Dawes IW (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochem Biophys Acta* **1783**: 1354-1368.
- Scariot FJ, Jahn LM, Maianti JP, Delamare APL & Echeverrigaray S (2016) The fungicide Mancozeb induces metacaspase-dependent apoptotic cell death in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. *Apoptosis* **21**: 866-872.
- Sedlak J & Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* **25**: 192-205.
- Sharma S (1986). The Chemistry of Thiophosgene. London Series: Sulfur Reports. Senning A, series ed. Harwood Academic Publishers, New York.
- Simmon VF, Mitchell AD & Jorgenson TA (1977). Evaluation of selected pesticides as chemical mutagens: In vitro and in vivo studies. Research Triangle Park, NC: Health Effects Research Laboratory, US Environmental Protection Agency. Report no. EPA-600/1-77-028. MRID 132582.
- Siegel MR & Sisler HD (1968) Fate of the phthalimide and trichloromethylthio (SCCl₃) moieties of folpet in toxic action on cells of *Saccharomyces pastorianus*. *Phytopathol* **58**: 1123-1129.
- Vadkertiova R & Slavikova E (2011). Influence of pesticides on yeasts colonizing leaves. *Z Naturforsch* **66**: 588-594.
- 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.

Yang C, Hamel C, Vujanovic V & Gan Y (2011) Fungicide: mode of action and possible impact on nontarget microorganisms. *ISRN Ecology* 2011: Article ID 130289.

Zeiger E (2004). History and rationale of genetic toxicity testing: An impersonal, and sometimes personal, view. *Environ Mol Mutagen* **44**:363–371.

4.3 CAPÍTULO 3

The effect of the fungicide captan on *Saccharomyces cerevisiae* and wine fermentation

Fernando J. Scariot, Luciane M. Jahn, Ana Paula L. Delamare; Sergio Echeverrigaray

Artigo publicado na revista **Bio Web of Conferences - 39th World Congress of Vine and Wine** 7, 02027 (2016) DOI: 10.1051/bioconf/20160702027

The effect of the fungicide captan on *Saccharomyces cerevisiae* and wine fermentation

Fernando J. Scariot¹, Luciane M. Jahn¹, Ana Paula L. Delamare¹ and Sergio Echeverrigaray¹

¹Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 95070-650 Caxias do Sul, Brazil.

Abstract. Fungicides, particularly those used during grape maturation, as captan, can affect the natural yeast population of grapes, and can reach grape must affecting wine fermentation. The objective of the present work was to study the effect of captan on the viability and fermentative behavior of *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* (BY4741) on exponential phase was treated with captan (0 to 40 μ M) for different periods, and their cell viability analyzed. Cell membrane integrity, thiols concentration, and reactive oxygen species (ROS) accumulation was determined. The fermentation experiments were conducted in synthetic must using wine yeast strain Y904. The results showed that under aerobic conditions, 20 μ M of captan reduce 90% of yeast viability in 6 hours. Captan treated cells exhibited alteration of membrane integrity, reduction of thiol compounds and increase in intracellular ROS concentration, suggesting a necrotic and pro-oxidant activity of the fungicide. Fermentative experiments showed that concentrations above 2.5 μ M captan completely inhibited fermentation, while a dose dependent fermentation delay associated with the reduction of yeast viability was detected in sub-inhibitory concentrations. Petit mutants increase was also observed. In conclusion, the captan induces yeast necrotic cell death on both aerobic and anaerobic conditions causing fermentation delay and/or stuck fermentations.

1. Introduction

Captan (N-cyclohex (trichloromethylthio)-4-ene-1,2-dicarboximide) is a broad spectrum fungicide of the phthalimide class, widely used to control several grapevine diseases, as downy mildew, phomopsis, black rot, ripe rot, and bitter rot. With a pre-harvest interval of 24h to 30 days depending on specific national legislations, experimental data showed that Captan residue in grapes varies between 0.74 to 22 mg/kg [1], and can reach grape must, and decline but persist during fermentation [2].

Captan reaction with thiol groups has been pointed as the main mode of action on phytopathogenic fungi, been responsible for the reduction of enzymatic activities, respiration, physiological changes, and fungal death [3]. In the presence of exposed thiol groups, captan oxidize thiols and is hydrolyze to its reactive thiophosgene (SCCl_3) moiety, and the 1,2,3,6-tetrahydrophthalimide ring [4]. In vitro genotoxicity studies indicated that phthalimide fungicides were associated to point mutations, and gene conversion [5, 6], been classified as potential human carcinogen. However, based on *in vivo* and molecular analysis in mammals they were re-classified as non-genotoxic [7].

As other broad-spectrum fungicides, captan can affect non-target microorganisms, among which epiphytic and wine yeasts [8-11]. A comparison of the toxicity of 25 vineyard pesticides on the growth of wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) showed that captan one of the more toxics [8]. Moreover, the presence of captan in grape must can drastically reduce yeast viability causing fermentation delay, wine cloudiness, and stuck fermentations [12]. Although used for more than 60 years, the mechanism of action and the effect of

captan on both target and non-target organisms is poor and most studies just describe its toxicity on mammals.

Considering that captan is used to control grape diseases with a pre-harvest interval as low as 24h, depending on specific national legislations, and consequently reach wine must, the aim of the present study was to determine captan minimal inhibitory concentration, and evaluate the effect of captan on *S. cerevisiae* under actively aerobic growth and wine fermentation.

2. Material and Methods

2.1. Yeast strains and media

Saccharomyces cerevisiae BY4741 (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0) reference strain (Euroscarf., Frankfurt, Germany), and Y904 wine strain (ABB, Brazil) were used. Other wine yeast strains were used to determine minimum inhibitory concentration under fermentative conditions: EC1118, QD145, CY3079 (Lalvin, Denmark), Rouge (Fermol, France), and BP725 (Maurivin, Australia). Yeasts were cultured at 28°C with orbital shaking (150 rpm) in YEPD broth (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, pH 6.5). Captan (Pestanal[®]) was purchased from Sigma-Aldrich, and stock solutions (10 mM in dimethylsulfoxide, DMSO) were prepared just before each experiment.

2.2. Yeast growth and fermentations

For aerobic experiments, yeasts from overnight cultures were inoculated in YPD broth, and grown to mid-exponential phase ($\text{OD}_{600} \sim 0.7$) at 28°C with orbital shaking (150 rpm). Cells were harvest by centrifugation, washed twice with 0.9% NaCl, and cell density adjusted to 10^7 cells/ml in minimal medium (0.67% Yeast Nitrogen Base without aminoacids, 2%

glucose, with 20 mg/L histidine, methionine, and uracil, and 60 mg/L leucine, pH 6.5). Control and captan-treated cultures were incubated for 6 hours at 28°C with shaking (150 rpm).

For fermentation experiments, yeasts were grown to stationary phase on YEPD broth for 48 hours at 28°C with shaking (150 rpm), collected by centrifugation, washed with 0.9% NaCl. Yeast inoculation was standardized at 5×10^6 cells/ml in 100 ml of MS300 medium [13] in 250 ml Duran flasks with Müller valves. Fermentation were conducted at 24°C with periodical agitation, and monitored by CO₂ release.

2.3. Analytical techniques

The viability of Captan-treated and untreated yeasts was determined by spot assay. Cultures were diluted at 10-fold series, and aliquots (10 µl) of each dilution were spotted onto YEPD plates. Colony were enumerated after 48 h incubation at 28°C, and expressed as percentage of colony forming units (CFU) compared with the control (untreated cells).

Respiration deficient yeasts (petit) were determined by plating on YEPD and YEPG (1% yeast extract, 2% peptone, 3% glycerol, 2% agar, pH 6.5) media, and confirmed by sticking YEPD colonies on YEPG medium.

Total, protein and non-protein thiols were measured by the DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) according with [14]. Total proteins were quantified by the Bradford method.

Cell membrane integrity and ROS accumulation were determined with LIFE/DEAD FungalLight Yeast Viability kit (Invitrogen), and the dihydroethidium and dihydrorhodamine 123 oxidant sensitive dyes, respectively, using a flow cytometry FACSCalibur (Becton-Dickinson) instrument equipped with an argon-ion laser emitting at 488 nm.

Wine total acidity (g tartaric acid/L), volatile acidity (g acetic acid/L), residual sugar (g/L), alcohol (% v/v), and density (20/20) were determined according to the International Organization of Vine and Wine methods [15]. Glycerol concentration was quantified by an enzymatic method (Megazyme).

2.3. Statistical analyses

All analyses were carried out in triplicate, and the results expressed as mean values $\pm$ standard deviation. The SPSS 20.0 software for Windows (Chicago, IL, USA) was used for the analysis of variance (ANOVA), and means comparison.

3. Results and discussion

Initial experiments showed that captan minimal inhibitory concentration (MIC) for aerobic exponential growing cells of *S. cerevisiae* on SD medium was 40 µM, but a 6 hours treatment with 20 µM captan resulted in 97.7% reduction in yeast viability (Table 1). This concentration and time exposure was adopted to analyze captan effect on the reference strain *S. cerevisiae* BY4741.

A comparison between control (untreated) and captan-treated cells (Table 1) showed a significant

reduction of both cellular protein and non-protein thiol groups. This result confirms captan non-specific thiol reactivity as one of the most important direct effects of the phthalimide fungicides [3]. Moreover, captan-treated cells exhibited a drastic loss of membrane integrity, a typical necrotic behavior [16], which can be the result of the modification of membrane protein structures by protein sulfhydryl-disulfide transitions, and consequent increase in membrane permeability [17].

As previously observed in another thiol-reactant fungicide Mancozeb [18], captan-treated cells exhibited an important increase in ROS concentration. ROS accumulation can be related to the reduction of glutathione, the most important reducing compound in yeasts [19]. Moreover, ROS accumulation can induce apoptotic cell death, which in turns can be responsible for the difference between the percentage of necrotic cells (78.9%) and loss of culture-ability (97.7%).

Table 1. Viability, thiol content, membrane integrity, and ROS accumulation on control and 20 µM captan treated (6 hours) exponential growing yeast cells.

	Control	Captan	Difference
Viability (%)	100.00	5.30**	-97.7 %
NP-SH ¹	54.17	7.37**	-86.4 %
P-SH ¹	7.14	2.91**	-59.2 %
Membrane integrity ²	97.2	18.3**	-78.90 %
DHE fluorescence ³	14.7	70.4**	4.8 x
DHR fluorescence ³	13.2	39.4**	3.0 x

¹ µM cysteine/µg protein; ² percentage of cells (10,000 cells evaluated); ³ median fluorescence; ** significantly different (>0.01) from control.

Captan MIC determined in synthetic must (MD300) on seven *Saccharomyces* strains was 5 µM, except for BP725 (2.5 µM) and F15 (10 µM). This values are similar to those reported by Cabras et al [2] that observed complete inhibition of *S. cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* by 6.7 µM Folpet, a sister molecule of captan.

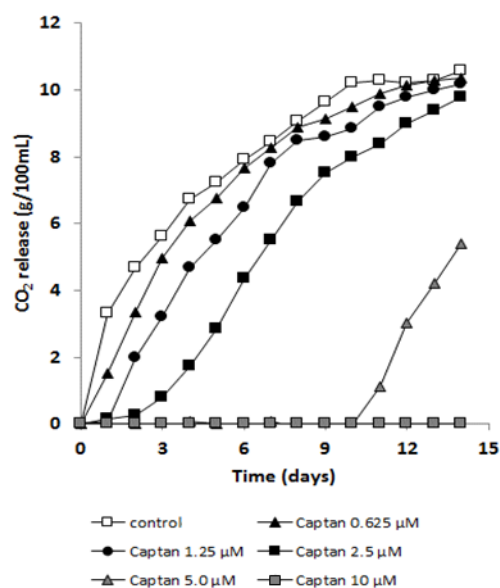


Figure 1. Fermentation behavior in increased concentrations of captan. Values are mean of three replications.

