



Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Efeitos Tóxicos e Genotóxicos do Cloreto de Estanho (SnCl_2)
em Bactéria e Levedura**

Cassiana Macagnan Viau

**Orientadores: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques
Prof. Dr. Martin Brendel**

Porto Alegre

2005

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Efeitos Tóxicos e Genotóxicos do Cloreto de Estanho (SnCl_2)
em Bactéria e Levedura**

Cassiana Macagnan Viau

**Orientadores: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques
Prof. Dr. Martin Brendel**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e
Molecular da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul
para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Porto Alegre

2005

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Radiologia Molecular do Centro de Biotecnologia desta Universidade. O projeto foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pela Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo GENOTOX - Laboratório de Genotoxicidade.



Há duas formas para viver sua vida.
Uma é acreditar que não existe milagre
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.
Albert Einstein (1879-1955)

Dedico este trabalho a minha mãe
Joselina e a minha irmã **Rosaura**,
com muito amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela Vida!

Ao Professor Henriques e ao Professor Martin Brendel por terem aceitado me orientar e por me acolherem tão bem no grupo de Reparação do DNA.

À Dra. Cristina Pungartnik por ter me ajudado no laboratório e por ter, carinhosamente, relevado algumas falhas e imperfeições minhas.

À colega de laboratório e amiga Jacqueline Moraes Cardone pela amizade e ajuda na realização do PROIN (Programa de Integração entre Graduação e Pós-Graduação).

Aos colegas de laboratório: Dinara, Renato, Nusha, Matheus, Diego, Bacana, Sissa, Heique, Cassius, Miriana, Daniel, Sílvia, Isabel, Cláudio, Albanin, Horst, Camila, Renata e Débora pelo convívio e pela companhia nos Congressos.

Ao Professor Dr. André Arigony Souto pela orientação na Iniciação Científica na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e pelo incentivo nas horas mais críticas.

Às minhas amigas Débora Poetevin dos Santos e Marina Scopel pelas noites nas baladas...

Ao meu amigo “maluquinho” Alessandro Jeguer pelas conversas não tão científicas...

Ao meu pai Luiz Volnei Mattos Viau, que mesmo longe, estava tão perto torcendo por mim.

Ao meu cunhado Everton pela ajuda no computador e pelo convívio durante sete anos de namoro com a minha irmã, tornando-se o meu irmão mais velho!

E, finalmente, às duas pessoas que mais aturam as minhas neuroses: Joselina e Rosaura. Eu não teria conseguido se não fosse o incentivo e o amor de ambas. Serei eternamente grata! Muito obrigada por sempre estarem ao meu lado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
JUSTIFICATIVA	vii
INTRODUÇÃO	1
1.1 Homeostase de metais	3
1.2 Estanho e seus compostos	4
1.2.1 Exposição ao estanho e legislação vigente	7
1.2.2 Toxicocinética e toxicidade do estanho	8
1.2.3 Efeitos genotóxicos do estanho	10
1.3 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo eucariótico	12
1.3.1 Ciclo de vida e características genéticas	12
1.3.2 Metabolismo celular	15
1.4 Avaliação genotóxica	17
1.4.1 Testes de mutação reversa e recombinação mitótica na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.4.2 Testes de mutações em procaríotos	20
1.4.3 Efeitos citotóxicos em células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> deficientes em sistemas de reparação de DNA	21
OBJETIVOS	26
1.1 Objetivo geral	26
1.2 Objetivos específicos	26
CAPÍTULO I	27
"Genotoxicity of stannous chloride in yeast and bacteria"	

DISCUSSÃO	40
CONCLUSÕES	48
1.1 Conclusão geral	48
1.2 Conclusões específicas	48
PERSPECTIVAS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
CURRICULUM VITAE	71

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenosina
Abia	Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação
Acetil CoA	Acetil coenzima A
ATP	Adenosina tri-fosfato
BER	Reparação por excisão de bases
C	Citosina
Co ²⁺	Íon metálico divalente cobalto
CO ₂	Monóxido de carbono
Cu ²⁺	Íon metálico divalente cobre
DNA	Ácido desoxiribonucléico
FDA	Food and Drug Administration
Fe ²⁺	Íon metálico divalente ferro
G	Guanina
H ₂ O	Água
Mn ²⁺	Íon metálico divalente manganês
mg	Unidade de medida miligrama (10 ⁻³ gramas)
MMS	Metilmetanosulfonato
NER	Reparação por excisão de nucleotídeo
Ni ²⁺	Íon metálico divalente níquel
ORF	Quadro aberto de leitura
pAC189	Plasmídeo
pH	logaritmo decimal do inverso da atividade dos íons hidrogênio numa solução
PVC	Cloreto de polivinila
Kg	Unidade de medida kilograma (10 ³ gramas)
R	Radical ou grupamento químico
Sn	Elemento químico estanho

SnCl ₂	Cloreto estânico ou Cloreto de estanho II
SnCl ₄	Cloreto estânico ou Cloreto de estanho IV
SnF ₂	Fluoreto estânico ou Fluoreto de estanho II
SnO ₂	Óxido de estanho
^{99m} Tc	Elemento químico tecnécio 99
TCA	Ciclo do ácido tricarbóxico
T	Timina
UVC	Radiação ultravioleta de 254 nm
WP2	Linhagem selvagem de <i>Escherichia coli</i>
X	Halógeno
Zn ²⁺	Íon metálico divalente zinco
µg	Unidade de medida micrograma (10 ⁻⁶ gramas)

RESUMO

A genotoxicidade do SnCl_2 foi avaliada nos ensaios *Salmonella*/Microsossoma, WP2 Mutoxiteste e com a utilização de linhagens haplóides e diplóides de *S. cerevisiae*. O presente estudo pôde demonstrar, claramente, que o SnCl_2 apresenta um potencial tóxico e uma significativa atividade mutagênica em diferentes ensaios de reversão. O mutante *rad52Δ*, deficiente no mecanismo de reparação recombinacional, incapaz de reparar quebras simples e duplas no DNA, foi o mais sensível.

As células tratadas com Sn^{2+} formaram agregados que levaram a uma superestimativa da toxicidade, quando não corretamente desfeitos. Ensaio de inativação corretos, nas doses de 25 mM e 75 mM de SnCl_2 , foram obtidos através da desagregação das células com EDTA ou tampão fosfato. O Sn^{2+} induziu reversão na levedura, nos locos *his1-798* (células diplóides), *his1-208* e *lys-1-1* (células haplóides), bem como mutação no quadro de leitura em células haplóides no locus *hom3-10*. Em células diplóides, o SnCl_2 induziu recombinação mitótica intragênica, enquanto que a recombinação intergênica não foi significativamente pronunciada.

A mutagenicidade do Sn^{2+} foi demonstrada pelos ensaios de reversão de auxotrofias, mas não pôde ser evidenciada nos ensaios de mutação para a frente. A morte seletiva dos mutantes espontâneos para a canavanina, quando as células são tratadas com SnCl_2 , sugeriu uma indução de disfunções da membrana das células.

As células da levedura em fase de crescimento exponencial apresentaram, com apenas 0,1% da concentração de SnCl_2 , o mesmo perfil de sobrevivência quando comparado com as células em fase de crescimento respiratório, sugerindo um maior envolvimento de parâmetros fisiológicos na

resistência ao estresse oxidativo gerado pelo SnCl₂ após as células atingirem a fase pós diáuxica. As superóxido dismutases, mas não a catalase, protegeram contra as espécies reativas de oxigênio que o estanho produziu. O mutante *sod1Δ* apresentou uma sensibilidade três vezes maior do que a linhagem selvagem, enquanto que o mutante *sod2Δ* demonstrou uma sensibilidade pequena ao SnCl₂. O duplo mutante *sod1Δsod2Δ* mostrou um aumento acentuado na sensibilidade quando comparado com a linhagem selvagem.

No teste de *Salmonella*/Microsoma, o SnCl₂ não induziu mutação no quadro de leitura (TA97 e TA98) e nem substituição de pares de bases (TA100), ao passo que uma resposta positiva foi observada com a linhagem TA102 que detecta mutagênicos oxidativos. O SnCl₂ também induziu mutação na linhagem IC203 (*uvrA oxyR*), e não na linhagem IC188 (*uvrA*). Esses resultados indicaram que o SnCl₂ é um agente mutagênico moderado. Provavelmente, o dano ao DNA é causado por espécies reativas de oxigênio e é reparado por um processo recombinacional e por um processo sujeito a erros.

ABSTRACT

The genotoxicity of SnCl₂ was tested in the *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, the WP2 Mutoxitest and in the haploid and diploid strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The present work could clearly demonstrate that SnCl₂ has not only a toxic potential but also revealed a significant mutagenic activity in different reversion assays. The recombination deficient *rad52*Δ mutant, unable to repair DNA single and double strand breaks was the most sensitive.

Sn²⁺ -treated cells form aggregates that lead to gross overestimation of toxicity when not undone before plating. Reliable inactivation assays at exposure doses of 25 to 75 mM SnCl₂ were achieved by de-clumping with either EDTA or phosphate buffer. Sn²⁺ induced reversion of the yeast *his1-798*, *his1-208* and *lys1-1* mutant alleles, in diploid and haploid cells respectively, and putative frameshift mutagenesis (reversion of the *hom3-10* allele) was also observed. In diploid yeast SnCl₂ induced intragenic mitotic recombination while intergenic (reciprocal) recombination was not significantly increased.

Mutagenicity of Sn²⁺ could readily be shown by reversion of auxotrophs but not in the canavanine forward mutation assay (*CAN1*→*can1*^r) that yielded negative mutagenicity. This selective killing of Sn²⁺ -treated spontaneous canavanine mutants suggested the induction of membrane dysfunction.