Captan MIC values under fermentation conditions are lower than those defined for aerobic active growing cells. Evaluation of pH and osmotic effect on captan MIC values, showed that where glucose concentration (2-20%) has not effect, the reduction of pH values directly affect captan toxicity varying from 20 μ M at pH 6.5 to 5 μ M at pH<5.0. Acidity and pH affects the dissociation of captan on their thiophosgene and tetrahydrophthalic acid moieties [20].

Fermentation experiments with different concentrations of captan were conducted in MD300 medium using the wine strain Y904. The results showed that 10 μ M captan completely inhibited fermentation, but in lower dosages the fungicide determined a dose dependent delay effect with an increase of 1, 3 and 9 day in the presence of 1.25, 2.5 and 5 μ M of captan, respectively (Fig. 1). Conversely, the maximum fermentation rate increased from 1.04, in the control, to 1.39 gCO₂/100ml/day in the 2.5 μ M captan treatment. Fermentation delay, inhibition of cell development and reproduction, and modification of wild yeasts population dynamics during wine fermentations, by low concentrations of phthalimide fungicides was previously reported [12].

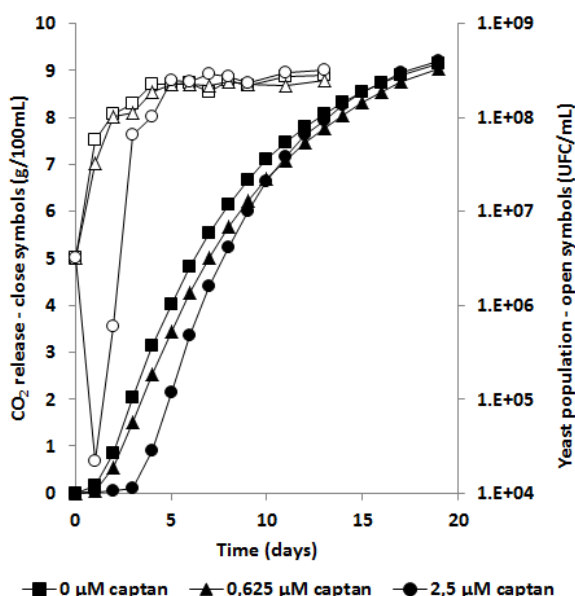


Figure 2. Yeast population and fermentation kinetics in sub-inhibitory concentrations of captan. Values are mean of three replications.

The evaluation of viable yeast population (CFU/ml) and fermentation behavior in control, 0.625 and 2.5 μ M captan confirmed a fermentation delay, particularly evident on the highest captan concentration (Fig. 2). The delay to begin fermentation in 2.5 μ M captan treatment was associated to a drastic initial decrease in the overall viable yeast population, which fall from 5×10^6 to 2.2×10^4 CFU/ml (99.6%) in the first 24 hours. However, the cells that remain viable rapidly adapted and grew, reaching 5×10^8 CFU/ml, the same population of the control, at the fifth day. Yeast adaptation to stress depends on the mode of action of

the stressing agent. Studies on *S. cerevisiae* adaptation to the thiol-reactive and pro-oxidant fungicide Mancozeb led to the identification of 286 genes that provide protection, most of which involved in oxidative stress response, protein degradation, and carbohydrate/energy metabolism, and controlled by the major yeast oxidative stress regulator, Yap1p [21].

A large number (24.5%) of small colonies were observed at the end of fermentations with 2.5 μ M of captan. These colonies were unable to grow on glycerol as only carbon source and confirmed as petite (respiratory deficient) mutants. The highest frequency of petite mutants can be attributed to the direct mutagenic action of the thiophosgene moiety of the captan molecule [4], to high ROS accumulation, and the adaptive advantage of mitochondrial defective petite yeast under the stress condition imposed by the fungicide [22].

Table 2. Wine fermentation parameters, cell mass and cellular thiols in the absence and presence of captan.

Parameter*	Captan		
	Control	0.625 μ M	2.5 μ M
Density	1.0050 ^A	1.0055 ^A	1.0023 ^A
pH	3.59 ^A	3.62 ^A	3.60 ^A
Ethanol (% v/v)	12.27 ^B	12.10 ^B	13.20 ^A
Glycerol (mg/L)	4.74 ^B	4.79 ^B	5.01 ^A
Residual Sugar (g/L)	17.71 ^A	16.62 ^A	9.42 ^B
Cellular T-SH ¹	4.69 ^B	5.32 ^B	11.57 ^A
Cell mass (gdw/L) ²	2.47 ^B	2.69 ^{AB}	3.25 ^A
Total acidity ³	7.55 ^B	7.75 ^{AB}	7.92 ^A
Volatile acidity ⁴	0.82 ^A	0.72 ^B	0.58 ^C

* Values are the means of three replicates, and different letters in each line are significantly different at the 0.05 level according to ANOVA by Tukey's test.

¹Total thiol groups (mg cysteine/mg protein); ² g dry weight/L; ³ g tartaric acid/L; ⁴ g acetic acid/L.

A comparison of fermentation parameters in the absence and presence of captan showed non-significant differences in wine density and pH (Table 2). However, wines obtained from 2.5 μ M captan treatments exhibited significantly higher concentrations of ethanol, glycerol, and total acidity, lower concentration of residual sugar, and a dose dependent decrease of volatile acidity. Yeast cells from 2.5 μ M captan treatments recovered at the end of fermentation showed higher concentration of total thiol groups, mainly glutathione. This increase may be part of the adaptation of yeast to glutathione (G-SH) depletion by the captan, as well as a response to ROS accumulation in the presence of the fungicide. In this sense, it is important to note that although progressively degraded in must and wines, phthalimide fungicides and their degradation products can remain at the end fermentation [2], and affect yeast behavior.

In summary, the data reported in this study showed that 20 μ M of captan drastically reduce the viability of aerobic active growing cells of *S. cerevisiae* in just 6 hours treatments. Captan treated cells exhibited loss of membrane integrity, reduction of protein and non-protein thiol compounds and increase in intracellular

ROS concentration, indicating necrotic and pro-oxidant activity. Under wine fermentation condition, pH stimulated fungicide dissociation resulting in a 4x reduction of MIC values. Fermentation delay caused by 2.5 μ M captan was associated to the reduction of yeast viability. However, those cells that survived the initial shock adapted to the fungicide, reassumed growth, and finished fermentation. Wines obtained from 2.5 μ M captan treatments showed higher concentrations of ethanol, glycerol, and total acidity, and lower volatile acidity. Moreover, yeast cells from 2.5 μ M captan treatments recovered at the end of fermentation showed higher concentration of total thiols, and almost 25% of them were respiratory deficient petite mutants.

4. References

1. FAO Report, www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Reports_1991-2006/Report97.pdf. (1997) Accessed on July 2016.
2. P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, G.A. Farris, C. Sotgiu, E.V. Minelli, J. Agric. Food Chem. **45**, 476 (1997)
3. R.J. Lukens, *The chemistry of fungicidal action*. (Springer-Verlag, New York, 2013)
4. G.T. Arce, E.B. Gordon, S.M. Cohen, P. Singh, Crit. Rev. Toxicol. **40**, 546 (2010)
5. V.F. Simmon, A.D. Mitchell, T.A. Jorgenson, US Environmental Protection Agency. Report n° EPA-600/1-77-028. MRID 132582 (1997)
6. M. Bertoldi, M. Griselli, M. Giovannetti, R. Barale, Environ. Mutagen. **2**, 359 (1980)
7. E. Zeiger Environ. Mol. Mutagen. **44**, 363 (2004)
8. A.J. Conner, Am. J. Enol. Vitic. **34**, 278 (1983)
9. M. Chiba, A.W. Brown, D. Danic, Can. J. Microbiol. **33**, 157 (1987)
10. N. Cadez, J. Zupan, P. Raspor, FEMS Yeast Res. **10**, 619 (2010)
11. R. Vadkertiova, E. Slavikova, Z. Naturforsch **66**, 588 (2011)
12. P. Caboni, P. Cabras, Adv. Food Nutr. Res. **59**, 43 (2010)
13. J.M. Salmon, P. Barre, Appl. Environ. Microbiol. **4**, 3831 (1998)
14. P.D. Demasi, G.A.G. Pereira, L.E.S. Netto FEBS J. **273**, 805 (2006)
15. Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts. Vol.2 (2015)
16. D.M. Wloch-Salomon, A.E. Bem, J. Appl. Microbiol. **114**, 287 (2012)
17. C. Yang, C. Hamel, V. Vujanovic, Y. Gan, ISRN Ecology 2011, Article ID 130289 (2011)
18. F.J. Scariot, L.M. Jahn, J.P. Maianti, A.P.L. Delamare, S. Echeverrigaray, Apoptosis **21**, 866 (2016)
19. G.G. Perrone, C.M. Grant, I.W. Dawes, Mol. Biol. Cell, **16**, 218 (2005)
20. A. Angioni, V.L. Garau, A. Aguilera del Real, M. Melis, E.V. Minelli, C. Tuberoso, P. Cabras, J. Agric Food Chem. **51**, 6761 (2003)
21. P.J. Dias, M.C. Teixeira, J.P. Telo, I. Sá-Correia, OMICS **14**, 211 (2010)
22. E. Casalone, E. Bonelli, M. Polsinelli, Folia Microbiol. **55**, 593 (2010)

4.4 CAPÍTULO 4

Morte celular necrótica induzida pelo fungicida dithianon em *Saccharomyces cerevisiae*

Scariot, F.J.¹; Jahn, L.¹; Delamare, A.P.L.¹; Echeverrigaray, S.^{1,2}

Artigo que será enviado para uma revista internacional.

Morte celular necrótica induzida pelo fungicida dithianon em *Saccharomyces cerevisiae*

Scariot, F.J.¹; Jahn, L.¹; Delamare, A.P.L.¹; Echeverrigaray, S.^{1,2}

¹Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Cytogene Diagnósticos Moleculares Ltda., Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil.

Resumo

O fungicida dithianon é utilizado no controle de vários fungos fitopatogênicos em pomares e videiras. Por apresentar atividades em múltiplos alvos na célula o dithianon pode afetar organismos não alvos, como leveduras e bactérias de solo. Neste estudo buscou-se elucidar a forma como o dithianon atua sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em condição aeróbica. Foi mostrado que a exposição de *S. cerevisiae*, crescida em condições aeróbicas, ao dithianon promove a redução do conteúdo de tióis, acumulação de espécies reativas de oxigênio e perda da integridade da membrana citoplasmática, sem ocorrer a externalização de fosfatidilserina. O efeito protetivo de compostos antioxidantes foi observado. Em conjunto esses dados indicam que dithianon provoca a morte celular necrótica em *S. cerevisiae*.

Palavras-chave: quinona, espécies reativas de oxigênio, necrose.

Introdução

O dithianon (5,10-dihidro-5,10-dioxonafto [2, 3-b]-1,4-ditiine-2,3-dicarbonitrile) é um fungicida de amplo espectro de ação pertencente ao grupo das quinonas, com atividade em vários alvos no interior da célula. Ele é utilizado para o controle de doenças fúngicas foliares nas culturas do pêssego, maçã e uva, atuando no controle de antracnose (*Colletotrichum gloesporioides*) e míldio (*Plasmopara viticola*), podendo ser utilizado durante todo o ciclo da

cultura, incluindo os estágios finais. Apesar do fungicida dithianon ser instável e rapidamente degradado em meio alcalino ele pode permanecer por até quatorze dias na superfície de uvas em condições de clima seco (Allison et al., 1999).

O dithianon reage de forma não específica com grupos tióis em sistemas biológicos, levando a inibição de enzimas importantes para via glicolítica como a hexoquinase, fosfofrutoquinase1 e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Sturdik & Drobnica, 1980). Além disso, o dithianon pode induzir a transformação celular in vitro da linhagem celular BALB/3T3 (Perocco et al. 1993). Outro efeito importante do dithianon é sobre o citocromo P-450 sugerindo um efeito cocarcinogênico (Paolini et al. 1997)

O efeito do dithianon em organismos não alvos é um fato a ser considerado, pois assim como outros fungicidas com atividade em múltiplos alvos o dithianon possui atividade sobre bactérias de solo, reduzindo sua diversidade (Liebich et al. 2003), também apresenta toxicidade sobre leveduras encontradas na superfície de maçãs (Gildemacher et al., 2004).

Neste contexto, o presente estudo buscou elucidar a forma como o fungicida dithianon provoca a morte celular de *S. cerevisiae*, com ênfase na atividade sobre grupos tióis, produção de ROS e alterações na membrana citoplasmática.

Material e Métodos

Linhagens de leveduras e meios de cultivo

A levedura *S. cerevisiae* BY4741 (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0) e os mutantes isogênicos Y06233 (*yca1::kanMX4*), Y0233 (*aif1::kanMX4*) e Y01217 (*nuc1::kanMX4*) foram obtidos da Euroscarf (Frankfurt, Alemanha). As leveduras foram crescidas a 28°C com agitação orbital (150 rpm) em meio YEPD (2 % de extrato de levedura, 1 % de peptona, 2 % de glicose, pH 6,5) ou meio YNB (0,67 % de *Yeast Nitrogen Base without aminoacids*, 2% de glicose, com 20 mg/L de histidina, metionina e uracila, e 60 mg/L

de leucina, pH 6,5). O dithianon foi obtido da *Sigma Aldrich*, a solução estoque (10 mM em DMSO) foi preparada antes de cada experimento.

Ensaio de viabilidade

As leveduras crescidas *overnight* em meio YEPD ($DO_{600nm} \sim 1,0$) foram transferidas para um novo frasco e crescidas até fase exponencial de crescimento ($DO_{600nm} \sim 0,7$), após 1×10^7 cels/mL foram lavadas com 0,9 % NaCl e inoculadas em meio YNB contendo diferentes concentrações de dithianon (0,0 a 4,0 μ M). As leveduras foram incubadas em agitador orbital (150 rpm; 28°C), e amostras foram plaquedadas em diluição seriada por gotejamento em placas de YEPD após 3 horas. O efeito da adição dos antioxidantes ácido ascórbico, cisteína e glutatona foi avaliado, onde leveduras crescidas até a fase exponencial foram incubadas com 0 a 5 mM da cada antioxidante por 30 min, as células foram lavadas, posteriormente foram tratadas com 2 μ M de captan e incubadas durante 180 minutos em agitador orbital (150 rpm; 28°C), após foram diluídas de forma seriada e plaqueadas por gota em YEPD. A contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada após 48 horas de crescimento. A viabilidade foi expressa em porcentagem comparada com o tratamento sem adição de fungicida.

Ensaio de integridade de membrana celular, produção de ROS, externalização de fosfatidilserina e quantificação de grupos sulfidrilas

A integridade da membrana citoplasmática foi avaliada através do kit *LIVE/DEAD® FungaLight™ yeast viability (Invitrogen)*, que possui os corantes SYTO9, que penetra em todas as células e colore os ácidos nucleicos, e iodeto de propídio (PI), que penetra apenas as células que apresentam alterações na membrana citoplasmática e colore os ácidos nucleicos. A coloração seguiu a recomendação do fabricante, onde 1×10^6 células tratadas com 2,0 μ M dithianon e sem fungicida foram diluídas em 500 μ L de PBS (pH 7,4), às células foram

adicionados 0,5 µL de PI (20 mM) e 0,5 µL de SYTO9 (3,34 mM), então elas foram incubadas por 20 min e após isso foram avaliadas por citometria de fluxo utilizando os filtros FL1 e FL3.

A avaliação da concentração intracelular de ROS foi realizada com a utilização dos corantes *dihydroethidium* (DHE, *Sigma*) e *dihydrorhodamine* 123 (DHR123, *Sigma*). Leveduras tratadas com 2 µM dithianon e sem tratamento foram incubadas com 5 µg/mL de DHE por 10 minutos ou 10 µg/mL de DHR123 por 30 minutos, após foram avaliadas por citometria de fluxo nos filtros FL3 e FL1 respectivamente.

A determinação de células apoptóticas foi realizada com o kit *Annexin-PE/7AAD* (BD *Pharmigen*), que quantifica a externalização de fosfatidilserina. Antes da coloração as células foram protoplastizadas, onde 1×10^6 células tratadas com dithianon ou sem tratamento foram centrifugadas e ressuspensas em tampão sorbitol (1,2 M sorbitol; 0,5 mM $MgCl_2$; 35 mM K_2HPO_4 ; pH 6,8), foram adicionados 5 U/mL de zimoliase e as leveduras foram incubadas durante 60 min a 30°C, após esse período os protoplastos foram lavados com tampão sorbitol e suspensos em 100 µL de tampão de coloração (1,2 M sorbitol; 10 mM HEPES/ NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM $CaCl_2$). Os protoplastos foram corados com 1,0 µL de AnnV-PE e 1,0 µL de 7AAD, incubados por 30 minutos a 30°C no escuro e então foram analisadas por citometria de fluxo utilizando os filtros FL2 e FL3. Células sem tratamento e tratadas com 50 mM de H_2O_2 foram utilizadas como controles negativo e positivo respectivamente.

Os ensaios envolvendo citometria de fluxo foram realizados em citometro de fluxo FACScalibur (BD Bioscience) equipado com um laser de argônio com emissão de 488 nm. As amostras foram analisadas pelo *side-scatter* e *forward-scatter* e em cada análise foram incluídas 10.000 células.

O efeito sobre grupos sulfidrilas foi avaliado em leveduras tratadas com diferentes concentrações de dithianon, após o período de incubação as células foram lavadas em NaCl 0,9 % e ressuspensas em uma solução de EDTA 20 mM, pH 4,7 para a extração proteica com

glass beads em vortex. A quantificação dos grupos sulfidril não proteicos (SH-NP) e ligados a proteínas (SH-P) foi realizada com o corante DTNB (ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoico; *Sigma Aldrich*) conforme descrito por Demasi *et al.* (2006).

Resultados e Discussão

A toxicidade do fungicida dithianon sobre *S. cerevisiae* foi avaliada em diferentes concentrações e tempos. Inicialmente foram testadas concentrações variando de 0,0 a 4,0 μM , observou-se que concentração de 4,0 μM reduziu a viabilidade a valores quase nulos (Fig. 1). Então para os ensaios seguintes a concentração de 2,0 μM de dithianon, que reduziu a viabilidade em aproximadamente 90 %, foi selecionada. A concentração de 2,0 μM (0,6 mg/L) corresponde a um valor cinco vezes menor do que o limite máximo de resíduo (LMR) permitido para o dithianon no Brasil (Anvisa, 2016), para a FAO (2016) o LMR estabelecido para uvas é dez vezes maior do que o determinado.

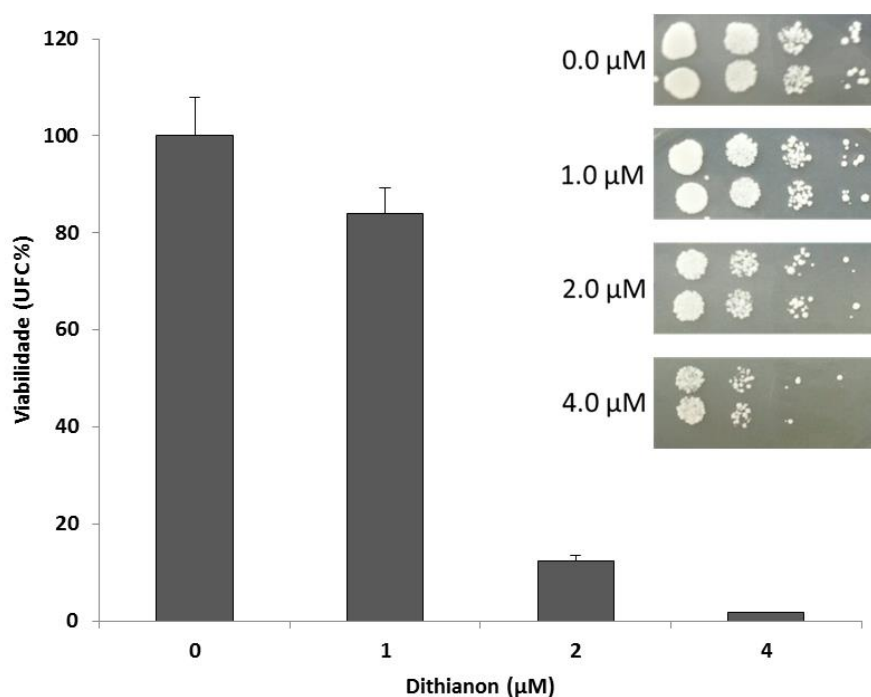


Figura 1. Avaliação da viabilidade de leveduras tratadas com diferentes concentrações de dithianon e incubadas por 3 h.

A integridade da membrana citoplasmática foi avaliada também com a utilização do kit fluorescente *Live/Dead* (kit contendo o corante vital SYTO9® e corante impermeável em células viáveis PI). Este ensaio mostrou que o dithianon na concentração de 2,0 μM leva a um aumento (87,80 %; Fig. 2B) na quantidade de leveduras com alterações na membrana citoplasmática em comparação com as células sem tratamento (8,23 %; Fig. 2A). A perda na integridade da membrana citoplasmática é um conhecido marcador necrótico (Eisenberg et al., 2010).

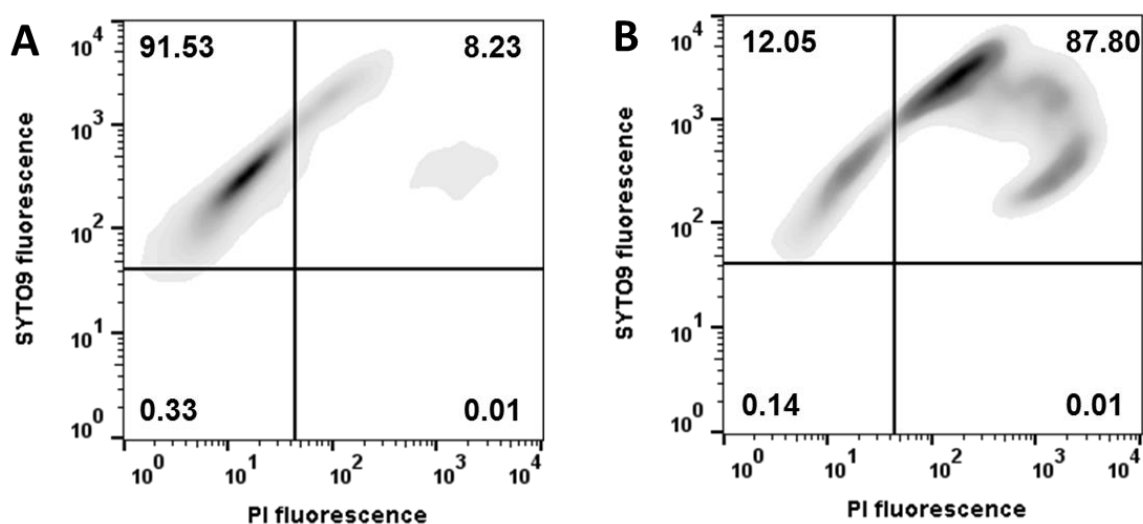


Figura 2. Avaliação da integridade da membrana citoplasmática utilizando o *kit Live/Dead*. **A** leveduras sem tratamento com fungicida; **B** leveduras tratadas com 2,0 μM de dithianon. Os números internos são a porcentagem de cada quadrante de um total de 10.000 células.