Yeast cells of exponentially growing cultures were killed to about the same extent at 0.1% of SnCl₂ than respective cells in stationary phase, suggesting a major involvement of physiological parameters of post-diauxic shift oxidative stress resistance in enhanced Sn²⁺ tolerance. Superoxide dismutases, but not catalase, protected against Sn²⁺ -induced reactive oxygen species as *sod1*Δ had a three-fold higher sensitivity than the WT while the *sod2*Δ mutant was only slightly

more sensitive but conferred significant sensitivity increase in a *sod1Δsod2Δ* double mutant.

In the *Salmonella*/Microsome assay SnCl₂ did not induce frameshift or base pair substitution mutations in strains TA97, TA98 or TA100, while a positive response was seen in strain TA102. SnCl₂ also induced a two-fold increase in mutation using the Mutoxitest strain IC203 (*uvrA oxyR*), but not in strain IC188 (*uvrA*). These results indicate that SnCl₂ is a moderate mutagen. Probably the DNA damage is produced by reactive oxygen species and is repaired via recombinational and error-prone processes.

JUSTIFICATIVA

O presente trabalho foi realizado pela aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Cassiana Macagnan Viau, com a realização dos seguintes experimentos:

- ✓ Análise do potencial genotóxico do SnCl_2 , utilizando o teste *Salmonella*/Microsoma e o Mutoxiteste;
- ✓ Análise do potencial mutagênico e recombinogênico do SnCl_2 em células haplóides e diplóides de levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ Análise da citotoxicidade do SnCl_2 em mutantes defectivos nas três principais vias de reparação de danos ao DNA em *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ Análise da citotoxicidade do SnCl_2 em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* defectivos nas enzimas superóxido dismutase mitocondrial e citosólica e catalase T citosólica;
- ✓ Análise da sensibilidade das células haplóides de *Saccharomyces cerevisiae* ao SnCl_2 quando essas estão em metabolismo fermentativo e respiratório.

As análises foram realizadas em conjunto com a Dra. Cristina Pungartnik.

INTRODUÇÃO

Íons metálicos são requeridos em vários processos bioquímicos, sendo, portanto, elementos essenciais para o metabolismo celular (Eide e Guerinot 1997). Alguns metais, como cálcio, cobalto, cromo, cobre, ferro, potássio, magnésio, sódio, níquel e zinco, são essenciais e servem como micronutrientes, são utilizados em processos redox, estabilizam moléculas através de interações eletrostáticas, são componentes de várias enzimas e regulam a pressão osmótica (Bruins *et al.* 2000). A transferência de elétrons do ferro e cobre são fundamentais para os processos de respiração e fotossíntese (Rutherford e Bird 2004). O elemento zinco forma centros catalíticos em numerosas enzimas (motivo dedo de zinco) responsáveis pela ligação ao DNA (Eide 2003).

A deficiência de micronutrientes, como íons metálicos, está relacionada a doenças humanas importantes como a Hemocromatosis, Acrodermatites Enteropáticas, Doença de Menkes e Doença de Wilson (MacDiarmid e Gardner 1998; Peña *et al.* 1999; Wang *et al.* 2004).

Na agricultura, os metais desempenham um papel crucial na qualidade do solo. As características físicas e químicas do solo estão entre os principais fatores que condicionam o desenvolvimento do plantio (Arias *et al.* 2005). Os solos ácidos e com baixa disponibilidade de nutrientes caracterizam-se pela presença de alguns metais em concentrações tóxicas, constituindo um fator limitante do crescimento vegetal (Dach e Starmans 2005; Barajas-Aceves 2005). O baixo pH (Sansonowicz e Smith 1995), a deficiência de cálcio (Ritchey *et al.* 1982; Smyth e Cravo 1992; Vale *et al.* 1996), de magnésio (Tan *et al.* 1992; Tan e Keltjens 1995), ou de fósforo (Mclaughlin e James 1991) podem igualmente ser responsáveis pelo menor desenvolvimento das plantas em solos ácidos.

Os metais também são essenciais para o crescimento de microrganismos, estando envolvidos em determinantes de patogenicidade e na capacidade de microrganismos de vida livre competirem com outros organismos por fontes de ambientes limitados (Wackett *et al.* 2004). Por exemplo, os protozoários parasitas *Tritrichomonas foetus* e *Trichomonas vaginalis* exercem seus efeitos patogênicos através da atividade de uma enzima Ecto-ATPase dependente de magnésio (Queiroz *et al.* 1991; Jesus *et al.* 2002).

Por outro lado, muitos metais que não apresentam funções biológicas conhecidas e não são essenciais, podem apresentar um alto potencial tóxico para os microrganismos (Bruins *et al.* 2000). A toxicidade desses metais ocorre através do deslocamento de metais essenciais de seus sítios de ligação, ou de interações inapropriadas com formação de complexos que modificam a atividade biológica de alvos citológicos (Nies 1999; Bruins *et al.* 2000; Kern *et al.* 2004; Kern *et al.* 2005).

Além disso, alguns íons metálicos podem afetar o funcionamento celular, atuando nos ciclos redox e produzindo espécies ativas de compostos químicos normalmente presentes nas células vivas (Kasprzak 2002). Portanto, em adição aos elevados níveis tanto de metais essenciais quanto de metais não essenciais, pode haver danos à membrana das células, alteração na especificidade de enzimas, parada de funções celulares e danos à estrutura do DNA (Bruins *et al.* 2000).

Dessa forma, a evolução favoreceu a sobrevivência de organismos que desenvolveram mecanismos capazes de garantir a concentração de metais intracelular ótima através de um balanço entre a entrada de metais do ambiente e excreção/neutralização dos mesmos na célula (Tomsett e Thurmann 1988). Esse refinado balanço é chamado de homeostase de metais (Eide 2001).

1.1. Homeostase de metais

Para apresentar um efeito fisiológico ou tóxico, a maioria dos íons metálicos necessita entrar na célula. Muitos cátions metálicos divalentes (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+}) são estruturalmente muito similares. Para que um sistema de captação de metais consiga diferenciar íons metálicos estruturalmente parecidos, há a necessidade de um refinado sistema de regulação (Nies 1999).

Usualmente, os microrganismos utilizam dois sistemas de captação de íons metálicos. Um deles é rápido, inespecífico e comandado por um gradiente quimiosmótico presente na membrana citoplasmática de células procarióticas. Como esse sistema de captação é usado por uma variedade de substratos, ele é constitutivamente expresso (Nies 1999). O outro tipo de sistema de captação apresenta uma alta especificidade ao substrato, é lento e freqüentemente utiliza hidrólise de ATP como fonte de energia. É somente produzido pela célula quando há a necessidade, carência nutricional ou em uma situação metabólica especial (Nies e Silver 1995).

Ainda que os microrganismos possuam sistemas de captação de metais específicos, altas concentrações de metais não essenciais podem ser transportadas para as células através de sistemas inespecíficos expressos constitutivamente. Esse “portão aberto” é uma das razões pelas quais os íons metálicos são tóxicos aos microrganismos (Nies 1999). Como conseqüência, os microrganismos têm sido forçados a desenvolver fatores homeostáticos de íon metálico, bem como a adquirir resistência metálica (Silver 1996; Bruins *et al.* 2000; Gadd 2001).

Os íons metálicos não podem ser degradados nem modificados como os compostos orgânicos tóxicos. Portanto, há seis sistemas de resistência a metais: exclusão do metal através de uma barreira de permeabilidade, seqüestramento do metal intra e extracelular, bombas de efluxo ativas, redução enzimática e redução da sensibilidade dos alvos celulares em relação aos íons

metálicos. Um ou mais de um desses mecanismos de resistência a metais permitem a sobrevivência de microrganismos em ambientes contaminados com metais (Ji e Silver 1995; Nies e Silver 1995; Nies 1999; Rensing *et al.* 1999).

Nas células eucarióticas, os íons tóxicos são removidos do citoplasma pela quelação com oligopeptídeos de baixo peso molecular, como glutatona e fitoquelatinas (esta última presente em plantas e em *Schizosaccharomyces pombe*, porém ausente em *S. cerevisiae*), ou por meio de metalotioneínas. Posteriormente, esses complexos são deslocados para o vacúolo através de proteínas transmembrana de transporte (Vido *et al.* 2001).

Geralmente, o transporte transmembrana ocorre com gasto de energia e na presença de cofatores pelo processo simporte ou antiporte, de forma que um íon possa modular a captação ou a expulsão de outro íon metálico (MacDiarmid e Gardner 1998).

1.2 Estanho e seus compostos

O estanho (Sn) é um metal do grupo 14 (grupo IV A) da tabela periódica, com peso atômico de 118,71. O seu ponto de fusão é de 231,9°C, e o seu ponto de ebulição é de 2507°C. Abaixo do seu ponto de fusão, o estanho pode existir em três formas alotrópicas: (1) estanho cinza (estável abaixo de 13°C); (2) estanho branco (forma metálica maleável e dúctil); e (3) estanho quebradiço ou frágil que é a forma γ -Sn. Os óxidos de estanho são anfóteros, comumente formando sais estanoso (estado de oxidação 2+) e estânico (estado de oxidação 4+). O estado de oxidação 3+ é extremamente instável (Weber 1987; Budavari 2001).

A crosta terrestre contém aproximadamente 2-3 ppm de estanho, representando um percentual de 0,0006% (Budavari 2001). A mais importante

forma encontrada de estanho na Terra é a forma mineral cassiterita (SnO_2). O estanho, por ser um metal extremamente resistente à maresia, é utilizado para revestir outros metais, protegendo-os da ação da corrosão. Ele é empregado na composição de várias ligas com chumbo, cobre, bronze e peltre (liga de estanho utilizada para confeccionar utensílios desse material, como jarros, canecas e potes) (Rüdel 2003).