A quantidade intracelular de grupos tióis decresce de forma dependente do aumento na concentração de dithianon, não havendo distinção entre SH-NP e SH-P (Fig. 3A), o efeito do dithianon sobre grupos tióis já havia sido descrito para células de carcinoma de Ehrlich (Sturdik & Drobnica, 1980), aqui se confirmou esse efeito para *S. cerevisiae*.

Dentre os compostos com grupos tióis não proteicos se encontra a glutathiona, um importante antioxidante para célula, portanto alterações na quantidade de glutathiona reduzida pode ocasionar a elevação na quantidade de ROS no interior da célula (Morano *et al.*, 2012).

Fato que foi observado durante a avaliação do conteúdo intracelular de ROS, onde leveduras tratadas com 2,0 μM de dithianon apresentaram aumento na fluorescência em comparação com leveduras não tratadas, este aumento foi de 20 vezes quando avaliada com corante DHE (Fig. 3C) e cinco vezes quando avaliada com o corante DHR123 (Fig. 3D).

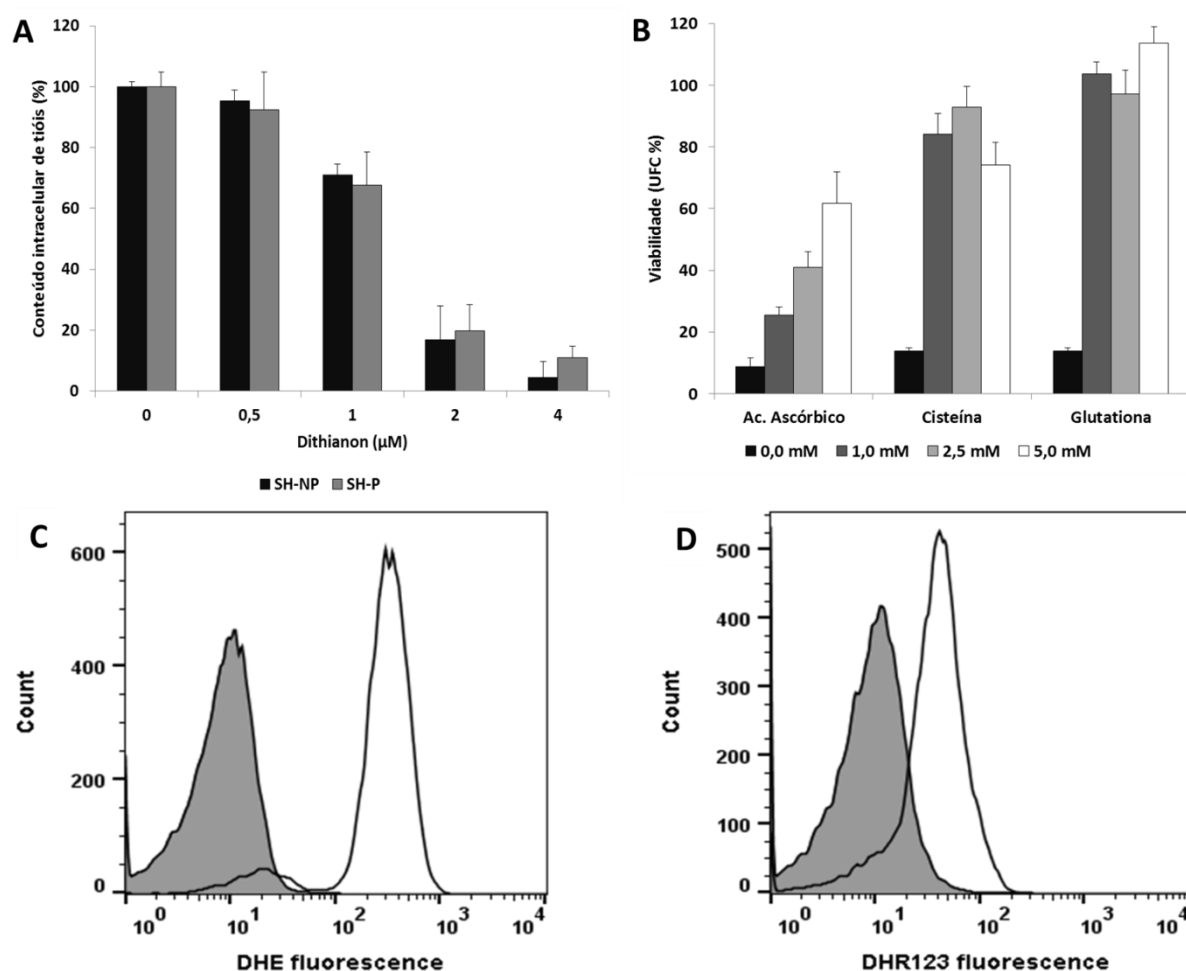


Figura 3. Quantificação do conteúdo intracelular de grupos SH não proteicos (SH-NP) e proteicos (SH-P) em células tratadas com 2,0 μM de dithianon por 3 h (A). Avaliação da viabilidade de células tratadas previamente com antioxidantes e posteriormente tratadas com 2,0 μM de dithianon por 3 h (B). Quantificação por citometria de fluxo da produção de ROS em células sem tratamento (cinza) e tratadas com 2,0 μM de dithianon (branco) utilizando os corantes DHE (C) e DHR123 (D). Os ensaios foram realizados em triplicata.

O aumento na quantidade intracelular de ROS nas leveduras tratadas com dithianon, em comparação com as leveduras não tratadas, pode indicar um efeito pró-oxidante do fungicida. Buscando verificar a relevância deste efeito as leveduras foram tratadas previamente com diferentes concentrações de agentes antioxidantes e posteriormente expostas ao dithianon. Os resultados mostraram que leveduras tratadas com ácido ascórbico, cisteína e glutathione apresentaram uma maior viabilidade em comparação com as leveduras sem antioxidantes (Fig. 4B). Destaca-se o efeito positivo da adição de cisteína e glutathione, dois compostos com grupos tióis em suas moléculas, o que confirma a relevância do efeito do dithianon sobre grupos tióis. Esse resultado indica que o efeito oxidativo provocado pelo fungicida em leveduras é um fator importante para a morte celular ocasionada pelo dithianon.

O aumento na quantidade de ROS intracelular gerada pelo dithianon poderia sugerir um efeito apoptótico relacionado com sua forma de induzir a morte, então foi realizada a avaliação do efeito do dithianon sobre linhagens de leveduras com genes da via apoptótica não funcionais. Foram avaliadas as linhagens $\Delta yca1$, $\Delta aif1$ e $\Delta nuc1$, onde se observou que a ausência destes genes não recupera a viabilidade de leveduras tratadas com dithianon, indicando que não há envolvimento da via apoptótica na morte celular por dithianon (dados não apresentados).

Outro marcador utilizado para verificar a presença de apoptose foi a externalização de fosfatidilserina, avaliada com o kit *AnnexinV-PE/7AAD*, onde observou-se que as células tratadas com 2,0 μM de dithianon não apresentavam a exposição de fosfatidilserina uma vez que AnnexV-PE ficou em níveis basais, entretanto o marcador de integridade de membrana 7AAD apresentou células positivas de forma proporcional a concentração de dithianon utilizada (Fig 4). A elevação na quantidade de células com 7AAD positivo sem o aumento de AnnexV-PE é um indicativo de que o dithianon induz necrose em *S. cerevisiae*.

A indução de morte celular por necrose já foi observada para outros compostos em *S. cerevisiae*, como a tunicamicina (Dudgeon et al. 2008) e concentrações elevadas de H_2O_2

(Madeo et al. 1999), ácido acético (Ludovico et al. 2001), cobre e manganês (Liang & Zhou, 2007).

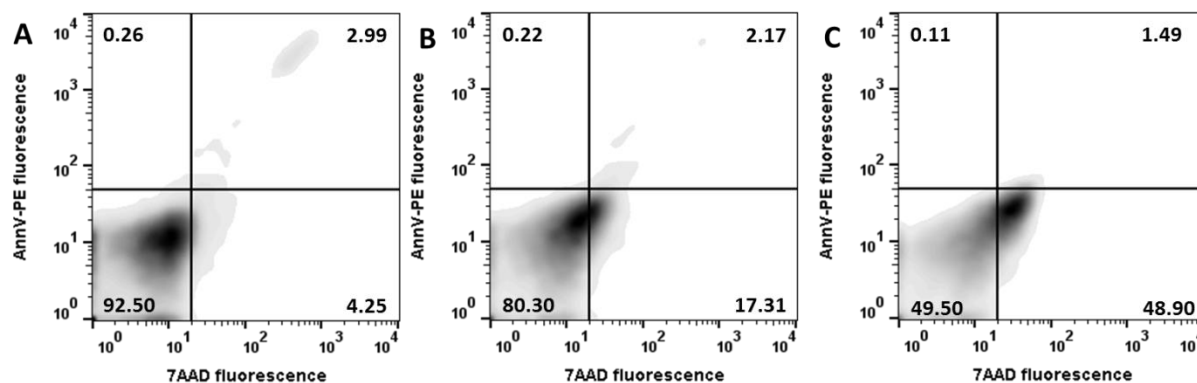


Figura 4. Avaliação por citometria de fluxo da externalização de fosfatidilserina utilizando os corantes AnnexinV-PE/7AAD. **A** levedura sem tratamento com fungicida; **B** leveduras tratadas com 2,0 μM de dithianon; **C** leveduras tratadas com 10,0 μM de dithianon. Os valores internos indicam porcentagem de cada quadrante, foram analisadas 10.000 células.

Os resultados apresentados indicam que a morte celular provocada por dithianon em *S. cerevisiae* crescidas aerobiamente está envolvida com a redução de grupos tióis proteicos e não proteicos, o aumento na concentração intracelular de ROS e a perda de integridade da membrana citoplasmática, sem que ocorra a externalização de fosfatidilserina, tudo isso suporta o efeito necrótico do dithianon.

Referências Bibliográficas

- Allinson, M.; Williams, B.; Allinson, G.; Stagnitti, F. (1999). Environmental fate of pesticides used in Australian viticulture III. Fate of dithianon from vine to wine. **Toxicol. Environ. Chem.** 70: 385-400.
- Anvisa. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B15011-1-0%5D.PDF>> Acesso em: ago 2016.

- Demasi, P.D.; Pereira, G.A.G.; Netto, L.E.S. (2006) Influences of cytosolic thioredoxin peroxidase I and of the mitochondrial functional state. **FEBS Journal** 273: 805–816.
- Dudgeon, D.D.; Zhang, N.; Ositelu, O.O.; Kim, H.; Cunningham, K.W. (2008) Nonapoptotic death of *Saccharomyces cerevisiae* cells that is stimulated by Hsp90 and inhibited by calcineurin and Cmk2 in response to endoplasmic reticulum stresses. **Eukaryot. Cell** 7:2037–2051
- Eisenberg, T.; Knauer, H.; Schauer A.; Büttner, S.; Ruckenstuhl, C.; Carmona-Gutierrez, D.; Ring, J.; Schroeder, S.; Magnes, C.; Antonacci, L.; Fussi, H.; Deszcz, L.; Hartl, R.; Schram, E.; Criollo, A.; Megalou, E.; Weiskopf, D.; Laun, P.; Heeren, G.; Breitenbach, M.; Grubeck-Loebenstien, B.; Herker, E.; Fahrenkrog, B.; Fröhlich, K.; Sinner, F.; Tavernarakis, N.; Minois, N.; Kroemer, G.; Madeo. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. **Nat. Cell Biol.** 11: 1305–1314.
- Eisenberg, T.; Carmona-Gutierrez, D.; Büttner, S.; Tavernarakis, N.; Madeo, F. (2010) Necrosis in yeast. **Apoptosis** 15:257–268
- FAO. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/019/i3518e/i3518e.pdf>>. Acesso em: ago 2016.
- Galluzzi, L.; Aaronson, S.A.; Abrams, J. et al (2009) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell Death Differ.** 16:1093–1107.
- Gildemacher, P.R.; Heijne1, B.; Houbroken, J.; Vromans, T.; Hoekstra, E.S.; Boekhout, T. (2004). Can phyllosphere yeasts explain the effect of scab fungicides on russetting of Elstar apples? **Eur. J. Plant Pathol.** 110: 929–937.
- Liebich, J.; Schäffer, A.; Burauel, P. (2003) Structural and functional approach to studying pesticide side-effects on specific soil functions. **Environ. Toxicol. Chem.** 2(4): 784–790.

- Liang, Q.; Zhou, B. (2007) Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. **Mol Biol Cell**. 18:4741–4749.
- Ludovico, P.; Sousa, M.J.; Silva, M.T.; Leao, C.; Corte-Real, M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. **Microbiology**. 147: 2409–2415.
- Madeo, F.; Frohlich, E.; Ligr, M.; Grey, M.; Sigrist, S.J.; Wolf, D.H.; Frohlich, K.U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. **J. Cell Biol**. 145: 757–767.
- Morano, K. A.; Grant, C. M.; Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**. 190(4): 1157-1195.
- Paolini, M.; Mesircab, R.; Pozzettia, L.; Saponec, L.; Cantelli-Fortia, G. (1997). Biomarkers of effect in evaluating dithianon cocarcinogenesis: selective induction and suppression of murine CYP3A isoform. **Cancer Lett**. 113: 221-228.
- Perocco, P.; Colacci, A.; Grilli, S. (1993). In vitro cytotoxic and cell transforming activities exerted by the pesticides cyanazine, dithianon, diflubenzuron, procymidone, and vinclozolin on BALB/c 3T3 cells. **Environ. Mol. Mutagen**. 21: 81-86
- Sturdik, E.; Drobnica L. (1980). Effect of 2,3-dinitrilo-1,4-dithia-9,10-antraquinone on Ehrlich ascites carcinoma and yeast cells. **Chem. Biol. Interactions**, 30: 105-114.

5 DISCUSSÃO GERAL

Fungicidas com atividade sobre múltiplos alvos acabam por afetar de forma inespecífica tanto fungos fitopatogênicos, como organismos não alvos, incluindo microrganismos de solo e leveduras (Yang *et al.*, 2011). Neste trabalho foram avaliados os efeitos dos fungicidas mancozeb, captan e dithianon sobre *S. cerevisiae*.

Esses fungicidas apresentam em comum a atividade sobre múltiplos alvos nas células, estando relacionados principalmente com a atividade sobre grupos tiois e interferências em enzimas importantes para o metabolismo celular (Sturdik & Drobnica, 1980; Gordon, 2010; Gullino *et al.*, 2010).

As concentrações que mataram 90% das leveduras foram diferentes para o mancozeb (100 μ M e 6 h), o captan (20 μ M e 6 h) e o dithianon (2 μ M e 3 h). Essas diferenças não apresentam relação com o intervalo de segurança desses fungicidas. Em videiras, por exemplo, o intervalo de segurança do mancozeb é de sete dias, do captan um dia e do dithianon 28 dias no Brasil (ANVISA, 2016), enquanto para a agência reguladora europeia, os intervalos de segurança são: mancozeb – sete dias, captan – um dia e dithianon – 42 dias (EFSA, 2016).

Leveduras tratadas com cada um dos três fungicidas apresentaram em comum a acumulação de ROS, conforme detectado por marcadores fluorescentes. O aumento na concentração intracelular de ROS pode ser atribuído à reatividade destes fungicidas, principalmente o captan e o dithianon, com a glutathione, um importante antioxidante intracelular (Schafer & Buettner, 2001). A glutathione está envolvida em diversas reações no interior da célula, atuando como doador de elétrons para enzimas antioxidantes, incluindo a glutathione peroxidase e a glutathione reductase (Inoue *et al.*, 1999). O acúmulo de ROS em células tratadas com mancozeb pode também, ser atribuído a sua porção metálica (Mn e Zn), pois assim como outros metais de transição podem atuar na formação de ROS (Pagani *et al.*, 2007;

Nargund *et al.*, 2008; Bussche *et al.*, 2011)

Os fungicidas atuaram de forma diferencial sobre a membrana citoplasmática, o mancozeb parece não atuar sobre a mesma e os fungicidas captan e dithianon interferem na membrana citoplasmática. A membrana citoplasmática é composta essencialmente por lipídios e proteínas, baseado no efeito sobre grupos tióis observado para os fungicidas captan e dithianon existe a possibilidade de que eles atuem sobre proteínas de membrana, especialmente porinas que dependem da estabilidade de suas ligações dissulfetos (Heijne, 1994).

A avaliação da presença de leveduras em processo apoptótico devido ao tratamento com os fungicidas foi realizada a partir da detecção da externalização da fosfatidilserina. As células tratadas com mancozeb apresentaram como principal forma de morte a apoptose, a maior parte das leveduras tratadas com captan morreram por necrose e o restante morreu por apoptose e a exposição ao dithianon levou à morte por necrose. A forma como um composto leva uma célula à morte pode variar dependendo da concentração utilizada, de forma geral, compostos que induzem apoptose em determinada concentração provocam necrose quando esta concentração é aumentada, isso já foi observado em leveduras tratadas com compostos como o peróxido de hidrogênio (Madeo *et al.*, 1999) e o ácido acético (Madeo *et al.*, 2002). Os fungicidas mancozeb e captan, embora os resultados não tenham sido apresentados, seguiram essa tendência e leveduras tratadas com concentrações cinco vezes superiores as concentrações inibitórias mínimas (500 μ M para o mancozeb e 100 μ M para o captan) morreram de forma necrótica.

A via apoptótica seguida por células tratadas com mancozeb e captan foi a mesma, metacaspase dependente. Conforme observado pela viabilidade das leveduras com deleções em genes da via apoptótica ($\Delta yca1$, $\Delta nuc1$ e $\Delta aif1$) tratadas com mancozeb ou captan, sendo observado que apenas a linhagem com deleção em *YCA1* apresentou viabilidade maior em comparação com a linhagem sem deleção. Diversos compostos já foram descritos como

indutores de apoptose com ativação de metacaspase em leveduras, como peróxido de hidrogênio (Madeo *et al.*, 1999), ácido acético (Madeo *et al.*, 2002), ácido valpróico (Mitsui *et al.*, 2005), cádmio (Nargund *et al.*, 2008), manganês (Liang & Zhou, 2007) e chumbo (Bussche & Soares, 2011).

A reatividade do captan está relacionada principalmente com a sua porção tiofosgene (SCCl_2), que apresenta elevada reatividade com grupos tióis, a parte restante da molécula é o 1,2,3,6-tetrahidroftalimida (THPI) e pode formar outros intermediários (Fig. 5). O tiofosgene é um composto volátil, sendo hidrolisado e produzindo ácido clorídrico, gás sulfídrico e sulfeto de carbono (Siegel, 1971). Dados experimentais mostraram que a eficácia do captan depende da dissociação destes dois grupos, já que análogos com ligações muito estáveis se mostraram fungicidas ineficientes, enquanto análogos com ligações frágeis eram degradados espontaneamente e não possuíam atividade fungicida (Horsfall & Rich, 1957; Lukens, 1966).

A velocidade de hidrólise do captan é aumentada em pH básico, fazendo com que concentrações maiores de captan sejam necessárias para que se observe o efeito fungicida do composto em pH ácidos (Gordon, 2010). Entretanto, os resultados obtidos mostraram que o captan apresenta maior eficiência (menor concentração inibitória mínima) em pH baixo (3,5), indicando que a eficiência é inversamente relacionada com a velocidade de hidrólise.

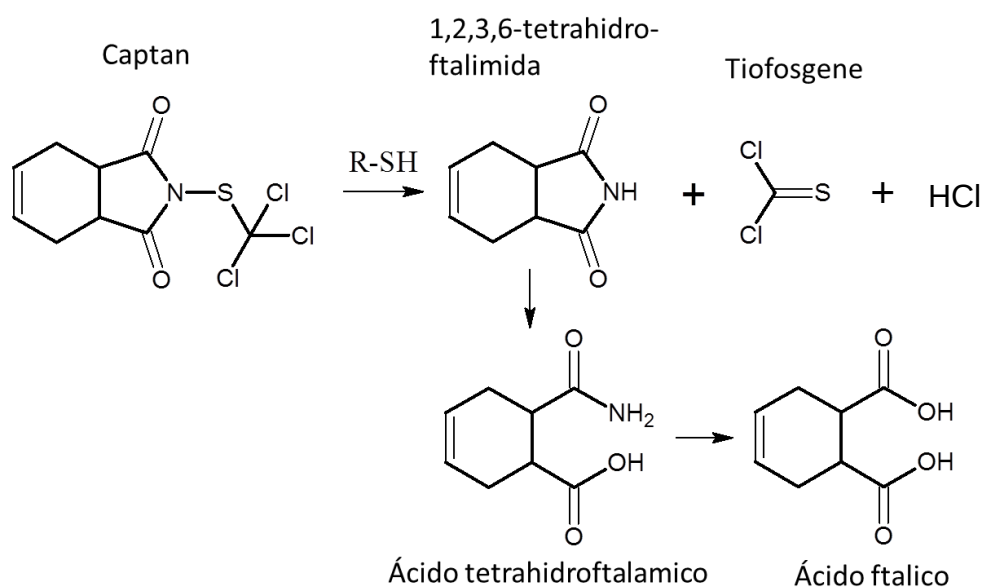


Figura 5. Esquema da reação do captan com grupos tióis (Adaptado de Roberts & Hutson, 1999).

O mancozeb é instável em solução aquosa e é rapidamente decomposto em presença de luz ou calor. Os principais produtos da hidrólise do mancozeb são etilenotiouréia (ETU) e sulfeto de etilenobis-(isotiocianato) (EBIS), que posteriormente podem ser degradados a outros compostos mais simples (Fig. 6). Além da parte orgânica, a hidrólise do mancozeb libera os metais que estavam associados (Mn e Zn).

A atividade fungicida do mancozeb está associada tanto a parte metálica quanto a porção ETU e seus derivados, sendo esta última responsável pela reatividade com grupos tióis (Dias *et al.*, 2010). Outros ditiocarbamatos similares ao mancozeb, porém com outros metais na sua constituição, como o nabam (sódio) acabam apresentando menor estabilidade e consequentemente menor eficiência na sua atividade fungicida (Domico *et al.*, 2006).

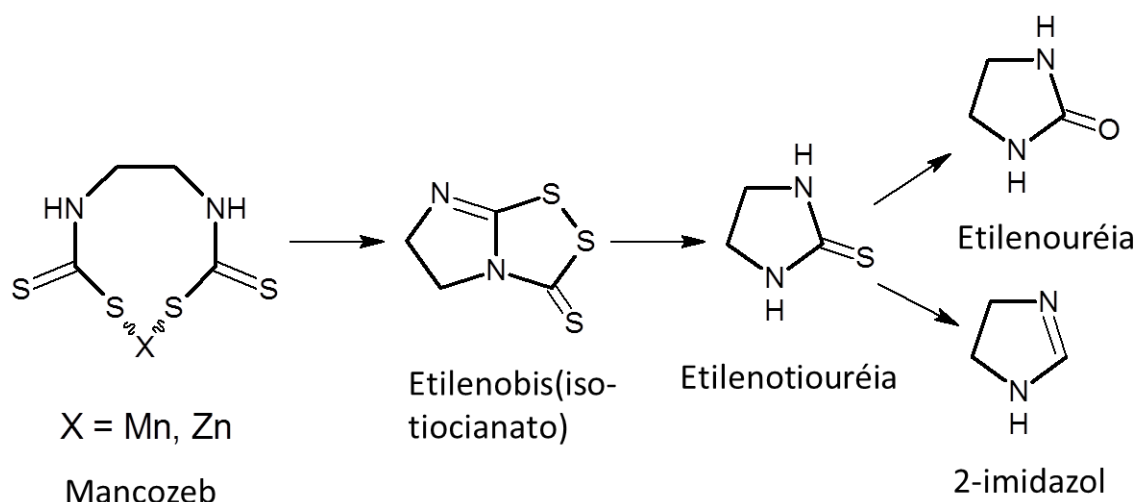


Figura 6. Esquema da hidrólise do mancozeb e formação dos compostos intermediários. (Adaptado de López-Fernández *et al.*, 2016).