Por ser altamente empregado na constituição de ligas metálicas, o estanho está presente nas obturações dentárias e, juntamente com mercúrio, prata, zinco e cobre, forma a amálgama dentária (Von Mayenburg *et al.* 1991). O estanho também está presente, em quantidades pequenas, em imitações de jóias (Vilaplana *et al.* 1991; Olivarius *et al.* 1993).

Na indústria alimentícia, o estanho metálico é utilizado principalmente para revestir latas que acondicionam alimentos e líquidos. As folhas de flandres (folha de ferro estanhado) são utilizadas na fabricação de latas, sendo colocadas internamente para a conservação dos alimentos (De Groot *et al.* 1973; Ikem e Egiebor 2005). Essas folhas protegem os alimentos de processos oxidativos, já que é o estanho que sofre oxidação e permite que a cor e o sabor dos alimentos permaneçam inalterados (Blunden e Wallace 2003). O processo descrito acima garante a qualidade que o consumidor almeja e a durabilidade do produto que os fabricantes esperam.

Em muitos casos, pode haver a transferência de ferro e estanho das folhas de flandres para os alimentos. O grau de transferência dos metais é dependente de vários fatores: tipo de produto, tempo e temperatura de armazenagem e de o revestimento interno ser plano ou esmaltado (Calloway e McMullen 1966). Muitos estudos têm mostrado que, quando os enlatados são abertos, e os alimentos permanecem dentro das latas com posterior refrigeração, há um aumento da oxidação do estanho e conseqüente transferência para os produtos (Capar e Boyer 1980; Greger e Johnson 1981). O processo de corrosão

é aumentado pelo ar, o qual promove o ataque do estanho por ácidos (Tarley *et al.* 2001). Portanto, agentes oxidantes, tais como ar, sais férricos, nitratos, sais cúpricos, certos pigmentos e frutas ácidas, promovem a corrosão (Schroeder *et al.* 1964).

Os compostos inorgânicos de estanho são empregados na indústria de vidros para fortalecê-los, evitando fissuras. Os compostos inorgânicos servem como bases para as formulações de pigmentos, catalisadores e, na indústria de cosméticos, na fabricação de perfumes e sabões (Pétursson 2001). O óxido de estanho IV (SnO_2) é utilizado nas indústrias de cerâmica e de vidros, bem como é um agente de polimento, catalisador e empregado na produção de vidros coloridos e esbranquiçados (Fent 1996).

O fluoreto estanoso (SnF_2) está presente nos produtos odontológicos (pastas de dentes) como um agente cariostático e também como um agente que reduz a dissolução ácida do esmalte dos dentes (Mayhew e Brown 1981; Rölla *et al.* 1983).

Em exames de cintilografia, são empregados radiofármacos marcados com tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), que constituem cerca de 80% dos que são empregados em medicina nuclear. A fixação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ nas macromoléculas de interesse biológico depende da presença de agentes redutores, sendo o cloreto estanoso o mais freqüentemente usado (Bernardo-Filho *et al.* 1994). Tanto o fluoreto estanoso quanto o cloreto estanoso são os sais estanhados mais empregados nas pesquisas referentes ao estanho (Dreff-Van Der Meulen *et al.* 1974; Shelby e Stasiewicz 1984; Shelby *et al.* 1993; Hattori *et al.* 2001).

O cloreto estânico (SnCl_4) é comumente utilizado como material de partida para a produção de compostos orgânicos de estanho (organoestanhados). Exemplos de compostos orgânicos de estanho de importância comercial são: tetraorganoestanhados (R_4Sn), triorganoestanhados (R_3SnX), diorganoestanhados

(R_2SnX_2) e monoorganoestanhados ($RSnX_3$). O grupamento R pode ser, dentre outros: metil, butil, octil e fenil. O radical X, por sua vez, pode ser: halogênio, óxido, hidróxido, carboxilatos, entre outros. Os compostos tri e diorganoestanhados são os principais compostos orgânicos de estanho empregados comercialmente. Os compostos triorganoestanhados são encontrados em várias preparações biocidas, como fungicidas, inseticidas, herbicidas e molusquicidas, bem como em preservativos da madeira e nas formulações destinadas ao tratamento de cascos de navios e barcos, protegendo a parte dos mesmos que fica submersa (Corbin 1973; Hallas e Cooney 1981; Laborde *et al.* 1986; Tobin e Cooney 1999; Györi *et al.* 2000).

Os compostos diorganoestanhados são utilizados como estabilizadores do cloreto de polivinila (PVC), possibilitando que o mesmo possa ser aquecido e moldado para diferentes fins. Os estabilizadores protegem o PVC do calor e da luz. Esses compostos também estão presentes em reações de esterificação como catalisadores químicos e podem ser espumantes em poliuretano. Os compostos monoorganoestanhados são igualmente empregados como estabilizadores no processo de aquecimento do PVC, bem como na indústria de vidros (Quevauviller *et al.* 1991; Fent 1996). Os compostos orgânicos de estanho também são aplicados como constituintes de desinfetantes, fertilizantes para a agricultura e removedores de limo, tendo aplicação em fábricas de cerveja e nas indústrias têxtil, de papel e de processamento do couro (Schroeder *et al.* 1964).

1.2.1 Exposição ao estanho e legislação vigente

O estanho está presente no ar, água, solos, bem como em plantas e animais que vivem na terra ou nas águas. Por ser um elemento químico de ocorrência natural na atmosfera, o estanho pode estar presente nos tecidos humanos (Schroeder *et al.* 1964; Greger e Baier 1981). No entanto, não há

evidências científicas de que o estanho seja um elemento essencial para o ser humano e que haja uma dose diária recomendada (Johnson e Greger 1982).

A quantidade de estanho a que o homem está exposto depende de vários fatores (para revisão, ver Calloway e McMullen 1966). As principais vias de exposição são: inalatória, parenteral e oral. A via oral é a principal via de exposição ao estanho e seus compostos, através do consumo de alimentos enlatados e da ingestão de líquidos enlatados (Boogaard *et al.* 2003; Ikem e Egiebor 2005). Nos alimentos em geral, os níveis de estanho encontrados são inferiores a 4 µg de Sn/g de alimento seco. Em embalagens metálicas, a quantidade de estanho é de 20 a 25 µg de Sn/g de alimento seco (Gillespie *et al.* 1973). Quantidades maiores podem ser encontradas no caso de dietas que incluem uma alta proporção de vegetais e peixes enlatados, nas quais o consumo de estanho pode chegar a cerca de 30 mg de Sn/dia (Rader 1991).

O limite máximo de ingestão para compostos de estanho admitido pela FDA (Food and Drug Administration) nos EUA é de 300 mg de Sn/kg de alimento seco (Chmielnicka *et al.* 1981; Burba 1983). No Reino Unido, esse limite é de 200 mg de Sn/Kg de alimento seco e 150 mg de Sn/Kg de líquido seco (Blunden e Wallace 2003). A Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (Abia) preconiza um limite de 250 µg de Sn/g de alimento seco (Abia 1998).

1.2.2 Toxicocinética e toxicidade do estanho

Uma característica de importância biológica desse metal consiste na sua capacidade de formar compostos catiônicos organometálicos de alta solubilidade lipídica, capacitando-os a atravessar membranas biológicas e a exercer seus efeitos tóxicos no interior das células (Nieboer e Richardson 1980; McLean *et al.* 1983a,b; Hamasaki *et al.* 1993).

A absorção, distribuição e retenção de estanho em humanos (Schroeder *et al.* 1964; Solomons *et al.* 1983), bem como em animais experimentais de laboratório (Benoy *et al.* 1971; Fritsh *et al.* 1977), são dependentes da natureza da exposição (Chmielnicka *et al.* 1981). Quando administrado oralmente, o estanho é fracamente absorvido no trato gastrointestinal, e mais de 90% do ingerido é eliminado nas fezes e urina (Hiles 1974; Savolainen e Valkonen 1986).

O estado de valência do estanho pode influenciar a absorção. O estanho divalente apresenta uma maior absorção quando comparado com o estanho tetravalente, o que se deve ao fato de o estanho 4 (Sn^{4+}) possuir maior facilidade para formar compostos insolúveis em soluções aquosas do que a outra espécie iônica (Sn^{2+}) (McLean *et al.* 1983a).

O estanho apresenta uma ampla distribuição nos tecidos humanos. Após realizarem a autópsia de vários órgãos humanos, Hamilton e colaboradores (1972) detectaram a presença desse metal nos seguintes órgãos: cérebro, rins, pulmões, fígado, linfonodos, músculo, testículos, ovário e nos ossos. Os pesquisadores Fischer e Zimmerman (1969) e Kutzner e Brod (1971) igualmente notaram que a distribuição de estanho é bem variada e atinge vários tecidos em animais experimentais de laboratório. No entanto, estudos mais recentes demonstram que os órgãos preferenciais são os rins, o fígado (Chiba *et al.* 1984; Bluden e Wallace 2003) e os ossos (Yamaguchi *et al.* 1980; Yamaguchi *et al.* 1981; Hattori *et al.* 2001).

O estanho é excretado principalmente nas fezes (Tripton *et al.* 1969) e na urina (Kehoe *et al.* 1940; Calloway e McMullen 1966; Johnson e Greger 1982). Há uma pequena fração que pode ser excretada através do leite materno e na bile (Hamilton *et al.* 1972).