A atividade do dithianon como fungicida é dependente da estabilidade da molécula, possuindo interferência do pH, em pH inferior a cinco a hidrólise do dithianon ocorre de forma mais acelerada (FAO, 2014). Os principais produtos da hidrólise do dithianon estão representados na figura 7.

Uma comparação do efeito do pH sobre a hidrólise do captan (Gordon, 2010) e do

dithianon (FAO, 2014) mostra que estes dois compostos respondem de forma inversa a pHs básicos ou ácidos. Enquanto o captan apresenta maior hidrólise em pHs básicos, o dithianon hidrolisa preferencialmente em pHs ácidos. Em ambos os casos, os dados referentes à eficiência, através da comparação das concentrações inibitórias mínimas (CIM), mostram uma relação inversa com a velocidade de hidrólise e as CIMs de ambos fungicidas. Esta discrepância observada pode ser explicada pela forma como o captan (Figura 5) e o dithianon reagem com os grupos tiólicos, já que dados experimentais indicam que apenas a molécula íntegra reage com grupos tiólicos, e conseqüentemente, a hidrólise prévia pode reduzir o potencial fungicida. Outra hipótese para este fenômeno pode estar relacionada com a penetração dos fungicidas ou dos seus derivados hidrolisados na célula, ou ainda com a volatilidade ou reatividade dos hidrolisados com compostos extracelulares.

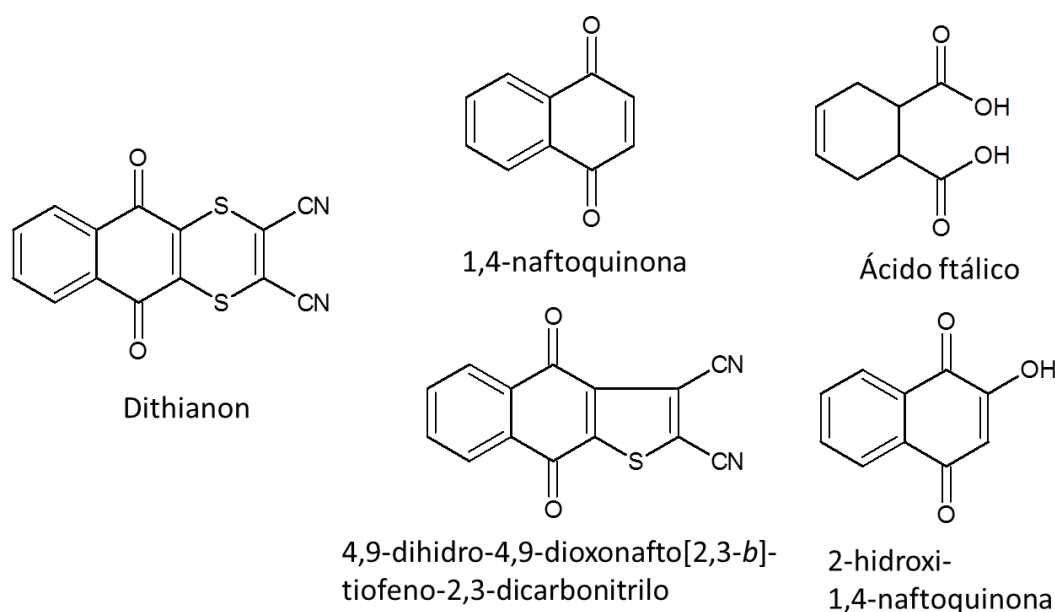


Figura 7. Produtos da hidrólise do dithianon (Adaptado de FAO, 2014).

De forma geral este trabalho mostrou-se relevante para a elucidação da forma como os fungicidas mancozeb, captan e dithianon levam a levedura *S. cerevisiae* a morte celular.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- o fungicida mancozeb provoca a morte celular de *S. cerevisiae* através de uma ação pró-oxidante, levando a indução de apoptose via metacaspase dependente;
- o fungicida captan leva a levedura *S. cerevisiae* a morte celular por duas vias, uma necrótica atuando sobre a membrana citoplasmática, e uma apoptótica via metacaspase dependente, ocasionada pela reação com tióis não proteicos e consequente elevação na quantidade intracelular de ROS;
- o captan interfere nas fermentações vínicas, podendo atrasar o seu início ou interromper a mesma, dependendo da concentração adicionada;
- o fungicida dithianon promove a morte celular de *S. cerevisiae* de forma necrótica, com efeitos na membrana citoplasmática e reatividade com grupos tióis.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- Ahn, S.H.; Cheung, W.L.; Hsu, J.Y.; Diaz, R.L.; Smith, M.M.; Allis, C.D. (2005). Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. **Cell**. 120: 25–36.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2010). **Biologia Molecular da Célula**. 5 Ed. Porto Alegre: Artmed. 1054p.
- Allinson, M.; Williams, B.; Allinson, G.; Stagnitti, F. (1999). Environmental fate of pesticides used in Australian viticulture III. Fate of dithianon from vine to wine. **Toxicol. Environ. Chem.** 70: 385-400.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2016). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 20 out 2016.
- Arce, G.T.; Gordon, E.B.; Cohen, S.M.; Singh, P. (2010). Genetic toxicology of folpet and captan. **Crit. Rev. Toxicol.** 40 (6): 546-574.
- Attfield, P.V. (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial bakers yeast. **Nat. Biotechnol.** 15: 1351–1357.
- Avery, A.M.; Avery, S.V. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. **J. Biol. Chem.** 276: 33730-33735.
- Bauer, F.F.; Pretorius, I.S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a review. **S. Afr. J. Enol.** 21: 27–51.
- Belpoggi, F.; Soffritti, M.; Guarino, M.; Lambertini, L.; Cevolani, D.; Maltoni, C. (2002). Results of Long-Term Experimental Studies on the Carcinogenicity of Ethylene-bis-Dithiocarbamate (Mancozeb) in Rats. **Ann. NY. Acad. Sci.** 982: 123-136.
- Boran, H.; Capkin, H.; Altinok, I.; Terzi, E. (2012). Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout. **Exp. Toxicol. Pathol.** 64: 175-179.
- Bussche, J.V.; Soares, E.V. (2011). Lead induces oxidative stress and phenotypic markers of apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 90: 679–687.
- Büttner, S.; Eisenberg, T.; Carmona-Gutierrez, D.; Ruli, D.; Knauer, H.; Ruckenstein, C.; Sigrist, C.; Wissing, S.; Kollroser, M.; Frohlich, K.U.; Sigrist, S.; Madeo, F. (2007). Endonuclease G regulates budding yeast life and death. **Mol. Cell.** 25 233–246.
- Büttner, S.; Eisenberg, T.; Herker, E.; Carmona-Gutierrez, D.; Kroemer, G.; Madeo, F. (2006). Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love and war. **J. Cell Biol.** 175(4): 521-525.
- Cadez, N.; Zupan, J.; Raspor, P. (2010). The effect of fungicides on yeast communities associated

- with grape berries. **FEMS Yeast Res.** 10: 619-630.
- Calhelha, R.C.; Andrade, J.V.; Ferreira, I.C.; Estevinho, L.M. (2006). Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. **Food Microbiol.** 23: 393-398.
- Calviello, G.; Piccioni, E.; Boninsegna, A.; Tedesco, B.; Maggiano, N.; Serini, S.; Wolf, F.I.; Palozza, P. (2006). DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. **Toxicol. Appl. Pharm.** 211: 87-96.
- Castor, J.G.B.; Nelson, K.E.; Harvey, J.M. (1957). Effect of captan residues on fermentation of grapes. **Am. J. Enol. Viticult.** 8: 50-57.
- Chae, H.Z.; Chung, S.J.; Rhee, S.G. (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. **J. Biol. Chem.** 269: 27670–27678.
- Collinson, L.P.; Dawes, I.W. (1995). Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase. **Gene.** 156: 123–127.
- Culotta, V.C. (2000). Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. **Curr. Top. Cell. Regul.** 36: 117–132.
- Culotta, V.C.; Yang, M.; O'Halloran, T.V. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. **Biochim. Biophys. Acta.** 1763: 747–758.
- Cus, F.; Raspor, P. (2008). The effect of pyrimethanil on the growth of wine yeasts. **Lett. Appl. Microbiol.** 47: 54-59.
- Debieu, D.; Bach, J.; Lasseron, A.; Malosse, C.; Leroux, P. (1998). Effects of sterol biosynthesis inhibitor fungicides in the phytopathogenic fungus, *Nectria haematococca*: ergosterol depletion versus precursor or abnormal sterol accumulation as the mechanism of fungitoxicity. **Pestic. Sci.** 54: 157–167.
- Delaunay, A.; Pflieger, D.; Barrault, M.B.; Vinh, J.; Toledano, M.B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. **Cell.** 111: 471–481.
- Dias, P.J.; Teixeira, M.C.; Telo, J.P.; Sá-Correia, I. (2010). Insights into the mechanisms of toxicity and tolerance to the agricultural fungicide Mancozeb in yeast, as suggested by a chemogenomic approach. **OMICS.** 14: 211-227.
- Diezmann, S. (2014). Oxidative stress response and adaptation to H₂O₂ in the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* and its human pathogenic relatives *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Fungal Biol. Rev.** 28: 126-136.
- Domico, L.M.; Cooper, K.R.; Bernard, L.P.; Zeevalk G.D. (2007). Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. **Neurotoxicology.** 28: 1079–1091.
- Domico, L.M.; Zeevalk, G.D.; Bernard, L.P.; Cooper, K.R. (2006). Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial

- dysfunction. **Neurotoxicology**. 27: 816-825.
- Du, L.; Yu, Y.; Chen, J.; Liu, Y.; Xia, Y.; Chen, Q.; Liu, X. (2007). Arsenic induces caspase- and mitochondria-mediated apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.** 7: 860–865.
- EFSA, European Food Safety Authority. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/>>. Acesso em: 3 nov. 2016.
- Eisenberg, T.; Knauer, H.; Schauer A.; Büttner, S.; Ruckenstuhl, C.; Carmona-Gutierrez, D.; Ring, J.; Schroeder, S.; Magnes, C.; Antonacci, L.; Fussi, H.; Deszcz, L.; Hartl, R.; Schram, E.; Criollo, A.; Megalou, E.; Weiskopf, D.; Laun, P.; Heeren, G.; Breitenbach, M.; Grubeck-Loebenstien, B.; Herker, E.; Fahrenkrog, B.; Fröhlich, K.; Sinner, F.; Tavernarakis, N.; Minois, N.; Kroemer, G.; Madeo. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. **Nat. Cell Biol.** 11: 1305–1314.
- Fahrenkrog, B.; Sauder, U.; Aebi, U. (2004). The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. **J. Cell Sci.** 117: 115–26.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014). **Pesticide residues in food**. 2013. Roma, Itália. 625 p.
- Fannjiang, Y.; Cheng, W.C.; Lee, S.J.; Qi, B.; Pevsner, J.; McCaffery, J.M.; Hill, R.B.; Basanez, G.; Hardwick, J.M. (2004). Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. **Genes Dev.** 18: 2785–2797.
- Favaloro, B.; Allocati, N.; Graziano, V.; Di Ilio, C.; de Laurenzi, V. (2012). Role of Apoptosis in disease. **Aging**. 4(5): 330–349.
- Fisher, H.L.; Hall, L.L.; Sumler, M.R.; Shah, P.V. (1992). Dermal penetration of [14C]captan in young and adult rats. **J. Toxicol Environ Health**. 36: 251–271.
- FRAC, **Fungicide Resistance Action Committee**. Disponível em: <http://www.frac.info/>. Acesso em: ago. 2016.
- Galiuzzo, F.; Schiesser, A.; Rotilio, G. (1987). Glutathione peroxidase in yeast. Presence of the enzyme and induction by oxidative conditions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 147: 1200-1205.
- Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J.M.; Alnemri, E.S.; Baehrecke E.H.; Blagosklonny, M.V.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L.; El-Deiry, W.S.; Fulda, S.; Gottlieb, E.; Green, D.R.; Hengartner, M.O.; Kepp, O.; Knight, R.A.; Kumar, S.; Lipton, S.A.; Lu, X.; Madeo, F.; Malorni, W.; Mehlen, P.; Nuñez, G.; Peter, M.E.; Piacentini, M.; Rubinsztein, D.C.; Shi, Y.; Simon, H-U.; Vandenabeele, P.; White, E.; Yuan, J.; Zhivotovsky, B.; Melino, G.; Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ.** 19: 107–120.

- Garrido, E.O.; Grant, C.M. (2002). Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. **Mol. Microbiol.** 43: 993–1003.
- Gildemacher, P.R.; Heijne1, B.; Houbraeken, J.; Vromans, T.; Hoekstra, E.S.; Boekhout, T. (2004). Can phyllosphere yeasts explain the effect of scab fungicides on russetting of Elstar apples? **Eur. J. Plant Pathol.** 110: 929–937.
- Gisi, U. (2002). **Chemical control of downy mildews**. In: Spencer-Phillips, P.T.N.; Gisi, U.; Lebeda, A. (Eds.) **Advances in downy mildew research**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 119–159.
- Gisi, U.; Sierotzki, H. (2008). Fungicides modes of action and resistance in downy mildews. **Eur. J. Plant Pathol.** 122: 157-167.
- Gordon, E.B. (2010). **Captan and folpet**. In: Krieger, R. (Ed.) **Hayes Handbook of Pesticide Toxicology**. Elsevier, New York. p. 1915–1949.
- Grant, C.M.; Collinson, L.P; Roe, J.H.; Dawes, I.W. (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. **Mol. Microbiol.** 21: 171–179.
- Greetham, D.; Grant, C.M. (2009). Antioxidant activity of the yeast mitochondrial 1-Cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and glutathione in vivo. **Mol. Cell Biol.** 29: 3229–3240.
- Guaragnella, N.; Pereira, C.; Sousa, M.J.; Antonacci, L.; Passarella, S.; Corte-Real, M.; Marra, E.; Giannattasio, S. (2006). *YCA1* participates in the acetic acid induced yeast programmed cell death also in a manner unrelated to its caspase-like activity. **FEBS Lett.** 580: 6880–6884.
- Gullino, M.L.; Tinivella, F.; Garibaldi, A.; Kemmitt, G.M.; Bacci, L.B. (2010). Mancozeb Past Present and Future. **Plant Dis.** 94(9): 1076-1087.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant. Physiol.** 141: 312–322.
- Hasan, R.; Leroy, C.; Isnard, A.D.; Labarre, J.; Boy-Marcotte, E.; Toledano, M.B. (2002). The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. **Mol. Microbiol.** 45: 233–241.
- He, X.; Mulford, K.E.; Fassler, J.F. (2009). Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. **Eukaryot. Cell.** 8 (5): 768-778.
- Heijne, G.V. (1994). Membrane proteins: from sequence to structure. **Annu Rev Bioph Biom.** 23(1): 167-192.
- Herker, E.; Jungwirth, H.; Lehmann, K.A.; Maldener, C.; Frohlich, K.U; Wissing, S.; Büttner, S.; Fehr, M.; Sigrist, S.; Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. **J. Cell Biol.** 164: 501–507.

- Hiltunen, J.K.; Mursula, A.M.; Rottensteiner, H.; Wierenga, R.K.; Kastaniotis A.J.; Gurvitz, A. (2003). The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.** 27: 35–64.
- Hirooka, T.; Ishii, H. (2013). Chemical control of plant diseases. **J. Gen. Plant Pathol.** 79: 390-401.
- Hoffman, L.; Hardej, D. (2012). Ethylene bisdithiocarbamate pesticides cause cytotoxicity in transformed and normal human colon cells. **Environ. Toxicol. Phar.** 34: 556–573.
- Horsfall, J.G.; Rich, S. (1957). Structure-activity relationships in captan derivatives. **Phytopathology** 47: 17.
- IBAMA, (2013). Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>> Acesso em jul 2016.
- Inoue, Y.; Matsuda, T.; Sugiyama, K.; Izawa, S.; Kimura, A. (1999). Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** 274: 27002-27009.
- Iraqi, I.; Kienda, G.; Soeur, J.; Faye, G.; Baldacci, G.; Kolodner, R.D.; Huang, M.E. (2009). Peroxiredoxin Tsa1 is the key peroxidase suppressing genome instability and protecting against cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genet.** 5: e1000524.
- Jang, H.H.; Lee, K.O.; Chi, Y.H.; Jung, B.G.; Park, S.K.; Park, J.H.; Lee, J.R.; Lee, S.S.; Moon, J.C.; Yun, J.W.; Choi, Y.O.; Kim, W.Y.; Kang, J.S.; Cheong, G.W.; Yun, D.J.; Rhee, S.G.; Cho, M.J.; Lee, S.Y. (2004). Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. **Cell.** 117: 625–635.
- Jardim, A.N.O.; Caldas, E.D. (2010). Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food e Results from 2001 to 2010. **Food Control.** 25: 607-616.
- Kapoor, T.M.; Compton, D.A. (2002). Searching for the middle ground: Mechanisms of chromosome alignment during mitosis. **J. Cell Biol.** 157: 551–556.
- Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **Brit. J. Cancer.** 26: 239–257.
- Ketela, T.; Brown, J.L.; Stewart, R.C.; Bussey, H. (1998). Yeast Skn7p activity is modulated by the Sln1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation of the HOG pathway. **Mol. Gen. Genet.** 259: 372–378.
- Knight, S.C.; Anthony, V.M.; Brady, A.M.; Greenland, A.J.; Heaney, S.P.; Murray, D.C.; Powell, K.A.; Schulz, M.A.; Spinks, C.A.; Worthington, P.A.; Youle, Y. (1997). Rationale and perspectives on the development of fungicides. **Annu. Rev. Phytopathol.** 35: 349–72.
- Kourtis, N.; Tavernarakis, N. (2009). Autophagy and cell death in model organisms. **Cell Death Differ.** 16: 21–30.

- Kuge, S., Jones, N.; Nomoto, A. (1997). Regulation of YAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. **EMBO J.** 16: 1710–1720.
- Kuge, S.; Arita, M.; Murayama, A.; Maeta, K.; Izawa, S.; Inoue, Y.; Nomoto, A. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. **Mol. Cell. Biol.** 21:6139–6150.
- Kuge, S.; Jones, N. (1994). YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. **EMBO J.** 13: 655–664.
- Lee, J.; Spector, D.; Godon, C.; Labarre, J.; Toledano, M.B. (1999). A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. **J. Biol. Chem.** 274: 4537–4544.
- Liang, Q.; Zhou, B. (2007). Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. **Mol. Biol. Cell.** 18: 4741–4749.
- Longo, V.D.; Gralla, E.D.; Valentine, J.S. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** 271: 12275–12280.
- López-Fernández, O.; Yáñez, R.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. (2016) Kinetic modelling of mancozeb hydrolysis and photolysis to ethylenethiourea and other by-products in water. **Water Res.** 102: 561-571.
- Ludovico, P.; Rodrigues, F.; Almeida, A.; Silva, M.T.; Barrientos, A.; Corte-Real, M. (2002). Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biol. Cell.** 13: 2598–2606.
- Ludovico, P.; Sousa, M.J.; Silva, M.T.; Leao, C.; Corte-Real, M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. **Microbiology.** 147: 2409–2415.
- Luikenhuis, S.; Dawes, I.W.; Grant, C.M. (1997). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. **Mol. Biol. Cell** 9: 1081–1091.
- Lukens, R.J. (1966). The fungitoxicity of compounds containing a trichloromethylthio-group. **J. Agric. Food Chem.** 14(4): 365–367
- Madeo, F.; Carmona-Gutierrez, D.; Ring, J.; Büttner, S.; Eisenberg, T.; Kroemer. (2009). Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast. **Biochem Biophys Res Commun.** 132(2): 227-231.
- Madeo, F.; Fröhlich, E.; Fröhlich, K.U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. **J. Cell Biol.** 139: 729–734.
- Madeo, F.; Fröhlich, E.; Ligr, M.; Grey, M.; Sigrist, S.J.; Wolf, D.H.; Fröhlich, K.U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. **J. Cell Biol.** 145: 757–767.
- Madeo, F.; Herker, E.; Maldener, C.; Wissing, S.; Lächelt, S.; Herlan, M.; Fehr, M.; Lauber, K.;

- Sigrist, S.J.; Wesselborg, S.; Fröhlich, K. (2002). A Caspase-Related Protease Regulates Apoptosis in Yeast. **Mol. Cell.** 9: 911-917.
- MAPA, 2016. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: jul 2016.
- Martínez-Pastor, M.T.; Marchler, G.; Schüller, C.; Marchler-Bauer, A.; Ruis, H.; Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **EMBO J.** 15: 2227–2235.
- Mendoza-Còzatl, D.; Loza-Tavera, H.; Hernández-Navarro, A.; Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. **FEMS Microbiol. Rev.** 29: 653–671.
- Milenkovski, S.; Bååth, E.; Lindgren, P.; Berglund, O. (2010). Toxicity of fungicides to natural bacterial communities in wetland water and sediment measured using leucine incorporation and potential denitrification. **Ecotoxicology.** 19: 285–294.
- Mitsui, M.; Nakagawa, D.; Nakamura, M.; Okamoto, T.; Tsurugi, K. (2005). Valproic acid induces apoptosis dependent of Yca1p at concentrations that mildly affect the proliferation of yeast. **FEBS Lett.** 579: 723–727.
- Molin, M.; Yang, J.; Hanzén, S.; Toledano, M.B.; Labarre, J.; Nyström, T. (2011). Life span extension and H₂O₂ resistance elicited by caloric restriction require the peroxiredoxin Tsa1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell.** 43: 823- 833.
- Morano, K. A.; Grant, C. M.; Moyer-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics.** 190(4): 1157-1195.
- Mouchet, F.; Gauthier, L.; Mailhes, C.; Ferrier, V.; Devaux A. (2006). Comparative evaluation of genotoxicity of captan in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the comet assay and the micronucleus test. **Environ. Toxicol.** 21 (3): 264-277.
- Mulford, K.E.; Fassler, J.S. (2011). Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. **Eukaryot. Cell.** 10: 761-769.
- Muller, E.G.D. (1991). Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. **J. Biol. Chem.** 266: 9194–9202.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem. J.** 417: 1–13.
- Nargund, A.M.; Avery, S.V.; Houghton, J.E. (2008). Cadmium induces a heterogeneous and caspase-dependent apoptotic response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Apoptosis.** 13: 811–821.
- Noguerol-Pato, R.; Torrado-Agrasar, A.; González-Barreiro, C.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. (2014). Influence of new generation fungicides on *Saccharomyces cerevisiae* growth, grape must fermentation and aroma biosynthesis. **Food Chem.** 46: 234-241.