A toxicologia dos compostos de estanho tem sido revisada por muitos pesquisadores. Sabe-se que a ingestão de excessiva quantidade de

estanho deve-se ao fato do consumo cada vez maior de produtos enlatados. O estanho pode causar irritações gastrointestinais, diarreias, vômitos, náuseas, problemas renais e hepáticos, irritações na pele e olhos (para revisão, ver Barnes e Stoner 1959; Luff e Metcalfe 1990; Blunden e Wallace 2003; Ikem e Egiebor 2005).

Estudos têm demonstrado que o estanho pode afetar o metabolismo e os níveis de metais essenciais para a célula. Johnson e colaboradores (1982) realizaram um estudo clínico com adultos e concluíram que o estanho afeta o metabolismo do zinco. O metabolismo do cobre, ferro, cálcio e a atividade de enzimas também podem sofrer interferência com a presença do estanho (Yamaguchi *et al.* 1982; Solomons *et al.* 1983; Laborde *et al.* 1986; Chmielnicka *et al.* 1992; Chiba e Shinohara 1992).

1.2.3 Efeitos genotóxicos do estanho

Com relação à genotoxicidade, à mutagenicidade e à carcinogenicidade dos sais de estanho, os resultados descritos na literatura, obtidos a partir de metodologias diferentes, são conflitantes. Nishioka, em 1975, utilizando *Bacillus subtilis* (*Rec assay test*), não constatou efeito mutagênico na concentração de 0,05 M de cloreto estanoso. Mais tarde, Kada *et al.* (1980), realizando um estudo semelhante com o mesmo modelo de microrganismo, verificaram efeito mutagênico negativo do mesmo sal de estanho nas doses de 10 mM e 10 M.

Em adição, Singh (1983) mostrou que o cloreto estanoso, na concentração de 100 mM, não foi capaz de induzir mutação reversa em células de levedura *S. cerevisiae*. Posteriormente, Tripathy *et al.* (1990) não observaram efeitos genotóxicos do SnCl₂ nas concentrações de 50 e 100 mM em células primordiais de *Drosophila melanogaster* (*Wing spot test*). Os resultados do estudo

realizado por Ashby e Tennant (1991), quanto à relação entre estrutura química e as atividades de mutagenicidade e carcinogenicidade de 301 químicos para o Programa de Toxicologia Nacional dos Estados Unidos (US-NTP, US-National Toxicology Program), permitiram classificar o cloreto estanoso em não mutagênico para o teste de *Salmonella*/Microsoma e carcinogênico para o teste com a glândula tireóide de ratos.

Por outro lado, McLean *et al.* (1983a,b) descreveram que o SnCl_2 produz quebras de cadeia simples no DNA tanto em células ovarianas de hamster chinês quanto em células sangüíneas humanas. O mesmo grupo sugeriu que o íon metálico estanho apresenta um potencial de formar pontes intercadeias (*crosslinking*) do tipo DNA-DNA ou DNA-proteína. Isso se deve à capacidade de o estanho ligar-se a dois ou mais grupos funcionais e à capacidade de estender essa ligação, formando pontes de estanho-estanho e estanho-oxigênio.

Somando-se aos relatos de genotoxicidade dos sais de estanho, Olivier e Marzin (1987) e Bernardo-Filho *et al.* (1994), utilizando o cromoteste SOS, constataram que o SnCl_2 e o SnF_2 são capazes de induzir as funções SOS. Sugeriu-se que a genotoxicidade induzida *in vivo* pelo SnCl_2 em diferentes linhagens de *E. coli* deficientes em sistemas de reparação de DNA, e as quebras de cadeias de DNA, demonstradas nos estudos *in vitro* de alterações da topologia de DNA plasmidial, ocorrem via formação de espécies reativas de oxigênio (Dantas *et al.* 1996, 1999; De Mattos *et al.* 2000).

Cabral *et al.* (1998), analisando o espectro mutacional do SnCl_2 em nível molecular, já haviam constatado que esse sal gerava transversões, transições e deleções em plasmídeo pAC 189. Os autores inferiram que esse efeito mutagênico ocorria, principalmente, via oxidação do DNA e produção de 8-hidroxi guanina (8-oxoG). Do mesmo modo, Caldeira-de-Araújo *et al.* (1996) já haviam evidenciado o aumento da sobrevivência de linhagens de *E. coli* ao SnCl_2 na presença de catalase e agentes captadores de metais.

Mais recentemente, Silva *et al.* (2002) observaram que extratos de plantas medicinais (*Cymbopogon citratus*, *Baccharis genistelloides*, *Maytenus ilicifolia*, *Peumus boldus* (*boldine*)) podem reagir com os íons Sn^{2+} , evitando a geração de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, protegendo as células de *E. coli* dos efeitos pró-oxidantes do SnCl_2 .

1.3 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo eucariótico

A levedura *S. cerevisiae* é o microrganismo eucariótico mais aplicável e melhor estudado para o entendimento de diversas funções biológicas. Ao mesmo tempo em que apresenta características biológicas típicas dos organismos procarióticos, como organização unicelular, genoma relativamente pequeno e crescimento rápido em diversas escalas, a levedura *S. cerevisiae* é um eucarioto verdadeiro, compartilhando diversas moléculas e processos biológicos básicos com os eucariotos superiores (Ausubel *et al.* 1995).

1.3.1 Ciclo de vida e características genéticas

A levedura *S. cerevisiae* apresenta um ciclo eucariótico típico, completo e bem definido. As células se dividem por brotamento logo após a duplicação de seu DNA, com tempo de geração de aproximadamente 90 minutos, quando incubadas a temperaturas de 28-30°C. Além disso, existe a possibilidade de células diplóides poderem ser induzidas à meiose e a uma conseqüente esporulação. A esporulação origina células haplóides que, por sua vez, se multiplicam por divisão mitótica e brotamento, o que é muito útil, por exemplo, na construção de linhagens geneticamente definidas (Zimmermann *et al.* 1984) (Figura 1).

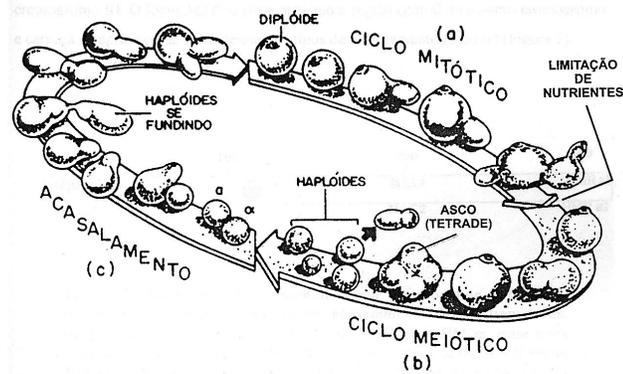


Figura 1. Ciclo de vida da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. (a) Ciclo mitótico: células diplóides formam brotos que crescem e se separam da célula mãe; (b) ciclo meiótico: em condições de carência nutricional, as células entram em meiose formando quatro esporos que se desenvolvem dentro do asco (tétrade). Os esporos podem crescer mitoticamente originando haplóides ou, então, (c) os esporos haplóides com sinais de acasalamento diferentes fundem-se formando uma célula diplóide. (Adaptado de Zimmermann *et al.* 1984).

As células diplóides são maiores, mais alongadas, apresentam somente brotamento polar e não apresentam a capacidade de acasalar. Por sua vez, a célula haplóide é mais arredondada, apresenta brotamento axial e libera o fator de acasalamento (Fuge e Werner-Washburne 1997).

A levedura *S. cerevisiae* possui dezesseis cromossomos, dentre os quais já foram encontrados diversos genes envolvidos em reparação de danos ao DNA. Esses genes de levedura conservam um grau de homologia bastante alto com outros organismos, como, por exemplo, *Drosophila melanogaster* ou mamíferos, podendo alguns genes de levedura complementar funções com genes de outros organismos (Friedberg 1991; Friedberg *et al.* 1995; Brendel e Henriques 2001; Brendel *et al.* 2003).

Foi o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma totalmente seqüenciado. A seqüência completa de seu genoma mostrou-se extremamente importante como referência para o seqüenciamento de genes humanos e de outros organismos eucarióticos superiores (Goffeau *et al.* 1996). A seqüência de bases que compõe o seu DNA e, desse modo, os genes que codificam a formação de suas proteínas, é conhecida e se encontra disponível para acesso em diversos bancos de dados públicos (*Saccharomyces Genome Database* (SGD): <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>). Isso permite a clonagem de diferentes genes, sua rápida e precisa identificação e caracterização, assim como melhor compreensão de sua função celular.

O seqüenciamento revelou um genoma compacto, de 13.389 kb, com a média de um gene a cada 2.000 pb (6152 ORFs – quadro aberto de leitura). Cerca de 70% do genoma codifica para aproximadamente 6.000 proteínas. Aproximadamente 46% dessas já haviam sido anteriormente identificadas, e em torno de 1.400 apresentam homologias com produtos protéicos conhecidos (Winzeler e Davis 1997; Winzeler *et al.* 1999).

Apesar da função de 22% dessas proteínas poder ser inferida com base na homologia de outras proteínas já caracterizadas, quase 32% do genoma possuem ORFs que codificam para produtos de função ainda desconhecidas e representam um grande potencial para elucidação de novos aspectos da biologia (Hieter *et al.* 1996; Winzeler *et al.* 1999; SGD: <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>).

Assim como o DNA genômico, o DNA mitocondrial (mtDNA) da levedura *S. cerevisiae* foi seqüenciado, confirmando que esse é circular e contém os genes que codificam para as subunidades I, II e III da citocromo c oxidase, ATP sintetase subunidades 6, 8 e 9, apocitocromo b, uma proteína ribossomal e vários íntrons. (Foury *et al.* 1998).

1.3.2 Metabolismo celular

A levedura *S. cerevisiae* é um organismo anaeróbico facultativo, motivo pelo qual ela é capaz de se desenvolver em condições anaeróbicas e aeróbicas de crescimento. Ela é capaz de utilizar uma grande variedade de fontes fermentáveis de carbono, como mono, di e oligossacarídeos, e fontes não fermentáveis de carbono, como etanol, acetato, glicerol, piruvato e lactato (Wills 1990; Maris *et al.* 2000).

A glicose é a fonte de carbono preferida da levedura. No metabolismo fermentativo, a glicose é convertida, através da via glicolítica, a piruvato que pode ser convertido a etanol e dióxido de carbono (CO₂). No metabolismo respiratório, a glicose é transformada à acetil-CoA e, então, a CO₂ e água via ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e fosforilação oxidativa (De Vries e Marres 1988).

Vários aspectos do metabolismo e da fisiologia da célula estão condicionados à concentração de glicose no meio (Wills 1990). A curva de crescimento da levedura *S. cerevisiae* apresenta fases distintas do ponto de vista metabólico e cinético (Figura 2). Após um curto período de adaptação ao meio (chamado de fase lag), as células iniciam uma divisão celular a cada uma hora e meia (fase de crescimento exponencial ou logarítmica) com a energia proveniente da fermentação da glicose. A grande disponibilidade de glicose no meio causa a repressão catabólica ou “repressão de glicose”. Acredita-se que tal fato se deva à repressão que a glicose exerce sobre as enzimas respiratórias. No metabolismo fermentativo, independentemente da presença ou não de oxigênio (O₂), encontram-se reprimidos os genes envolvidos na síntese de enzimas necessárias para a utilização de galactose ou dissacarídeos (sacarose ou maltose) e os genes requeridos na utilização de fontes não fermentáveis de carbono (Fuge e Werner-Washburne 1997; Maris *et al.* 2000).

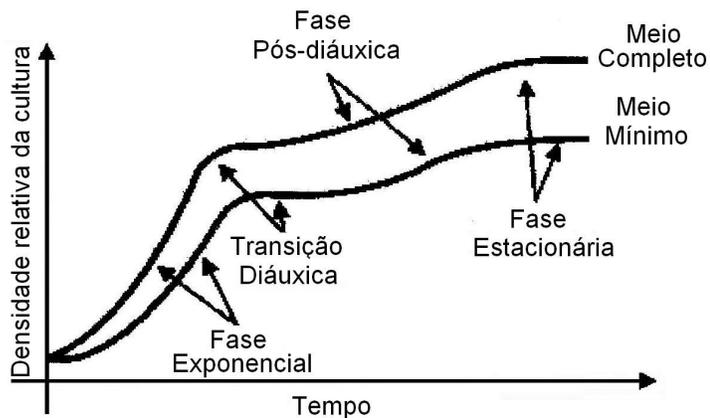


Figura 2. Curva de crescimento de uma linhagem selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* em meio rico e em meio mínimo. (Adaptado de Fuge e Werner-Washburne, 1997).

Quando a concentração de glicose cai abaixo do limite de repressão, há uma parada no ciclo celular e, durante esse período, ocorre uma reprogramação gênica para que as células possam ser preparadas para o metabolismo respiratório. Essa fase é conhecida como fase de transição diáuxica e caracteriza-se por uma desrepressão catabólica refletida numa indução das enzimas da respiração e dos componentes da cadeia transportadora de elétrons (De Vries e Marres 1988; Maris *et al.* 2000).

As células reassumem a divisão celular em um ritmo mais lento (uma divisão a cada três ou quatro horas), metabolizando o etanol produzido durante a fermentação. Essa fase é chamada de fase pós-diáuxica ou fase estacionária inicial (Fuge e Werner-Washburne 1997). Quando há um esgotamento dos nutrientes essenciais, refletido numa alta densidade celular, as células entram na fase estacionária. Nessa fase, as células são mais resistentes a uma série de condições de estresse e são capazes de sobreviver à inanição por um longo período (Maris *et al.* 2000).

1.4 Avaliação genotóxica

1.4.1 Testes de mutação reversa e recombinação mitótica na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* tem sido amplamente estudada, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese. Os ensaios com levedura são de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (Poli *et al.* 1999; Teerziyska *et al.* 2000). Esses ensaios são rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis, apresentando resultados confiáveis na identificação biológica. Além disso, a levedura possui um sistema endógeno de ativação metabólica constituído de um complexo enzimático (citocromo P-450) de detoxificação, que dispensa a adição de um sistema exógeno, tendo, por essa razão, uma vantagem relativamente aos ensaios bacterianos (Paula-Ramos *et al.* 1991; Moreno *et al.* 1991; Poli *et al.* 1999).

Experimentos de mutações reversas são os mais comumente utilizados. Baseiam-se na restauração ou compensação de um defeito gênico responsável por um requerimento nutricional (Zimmermann 1975). A restauração se deve a uma reversão exata do efeito original, enquanto que a compensação pode ser causada por uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação externa, como no caso dos alelos sem sentido (*nonsense*-mutação que resulta na alteração de um códon que codifica um aminoácido para um códon de terminação) (Hawthorne e Leopold 1974; Atkin *et al.* 1993). Reversão de auxotrofia para prototrofia pode ser causada por uma substituição, inserção ou deleção de pares de bases, ou, ainda, por uma mutação induzida por supressor do gene mutante original (para revisão, ver Henriques *et al.* 1997). Para que seja identificada a mutação reversa, é necessária a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas, como, por exemplo, a

linhagem haplóide de *S. cerevisiae* XV185-14c, isolada por Von Borstel (Parry e Parry 1984; Boeira *et al.* 2002; Rosa *et al.* 2004).

Essa linhagem permite a detecção de dois tipos de mutações lócus específicas: reversões do alelo *ocre lys1-1* (alteração para o códon UAA de término de cadeia) ou do alelo *missense his1-7* (códon alterado codifica um aminoácido diferente) e reversões por deslocamento de quadro de leitura do DNA (*frameshift*) verificadas no lócus *hom3-10*. As células revertentes podem ser detectadas pela semeadura em placas contendo meio seletivo, no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em quantidades muito pequenas, permitindo somente um crescimento inicial.

A recombinação mitótica é um dos mecanismos usados pelas células para reparar os danos no DNA, restaurando a sua integridade. Tais danos podem ser resultantes do metabolismo natural das células, tais como a atividade de espécies reativas de oxigênio, ou quebras duplas no DNA (DSBs) originadas durante a replicação ou durante a transcrição. Quando surge uma lesão no DNA, essa pode permanecer irreparável, levando à morte celular, ou pode ser reparável em processo que envolve a recombinação. Esse fenômeno acontece normalmente em células diplóides e caracteriza-se pela troca de fragmentos do DNA entre cromátides irmãs ou cromossomos homólogos. A recombinação pode ser feita de maneira recíproca (permuta ou *crossingover*) e não recíproca (conversão gênica). Muitos agentes químicos e físicos que induzem mutagênese podem aumentar a frequência de recombinação em células diplóides, como um reflexo de danos induzidos no DNA. Algumas substâncias carcinogênicas, no entanto, são negativas em testes que detectam mutagênese, mas induzem recombinação, sugerindo que esses fenômenos podem estar integrados (para revisão, ver Kupiec 2000).

Na permuta, ocorre a troca recíproca de segmentos de DNA entre dois cromossomos homólogos. Linhagens diplóides heterozigotas de *S. cerevisiae*

podem ser utilizadas para a detecção desse fenômeno, se as mesmas apresentarem, em seu genótipo, um par de marcadores recessivos, distantes entre si, mas localizados no mesmo braço cromossômico em diferentes homólogos e frente aos alelos selvagens correspondentes. O *crossingover* ou permuta resulta no posicionamento de ambos alelos recessivos no mesmo cromossomo homólogo, enquanto que os alelos selvagens se localizam no outro cromossomo homólogo. As células portadoras de ambos os alelos em homozigose seriam capazes de restaurar o genótipo original (Zimmermann 1975; Parry e Parry 1984; Kupiec 2000).

A conversão gênica mitótica é a troca não recíproca de informação genética entre dois cromossomos homólogos, podendo também ocorrer entre cromátides irmãs e entre membros de uma duplicação intracromátide (Petes *et al.* 1991). Nesse caso, é utilizada uma levedura diplóide heteroalélica com dois alelos inativos diferentes no mesmo loco do gene. A presença desses alelos causa uma dependência nutricional, isto é, células crescem somente em meio suplementado com um nutriente específico. Quando acontece conversão gênica, um fenótipo do tipo selvagem muito ativo é produzido a partir desses alelos inativos, através de uma recombinação intragênica. Essas colônias do tipo selvagem crescem em meio carente do nutriente específico (meio seletivo) (Zimmermann 1975; Parry e Parry 1984; Petes *et al.* 1991; Kupiec 2000).

Diversas linhagens diplóides de levedura já foram utilizadas para a determinação desses efeitos recombinogênicos, sendo as mais utilizadas as linhagens D7 (Zimmermann 1975) e XS2316 (Machida e Nakai 1980), sendo esta última utilizada no presente trabalho. A linhagem XS2316 é heterozigota para o locus CYH2 (+/*cyh*) e heteroalélica para LEU1 (*leu1-1//leu1-12*), os quais permitem verificar *crossingover* e conversão gênica, respectivamente.