- Pagani, M.A.; Casamayor, A.; Serrano R.; Atrian, S.; Ariño, J. (2007) Disruption of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* by high zinc levels: a genome-wide study. **Mol. Microbiol.** 65:521–537.
- Paolini, M.; Mesircab, R.; Pozzettia, L.; Saponec, L.; Cantelli-Fortia, G. (1997). Biomarkers of effect in evaluating dithianon cocarcinogenesis: selective induction and suppression of murine CYP3A isoform. **Cancer Lett.** 113: 221-228.
- Park, S.G.; Cha, M.K.; Jeong, W.; Kim, I.H. (2000). Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** 275: 5723–5732.
- Paro, R.; Tiboni, G.M.; Buccione, R.; Rossi, G.; Cellini, V.; Canipari, R.; Cecconi, S. (2012). The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells. **Toxicol. Appl. Pharm.** 260: 155–161.
- Pedrajas, J.R.; Kosmidou, E.; Miranda-Vizuete, A.; Gustafsson, J.A.; Wright, A.P.; Spyrou, G. (1999). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** 274: 6366–6373.
- Pedrajas, J.R.; Padilla, C.A.; McDonagh, B.N.; Bárcena, J.A. (2010). Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antioxid. Redox Signal.** 13: 249–258.
- Perocco, P.; Colacci, A.; Grilli, S. (1993). In vitro cytotoxic and cell transforming activities exerted by the pesticides cyanazine, dithianon, diflubenzuron, procymidone, and vinclozolin on BALB/c 3T3 cells. **Environ. Mol. Mutagen.** 21: 81-86
- Pozzetti, L.; Paolini, M.; Barillari, J.; Cantelli-Forti, G. (1999). Induction and suppression of murine CYP-mediated biotransformation by dithianon: organ- and sex-related differences. **Cancer Lett.** 141: 47-56.
- Reiter, J.; Herker, E.; Madeo, F.; Schmitt, M.J. (2005). Viral killer toxins induce caspase mediated apoptosis in yeast. **J. Cell Biol.** 168: 353–358.
- Roberts, T.R.; Hutson, D.H. (1999). **Metabolic Pathways of Agrochemicals : Part 2: Insecticides and Fungicides**. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.1477 p.
- Rousk, J.; Demoling, L.A.; Bååth, E. (2009). Contrasting short-term antibiotic effects on respiration and bacterial growth compromises the validity of the selective respiratory inhibition technique to distinguish fungi and bacteria. **Microb. Ecol.** 58: 75-85.
- Santos, P.M.; Simões, T.; Sá-Correia, I. (2009). Insights into yeast adaptive response to the agricultural fungicide mancozeb: a toxicoproteomics approach. **Proteomics.** 9: 657–670.
- Schafer, F.Q.; Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.** 30: 1191–1212.
- Schmitt, A.P.; McEntee, K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional

- activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 93: 5777–5782.
- Severin, F.F.; Hyman, A.A. (2002). Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. **Curr. Biol.** 12: R233–R235.
- Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V.M.; Dowd, C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem. J.** 360: 1–16.
- Siegel, M.R. (1971). Reaction of the fungicide folpet (N-trichloromethylthiophthalimide) with a thiol protein. **Pestic. Biochem. Physiol.** 1:225–233.
- Sierotzki, H. (2015). **Respiration inhibitors: Complex III**. In: H. Ishii, D.W. Hollomon (Ed.) **Fungicide Resistance in Plant Pathogens**. Tokyo: Springer. pp. 119-143.
- Srivastava, A.K.; Ali, W.; Singh, R.; Bhui, K.; Tyagi, S.; Al-Khedhairi, A.A.; Srivastava, P.K.; Musarrat, J.; Shukla, Y. (2012). Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. **Life Sci.** 90: 815-824.
- Sturdik, E.; Drobnica L. (1980). Effect of 2,3-dinitrilo-1,4-dithia-9,10-antraquinone on Ehrlich ascites carcinoma and yeast cells. **Chem. Biol. Interactions**, 30: 105-114.
- Sturtz, L.A.; Diekert, K.; Jensen, L.T.; Lill, R.; Culotta, V.C. (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for *SOD1* in guarding against mitochondrial oxidative damage. **J. Biol. Chem.** 276: 38084–38089.
- Susin, S.A.; Lorenzo, H.K.; Zamzami, N.; Marzo, I.; Snow, B.E.; Brothers, G.M.; Mangion, J.; Jacotot, E.; Costantini, P.; Loeffler, M.; Larochette, N.; Goodlett, D.R.; Aebersold, R.; Siderovski, D.P.; Penninger, J.M.; Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**. 397: 441–446.
- Suzuki, K. (2013). Selective autophagy in budding yeast. **Cell Death Differ.** 20: 43–48.
- Suzuki, T.; Nojiri, H.; Isono, H.; Ochi, T. (2004). Oxidative damages in isolated rat hepatocytes treated with the organochlorine fungicides captan, dichlofluanid and chlorothalonil. **Toxicology**. 204: 97–107.
- Teixeira, M.C.; Dias, P.J.; Simões, T.; Sá-Correia, I. (2008). Yeast adaptation to mancozeb involves the up-regulation of *FLR1* under the coordinate control of Yap1, Rpn4, Pdr3, and Yrr1. **Biochem. Bioph. Res. Co.** 367: 249–255.
- Vachova, L.; Palkova, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. **J. Cell Biol.** 169: 711–717.
- van Loon, A.P.G.M.; Pesold-Hurt, B.; Schatz, G. (1986). A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**.

83: 3820–3824.

- Veal, E.A.; Ross, S.J.; Malakasi, P.; Peacock, E.; Morgan, B.A. (2003). Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. **J. Biol. Chem.** 278: 30896–30904.
- Vido, K.; Spector, D.; Lagniel, G.; Lopez, S.; Toledano, M.B.; Labarre, J. (2001). A Proteome Analysis of the Cadmium Response in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** 276 (11): 8469-8474.
- Vignols, F.; Brehelin, C.; Surdin-Kerjan, Y.; Thomas, D.; Meyer, Y. (2005). A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 102: 16729–16734.
- Walker, N.I.; Harmon, B.V.; Gobe, G.C.; Kerr, J.F. (1988). Patterns of cell death. **Methods Achiev. Exp. Pathol.** 13: 18–54.
- Walter, D.; Wissing, S.; Madeo, F.; Fahrenkrog, B. (2006). The inhibitor-of-apoptosis protein Bir1p protects against apoptosis in *S. cerevisiae* and is a substrate for the yeast homologue of Omi/HtrA2. **J. Cell Sci.** 119: 1843–1851.
- Weids, A.J.; Grant, C.M. (2014). The yeast peroxiredoxin Tsa1 protects against protein-aggregate induced oxidative stress. **J. Cell Sci.** 127: 1327–1335
- Wilkinson, G.D.; Ramsdale, M. (2011). Proteases and caspase-like activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, **Biochem. Soc. Trans.** 39: 1502–1508.
- Winzeler, E.A.; Shoemaker, D.D.; Astromoff, A.; Liang, H.; Anderson, K.; Andre, B.; Bangham, R.; Benito, R.; Boeke, J.D.; Bussey, H.; Chu, A.M.; Connelly, C.; Davis, K.; Dietrich, F.; Dow, S.W.; El Bakkoury, M.; Foury, F.; Friend, S.H.; Gentalen, E.; Giaever, G.; Hegemann, J.H.; Jones, T.; Laub, M.; Liao, H.; Liebundguth, N.; Lockhart, D.J.; Lucau-Danila, A.; Lussier, M.; M'Rabet, N.; Menard, P.; Mittmann, M.; Pai, C.; Rebischung, C.; Revuelta, J.L.; Riles, L.; Roberts, C.J.; Ross-MacDonald, P.; Scherens, B.; Snyder, M.; Sookhai-Mahadeo, S.; Storms, R.K.; Véronneau, S.; Voet, M.; Volckaert, G.; Ward, T.R.; Wysocki, R.; Yen, G.S.; Yu, K.; Zimmermann, K.; Philippsen, P.; Johnston, M.; Davis, R.W. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. **Science.** 285(5429): 901-906.
- Wissing, S.; Ludovico, P.; Herker, E.; Büttner, S.; Engelhardt, S.M.; Decker, T.; Link, A.; Proksch, A.; Rodrigues, F.; Corte-Real, M.; Frohlich, K.U.; Manns, J.; Cande, C.; Sigrist, S.J.; Kroemer, G.; Madeo, F. (2004). An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. **J. Cell Biol.** 166: 969–974.
- Wood, M. J.; Andrade, E. C.; Storz, G. (2003a). The redox domain of the Yap1p transcription factor contains two disulfide bonds. **Biochemistry.** 42: 11982–11991.

- Wood, Z.A.; Schroder, E.; Harris, J.R.; Poole, L.B. (2003b). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem. Sci.** 28: 32–40.
- Yan, C.; Lee, L. H.; Davis, L. I. (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. **EMBO J.** 17: 7416–7429.
- Yang, Y.; Hamel, C.; Vujanovic, V.; Gan, Y. (2011). Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. **ISRN Ecol.** 2011: ID 130289.
- Ziogas, B.N; Malandrakis, A.A. (2015) **Sterol Biosynthesis Inhibitors: C14 Demethylation (DMIs)**. In: H. Ishii, D.W. Hollomon (Ed.) **Fungicide Resistance in Plant Pathogens**. Tokyo: Springer. pp.199-217.
- Zong, W.X.; Thompson, C.B. (2006). Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev.** 20(1): 1-15.

ANEXOS

ANEXO 1

Resumo apresentado no **XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia.**

Bento Gonçalves-RS, 2015 .

Efeito do fungicida dithianon (quinona) sobre *Saccharomyces cerevisiae* em condição aeróbica e fermentativa.

*(The effect of the fungicide dithianon (quinone) on *Saccharomyces cerevisiae* under aerobic and fermentative conditions)*

Jahn, L.M.; Ulbrich, W.G.; Scariot, F.J.; Delamare, A.P.L.; Echeverrigaray, S.

Laboratório de Microbiologia Aplicada, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. CEP 95070-560. Caxias do Sul, Brasil. E-mail: aplongar@yahoo.com

Diversos fungicidas são utilizados para o controle de doenças ao longo do ciclo das videiras. Os fungicidas do grupo da quinonas são recomendados para o controle do míldio, mas eventualmente aplicados em fases adiantadas da cultura. Estes fungicidas são considerados multisítio, sem alvo claro e específico de ação. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação do fungicida dithianon sobre *S. cerevisiae* em condições de crescimento aeróbico e a interação do fungicida com etanol em sistemas fermentativos. Neste sentido, células de *S. cerevisiae* Y904 e BY4741 (e seus mutantes deletado *YCA1*, *NUC1* e *AIF1*) foram crescidas em YEPD (fase exponencial) e o efeito de distintas dosagens de dithianon (0 a 4µM) avaliado em sistema aeróbico em meio mínimo suplementado por 3h a 28°C. A viabilidade foi determinada por UFC/ml e a integridade de membrana por citometria de fluxo utilizando o marcador PI. Interação fungicida/etanol foi avaliada por efeito de distintas dosagens do fungicida em 0 a 12% (v/v) de etanol sobre a viabilidade das leveduras. Ensaios fermentativos

em vinho sintético contendo de 0 a 70 μ M de dithianon foram realizados. Os resultados mostraram que o dithianon exerce forte efeito letal sobre *Saccharomyces* em fase exponencial, levando a >83% de mortalidade com apenas 2 μ M de dithianon (3h). O fungicida leva a imediata perda da integridade de membrana celular, mostrando efeito necrótico. Avaliação de mutantes em genes relacionados com a cascata apoptótica, mostram que o dithianon não exerce efeito pró-apoptótico. Leveduras em fase estacionária e fermentativa apresentam maior tolerância ao fungicida, mas efeito sinérgico fungicida/etanol foi evidenciado com >95% de mortalidade na presença de 5 μ M dithianon e 8%(v/v) de etanol. Ensaio fermentativos mostraram redução da taxa de fermentação e parada fermentativa com 8% (v/v) de etanol, na presença de 9 μ M de dithianon.

Tema: Microbiologia enológica

Área: Enologia

Apoio: UCS, CNPq, CAPES, SCT-RS, FAPERGS