1.4.2 Testes de mutações em procariotos

O teste *Salmonella*/Microsossoma, conhecido como teste de Ames, mede a indução de mutações reversas em linhagens de *Salmonella typhimurium*. A mutação reversa fundamenta-se na restauração ou compensação de um estado auxotrófico para prototrófico. A restauração é devida a uma reversão exata do defeito original no gene que codifica para a enzima requerida na síntese do aminoácido, enquanto que a compensação ocorre devido a uma mutação secundária dentro do gene (para revisão, ver Mortelmans e Zeiger 2000).

As linhagens de *S. typhimurium* utilizadas para a realização do teste são TA97, TA98, TA100 e TA102. A linhagem TA97 apresenta uma mutação que, quando alterada (*hisD6610*), causa deleção de um par de bases, levando a uma mudança no quadro de leitura (mutação *frameshift*). A TA98 apresenta a mutação *hisD3052* e, igualmente, detecta agentes mutagênicos que induzem a alteração no quadro de leitura. Geralmente, esses agentes mutagênicos atuam em unidades repetitivas do DNA, o que leva, nesses casos, a uma restauração do quadro correto de leitura envolvido na síntese de histidina.

Por sua vez, a TA100 é utilizada para a detecção de agentes que induzem metilação e causam substituição de pares de bases. Sua construção é baseada em uma mutação de ponto *hisG46*, no qual, a partir de alteração de base (leucina GAG/CTC por uma prolina GGG/CCC) se tem a produção da primeira enzima da biossíntese de histidina, restaurando o fenótipo selvagem. A linhagem TA102 contém o par de bases A-T no sítio crítico da reversão (sítio de mutação *hisG428*) e detecta agentes mutagênicos oxidativos, formas ativas de oxigênio e agentes alquilantes que atacam, preferencialmente, pares de bases A-T. Essa linhagem apresenta o sistema de reparação por excisão de danos ao DNA intacto (Mortelmans e Zeiger 2000; Rosa *et al.* 2004).

No Mutoxiteste, a linhagem WP2 é utilizada para a detecção de agentes que causam estresse oxidativo. Em procariotos, há um sistema de resposta adaptativa ao estresse oxidativo que envolve o fator de transcrição OxyR. Esse fator induz a transcrição de mais de 30 proteínas anti-estresse oxidativo. O teste consiste na utilização de uma linhagem IC203 de *E. coli* deficiente nesse fator de transcrição (*uvrA oxyR*) e de sua linhagem isogênica IC188 (*uvrA*) proficiente no fator. Portanto, as linhagens IC203 são mais sensíveis a agentes que geram lesões oxidativas do que quando comparadas com as linhagens com o fenótipo selvagem (para revisão, ver Blanco *et al.* 1998; Martinez *et al.* 2000; Picada *et al.* 2005).

Uma resposta similar encontra-se em organismos eucarióticos. O fator de transcrição Yap1 é oxidado e rapidamente acumulado no núcleo quando há uma situação de estresse oxidativo na célula. Ele regula a expressão de mais de setenta genes que codificam proteínas envolvidas nas respostas a danos oxidativos (Wood *et al.* 2004).

1.4.3 Efeitos citotóxicos em células de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em sistemas de reparação de DNA

A manutenção da integridade do material genético é fundamental à vida de todos os organismos. Entre os mecanismos responsáveis por essa manutenção, estão os sistemas de reparação de DNA, os quais apresentam íntima inter-relação com os mecanismos de replicação do DNA (Budd e Campbell 2000). Esses mecanismos de reparação protegem o DNA de agressões por agentes físicos, como a luz ultravioleta (UVC 254 nm), da ação de agentes químicos, como o metilmetanosulfonato (MMS), e dos subprodutos do metabolismo normal da célula, principalmente das espécies altamente reativas de oxigênio e de alterações ou lesões que podem ocorrer espontaneamente devido à instabilidade das ligações químicas dos nucleotídeos (Friedberg *et al.* 1995).

Esses sistemas, seja por correção ou tolerância a lesões, foram descritos em todos seres vivos. A recente caracterização de vários genes funcionalmente relacionados à reparação do DNA revelou uma alta conservação desses sistemas em espécies filogeneticamente distantes, revelando a sua importância ao longo da escala evolutiva (Hoeijmakers 1993a,b; Eisen e Hanawalt 1999).

Quando não se conhece o mecanismo de ação de determinados compostos e não se sabe exatamente que tipo de lesões no DNA podem ser geradas por essas substâncias, pode-se utilizar linhagens da levedura *S. cerevisiae* deficientes em um tipo de reparação para estudar as lesões produzidas pelas mesmas. Um método utilizado para a determinação da natureza das lesões induzidas por agentes químicos no DNA consiste em comparar a sensibilidade de mutantes deficientes em uma via de reparação do DNA com uma linhagem selvagem isogênica proficiente naquele tipo de reparação (Moustacchi *et al.* 1983; Melo *et al.* 1986; Paula-Ramos *et al.* 1991; Pasqual *et al.* 1993). Quando um mutante deficiente em uma via de reparação do DNA apresenta uma sensibilidade maior que a linhagem selvagem proficiente na reparação, pode-se inferir que a substância estudada induz o tipo de lesão incapaz de ser reparada pela linhagem mutante (Boeira *et al.* 2002; Rosa *et al.* 2004).

Nos últimos anos, foram descobertos mais de cem loci independentes com função de reparação de DNA em *S. cerevisiae* (para revisão, ver Moustacchi 1987; Friedberg *et al.* 1995). Esses loci estão classificados em três grupos de epistasia que compreendem três sistemas de reparação do DNA, os quais correspondem, até o momento, às três principais respostas celulares em relação aos danos no DNA: reparação por excisão-ressíntese (Via RAD3), reparação pós-replicativa e/ou mutagênica (Via RAD6) e reparação de quebras de cadeias no DNA por recombinação (Via RAD52) (Friedberg *et al.* 1995; Nickoloff e Hoekstra 1998; Swanson *et al.* 1999). Os grupos de epistasia dos genes envolvidos no processo de reparação são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos de epistasia dos genes de *Saccharomyces cerevisiae* envolvidos em reparação de danos no DNA.

Grupo RAD3	Grupo RAD6	Grupo RAD52
<i>RAD1</i>	<i>RAD5 (REV2) (SNM2)</i>	<i>RAD50</i>
<i>RAD2</i>	<i>RAD6 (UBC2)</i>	<i>RAD51</i>
<i>RAD3</i>	<i>RAD8</i>	<i>RAD52</i>
<i>RAD4</i>	<i>RAD9</i>	<i>RAD53</i>
<i>RAD7</i>	<i>RAD15</i>	<i>RAD54</i>
<i>RAD10</i>	<i>RAD18</i>	<i>RAD55</i>
<i>RAD14</i>	<i>RADH (SRS2)</i>	<i>RAD56</i>
<i>SSL1</i>	<i>REV1</i>	<i>RAD57</i>
<i>SSL2 (RAD25)</i>	<i>REV3 (PSO1)</i>	<i>RAD58</i>
<i>TFB1</i>	<i>CDC9</i>	<i>RAD59</i>
<i>RAD16 (PSO5)</i>	<i>REV5</i>	<i>PSO4 (PRP19)</i>
<i>RAD23</i>	<i>REV6</i>	<i>RAD24</i>
<i>CDC8</i>	<i>REV7</i>	<i>XRS2</i>
<i>CDC9</i>	<i>CDC7</i>	
<i>MMS19</i>	<i>CDC8</i>	
<i>PSO2 (SNM1)</i>	<i>MMS3</i>	
<i>PSO3</i>	<i>PSO4 (PRP19)</i>	
<i>UVS12</i>	<i>UMR-7</i>	
<i>RAD26</i>		
<i>CDC44</i>		
<i>RFA1</i>		
<i>POL30</i>		

Adaptado de Friedberg *et al.* (1995), Henriques *et al.* (1997) e Nickoloff e Hoekstra (1998). Os genes entre parênteses são alelos.

A reparação por excisão de nucleotídeos (NER) é um mecanismo mais genérico e flexível, reparando lesões que levam a distorções na dupla hélice do DNA. Ele envolve a formação de uma série de complexos enzimáticos (Volker *et al.* 2001), os quais promovem a clivagem de um fragmento de DNA contendo a lesão e a subsequente nova polimerização e ligação dessa região. A deficiência

em genes envolvidos no mecanismo de NER em humanos resulta em três síndromes raras recessivas (Xeroderma Pigmentosum, Síndrome de Cockayne e Tricodistrofia), incluindo uma predisposição ao desenvolvimento de câncer (Boer e Hoeijmakers 2000; Friedberg 2001; Dudásová *et al.* 2004). O grupo compreende a reparação por excisão de nucleotídeo, reparação por excisão de base e/ou reparação de bases imprópriamente emparelhadas durante a replicação do DNA (*mismatch repair*). Nesse grupo, estão os genes isolados a partir da sensibilidade à radiação UVC (254 nm), fotoadição de psoralenos, mostardas nitrogenadas e metilmetanosulfonato (para revisão, ver Henriques e Brendel 1990; Prakash e Prakash 2000; Brendel e Henriques 2001).

Os genes do grupo RAD6 pertencem à via de reparação mutagênica ou pós-replicativa, também conhecida como via sujeita a erros. Mutantes desse grupo são sensíveis a vários agentes químicos e físicos e, em sua maioria, parcial ou totalmente bloqueados na mutagênese induzida. Os alelos mutantes que fazem parte desse grupo são altamente pleiotrópicos e constituem o sistema de reparação do DNA mais complexo e menos compreendido das três vias de reparação de DNA em *S. cerevisiae* (Friedberg *et al.* 1995; Xiao *et al.* 2000). O grupo inclui mutantes que são sensíveis à radiação UVC, radiações ionizantes, agentes alquilantes e psoralenos fotoativados, apresentando uma resposta mutagênica diferenciada quando expostos a esses agentes (Friedberg *et al.* 1995; Nickoloff e Hoekstra 1998; Game *et al.* 2000). Xiao *et al.* (2000) sugerem que a via RAD6 é dividida em três subvias representadas pelos genes *RAD5*, *POL30* e *REV3*. As vias RAD5 e POL30 são supostamente livres de erros, enquanto a via REV3 é largamente mutagênica (Brendel *et al.* 2003).

E, por último, o grupo RAD52, cujos genes fazem a reparação de quebras simples e duplas do DNA, principalmente através de recombinação homóloga (Friedberg *et al.* 1995; Nickoloff e Hoekstra 1998). As proteínas que participam da recombinação homóloga, processo essencialmente não mutagênico, utilizam a informação contida na fita complementar e, portanto, evitam o risco de

mutações (Lehmann 2000). Há, também, o mecanismo de reparação do DNA por recombinação não homóloga ou ilegítima, que não é o mecanismo preferencial para a correção de quebras duplas utilizado pela levedura *S. cerevisiae*, mas, sim, pelos vertebrados, dependente do gene *KU* (Van Dick *et al.* 1999). Mutantes deste grupo são sensíveis a agentes que causam quebras duplas no DNA, como as radiações ionizantes e alguns agentes alquilantes (Friedberg *et al.* 1995; Nickoloff e Hoekstra 1998; Dudás e Chovanec 2004).

OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial tóxico e genotóxico do cloreto estano (SnCl₂) em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e em células de bactéria *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*.

1.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar o potencial genotóxico do SnCl₂, utilizando o teste *Salmonella/Microsoma* e o Mutoxiteste;
- ✓ Avaliar o potencial mutagênico do SnCl₂ em células haplóides e diplóides de levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ Analisar o potencial recombinogênico do SnCl₂ em células diplóides de *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ Testar a citotoxicidade do SnCl₂ em mutantes defectivos nas três principais vias de reparação de danos de DNA em *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ Testar a citotoxicidade do SnCl₂ em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* defectivos nas enzimas superóxido dismutase mitocondrial e citosólica e catalase T citosólica;
- ✓ Verificar a sensibilidade das células haplóides de *Saccharomyces cerevisiae* ao SnCl₂ quando essas estão em metabolismo fermentativo e respiratório.

CAPÍTULO I



Genotoxicity of stannous chloride in yeast and bacteria

C. Pungartnik^{a,c}, C. Viau^a, J. Picada^a, A. Caldeira-de-Araújo^{a,b},
J.A.P. Henriques^a, M. Brendel^{a,c,*}

^a Dept. de Biofísica, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91507-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Dept. de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, UERJ, Av. 28 de Setembro,
87 fundos, CEP20551-130 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna,
Km 16, Ilhéus, BA CEP45650-000, Brazil

Received 18 January 2005; received in revised form 7 March 2005; accepted 17 March 2005

Available online 19 April 2005

Abstract

Stannous chloride was found genotoxic in microbial test systems of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in one strain of *Salmonella typhimurium* and in the Mutoxitest of *Escherichia coli*. Five isogenic haploid yeast strains differing only in a particular repair-deficiency had the following ranking in Sn²⁺-sensitivity: *rad52Δ* > *rad6Δ* > *rad2Δ* > *rad4Δ* > *RAD*, indicating a higher relevance of recombinogenic repair mechanisms than nucleotide excision in repair of Sn²⁺-induced DNA damage. Sn²⁺-treated cells formed aggregates that lead to gross overestimation of toxicity when not undone before diluting and plating. Reliable inactivation assays at exposure doses of 25–75 mM SnCl₂ were achieved by de-clumping with either EDTA- or phosphate buffer. Sn²⁺-induced reversion of the yeast *his1-798*, *his1-208* and *lys1-1* mutant alleles, in diploid and haploid cells, respectively, and putative frameshift mutagenesis (reversion of the *hom3-10* allele) was observed. In diploid yeast, SnCl₂ induced intra-genic mitotic recombination while inter-genic (reciprocal) recombination was very weak and not significant. Yeast cells of exponentially growing cultures were killed to about the same extent at 0.1% of SnCl₂ than respective cells in stationary phase, suggesting a major involvement of physiological parameters of post-diauxic shift oxidative stress resistance in enhanced Sn²⁺-tolerance. Superoxide dismutases, but not catalase, protected against SnCl₂-induced reactive oxygen species as *sod1Δ* had a three-fold higher sensitivity than the WT while the *sod2Δ* mutant was only slightly more sensitive but conferred significant sensitivity increase in a *sod1Δ sod2Δ* double mutant. In the *Salmonella* reversion assay, SnCl₂ did not induce mutations in strains TA97, TA98 or TA100, while a positive response was seen in strain TA102. SnCl₂ induced a two-fold increase in mutation in the Mutoxitest strain IC203 (*uvrA oxyR*), but was less mutagenic in strain IC188 (*uvrA*). We propose that the mutagenicity of SnCl₂ in yeast and bacteria occurs via error-prone repair of DNA damage that is produced by reactive oxygen species.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Stannous chloride; *Saccharomyces cerevisiae*; Cell clumping; Genotoxicity; Oxidative stress; Superoxide dismutase

* Corresponding author. Tel.: +55 73 3680 5328; fax: +55 73 3680 5328.

E-mail address: martinbrendel@yahoo.com.br (M. Brendel).

1. Introduction

Stannous ions (Sn^{2+}), as fluoride or chloride salts, are present in our daily life. SnCl_2 , also known as tin chloride, is chemically classified as low risk agent [1]. It has been used in food industry to conserve soft drinks [2], in sensitising of glass and plastics before metallizing [3] and in manufacture of tin chemicals, colour pigments, pharmaceuticals and sensitised paper; Sn^{2+} in the form of SnF_2 has been mainly used in dentistry (as dentifrices) as a highly effective anti-microbial agent against caries [4]. SnCl_2 is also employed as reducing agent in production of Technetium-99m-labelled radio-pharmaceuticals [5].

Early reports showed toxicity of tin chloride in rats, i.e. pathological changes in liver, kidney and brain edema [6], pancreatic atrophy [7], increased incidence of changes in fatty acids and vacuoles in the proximal convoluted tubules [8]. Rabbits fed with one or more grams of SnCl_2 every 6–10 days died after 1–2 months with gastritis, degeneration of liver and kidney and paralysis of the hind legs [9].

In an attempt to determine Sn^{2+} -induced toxicity/genotoxicity and/or carcinogenicity/teratogenicity, various in vivo and in vitro models have been tested during the past 25 years. Negative results were reported for the *Bacillus subtilis* Rec-assay [10] and for yeast [11] where SnCl_2 could induce neither mutation nor mitotic gene conversion. Also, no genotoxic effects were found in the *Drosophila melanogaster* wing spot test [12]. However, since McLean and Kaplan [13] showed rapid and prolonged suppression of DNA synthesis in SnCl_2 -treated Human Raji cells, many reports indicated an interaction between genomic material and SnCl_2 , thus suggesting its putative genotoxicity. McLean et al. [2,14] described that SnCl_2 produced single-strand breaks in DNA of Chinese hamster ovary cells and caused DNA damage in human white blood cells; genotoxicity of SnCl_2 was shown in the SOS chromotest [15]. Ashby and Tennant [16] found carcinogenic activity in rat thyroid cells but reported negative results for the *Salmonella* assay. SnCl_2 -induced cytotoxicity/genotoxicity in different DNA repair mutants of *Escherichia coli* [17,18] and DNA damage was suggested to occur via formation of oxygen radicals [19,20]. In vitro, SnCl_2 induced strand breaks in plasmid DNA and it was suggested that this type of DNA lesion could also be introduced by SnCl_2 in vivo [21].

In order to further evaluate the genotoxic potential of SnCl_2 and to confirm suggested mechanisms of its action on DNA and on repair of induced lesions, we chose the standard bacterial genotoxicity test systems *Salmonella* and Mutoxitest as well as the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a well-defined eukaryotic model system, this unicellular organism offers large numbers of isogenic DNA repair mutants and molecularly well-defined alleles for mutagenicity testing and, in the diploid phase, also allows the study of mutagen-induced recombinational processes.

2. Materials and methods

2.1. Strains and media

The relevant genotypes of the bacteria and yeast used in this study are given in Table 1. Media, solutions and buffers were prepared according to Burke et al. [22]. Complete medium (YPD) was used for routine growth of yeast cells and minimal medium (MM) was supplemented with the appropriate amino acids (synthetic complete medium, SC). To ascertain yeast respiratory competence and for the elimination of spontaneously accumulated *petites*, all strains were pre-grown on YPG media (glucose replaced by 3% glycerol) before being propagated in YPD. *E. coli* strains WP2 *uvrA*/pKM101 (IC188) and WP2 *uvrA oxyR*/pKM101 (IC203) were obtained from M. Blanco, Instituto de Investigaciones Citológicas, Spain.

2.2. SnCl_2 solubilization

Two types of stannous chloride were used: $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and anhydrous SnCl_2 (Sigma, St. Louis, MO). As $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ is poorly soluble in water (less than its own molecular weight of water; The Merck Index, 2001), it was routinely dissolved in the following manner: 0.1 g was dissolved in 1 mL of cold absolute ethanol (EtOH), and immediately and carefully heated not to reach the boiling point. Upon agitation, the initially turbid solution becomes clear. After cooling, 1 mL of water (1:1) was carefully and slowly added in order to avoid precipitation. This stock solution (250 mM in 50% EtOH) had to be freshly prepared for

Table 1
Strains used in this study and their relevant genotypes

	Genotype	Reference
Yeast strains		
BY10000	<i>MATαhis3Δ1, lys2Δ0, leu2Δ0, ura3Δ0</i>	EUROSCARF
4 BY <i>rad</i> mutants	Same genotype as BY10000 but <i>rad52Δ, rad2Δ, rad4Δ, rad6Δ</i>	See above
XS2316	<i>MATα +leu1-1 trp5-48+++ his1-208</i>	[32]
XV185-14c	<i>MATα ade6 leu1-12+cyh2 met13 lys5-1 his1-208</i>	[29]
EG103 (WT)	<i>MATαleu2-3,112 his3Δ1 trp1-289 ura3-52 GAL⁺</i>	E.B.Gralla
EG118 (<i>sod1Δ</i>)	<i>sod1::URA3</i> all others markers as EG103	See above
EG110 (<i>sod2Δ</i>)	<i>sod2::TRP1</i> all others markers as EG103	See above
EG133 (<i>sod1Δ sod2Δ</i>)	<i>sod1::URA3 sod2::TRP1</i> double mutant, all others markers as EG103	See above
EG223 (<i>ctt1Δ</i>)	<i>ctt1::TRP1</i> all others markers as EG103	See above
Bacterial strains		
IC203	<i>trpE65, uvrA, oxyR</i> , pKM101	[42]
IC188	<i>trpE65, uvrA</i> , pKM101	See above
TA102	<i>hisG428, rfa</i> , pKM101, pAQ1	[23]

each experiment. Final concentration of SnCl₂·2H₂O was either 2.5 or 25 mM (concentration of EtOH never exceeded 5% and did not affect cell survival). When concentrations >25 mM of SnCl₂ were used, the anhydrous salt was directly added to the cell suspension. Since equimolar concentrations of anhydrous SnCl₂ and SnCl₂·2H₂O had the same genotoxicity we preferably used the readily water-soluble anhydrous stannous salt, thus avoiding use of ethanol and of heating.

2.3. *Salmonella*/microsome mutagenicity assay

Mutagenicity was assayed by the pre-incubation procedure proposed by Mortelmans and Zeiger [23]. SnCl₂ was dissolved in water immediately prior to use. Hundred microliter of tester-strain cultures ((1–2) × 10⁹ cells/mL) was incubated at 37 °C with different amounts of SnCl₂ (125–5000 μM) for 20 min, without shaking. The reaction was stopped and the cells were dis-aggregated by adding 800 μL of 0.067 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 (PB). Then, 2 mL of molten top agar (0.6% agar, 0.5% NaCl, 50 μM histidine, 50 μM biotin, pH 7.4, 45 °C) was added and the mixture poured immediately onto a plate of minimal agar (1.5% agar, Vogel–Bonner E medium, containing 2% glucose). The positive controls were 4-nitroquinoline-oxide (0.5 μg/plate) for TA98, TA97 and TA102, and sodium azide (5 μg/plate) for TA100. The plates were incubated in the dark at 37 °C for 48 h before counting.

2.4. *E. coli* mutagenicity assay—WP2 Mutoxitest

The assays were performed according to Blanco et al. [24], with a modified pre-incubation procedure [25]. Hundred microliter of a fresh overnight culture was incubated without shaking at 37 °C with different amounts of SnCl₂ (125–5000 μM) for 20 min. The reaction was stopped and the cells were dis-aggregated by adding 800 μL of PB. Two milliliter of molten top agar at 45 °C (supplemented with 0.05 mM tryptophan) was added and poured into plates containing minimal ET4 agar (15 g Difco agar and 4 g glucose/L of Vogel–Bonner E medium). The plates were incubated for 48 h at 37 °C. The *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BOOH, 50 μg/plate) was used as positive control. All mutagenicity assays were carried out in triplicate, on at least two occasions.

2.5. Bacterial data analysis

Mutagenicity data were analyzed with *Salmonel* software [26]. A compound was considered positive for mutagenicity only when (a) the number of revertants was at least double the spontaneous yield (MI ≥ 2; MI = mutagenic index: number of colonies in the treated sample/number of colonies in the negative control); (b) a significant analysis of variance ($p \leq 0.05$) was found for the treated and negative control data; and (c) a reproducible positive dose–response ($p \leq 0.01$) was present, as evaluated by the *Salmonel* software [27].

2.6. Yeast Exposure to SnCl₂ and survival

Stationary (STAT) cells were grown in YPD at 30 °C for 72 h and exponentially growing (LOG) cells were obtained after 4.5-h incubation of YPD freshly inoculated with 2×10^6 STAT cells/mL. LOG cells were only used when having a minimum of 20–30% buds at $(1-2) \times 10^7$ cells/mL. Sensitivity of twice saline-washed yeast suspensions to SnCl₂ was routinely determined in liquid saline (0.9% NaCl, pH 5.0). Exposure concentrations ranged from 25 to 75 mM for STAT and from 25 to 250 μM for LOG cells. Exposure time was up to 90 min at 30 °C. Thereafter, SnCl₂-mediated cell aggregates were de-clumped in phosphate buffer (PB, pH 7.4, 0.067 M) or in EDTA solution (0.25 M) before dilution and plating. Routinely, SnCl₂-exposed cell suspensions were diluted into PB, followed by vigorous vortexing, except when stated otherwise. Cells were plated on YPD and survival was determined after 3 days at 30 °C. Presented results are the mean of at least three independent experiments and the error bars represent standard deviation as calculated by GraphPad Prism[®] program.

2.7. Point and frameshift mutation in haploid yeast

Two alleles, *his1-798* and *lys1-1* were used for point mutagenesis. The suppressible *ochre* nonsense mutant allele *lys1-1* can be reverted either by locus-specific sequence alteration (true reversion) or by a forward mutation in a suppressor gene [28,29]. Distinction between true reversions and forward (suppressor) mutations at the *lys1-1* locus was according to [30], where the reduced adenine content of the SC-Lys medium shows true reversions as red and suppressor mutations as white colonies. The *hom3-10* mutant allele of haploid strain XV185-14c was used for assaying putative frameshift mutagenesis. It is believed that *hom3-10* contains a frameshift mutation due to its response to a range of diagnostic mutagens [29]. Survival was determined on SC (3–5 day, 30 °C) and mutation induction (HIS, LYS or HOM revertants) on media lacking the appropriate amino acid (7–10 day, 30 °C). Forward mutation was measured with the Canavanine Resistance (CAN-) Assay (*CAN1* → *can1^r*). Concentration of canavanine in complete synthetic media fully supplementing all auxotrophies of the yeast cells was 20–60 mg/L (SC-ARG+CAN) [31]. Stop of SnCl₂ reaction and

de-clumping was as described above. Mutant frequencies were scored per surviving cells. Results are means of three independent experiments. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism[®] software.

2.8. Induced mutation and recombination in diploid yeast

Mitotic recombination (inter- and intra-genic), as well as *his1-208* reversion was determined in diploid strain XS2316 [32]. Mutant and recombinant frequencies were scored per surviving cell. Washed yeast suspensions ($(2-4) \times 10^8$ /mL) were treated with 25–75 mM SnCl₂ as follows: 5 mL of STAT saline-washed cells were incubated with 25, 50 or 75 mM SnCl₂ for up to 60 min. At fixed times, 1.0 mL aliquots were withdrawn from the cell suspension and added to 1 mL or 9.0 mL of PB (the latter dilution for 50 and 75 mM of SnCl₂) to stop the reaction and to de-clump the cell aggregates. The diluted cell suspension was vortexed vigorously, diluted in 1:10 steps with PB, and plated on three media (SC, SC-Leu and SC+Cyh). Following incubation for 4–7 day at 30 °C, colonies appearing on SC medium yielded data on cell survival, while those grown on SC-Leu and SC+Cyh gave the incidence of intra-genic recombination (mitotic gene conversion) and inter-genic recombination (crossing-over), respectively. For assaying, the exact frequency of reciprocal crossing-over it was necessary to eliminate possible revertants to cycloheximide-resistance resulting from mutation at the *CYH2* locus, as well as from monosomy of chromosome VII. Therefore, cycloheximide-resistant colonies were replica-plated on SC-Lys, SC-Met and SC-Ade media to confirm the recombination origin of *cyh2* homozygosity. Results are means of three independent experiments. Mitotic recombination statistical analyses were performed using the GraphPad Prism[®] software.

3. Results

3.1. Genotoxicity in bacteria

In *Salmonella typhimurium* tester-strains, 12.5–500 μM SnCl₂ was not mutagenic in frameshift-sensitive strains TA98 and TA97 and in TA100 (base pair substitution mutation). The only positive

Table 2
Mutagenicity of SnCl₂ in *S. typhimurium* TA102 and in *E. coli* IC188 and IC203 strains

Substance	Dose (mM)	TA102		IC188		IC203	
		Rev./plate ^a	MI ^b	Rev./plate ^a	MI ^b	Rev./plate ^a	MI ^b
NC ^c		367 ± 14		133 ± 21		146 ± 26	
SnCl ₂	0.125	ND		150 ± 30	1.1	179 ± 55	1.2
	0.25	ND		157 ± 33	1.2	174 ± 66	1.2
	0.50	ND		179 ± 8	1.3	201 ± 66	1.4
	1.00	442 ± 50	1.2	202 ± 35	1.5	231 ± 27*	1.6
	1.25	463 ± 36*	1.3	185 ± 5*	1.4	298 ± 41*	2.0
	2.50	482 ± 18**	1.3	ND		ND	
	3.75	515 ± 16**	1.4	ND		ND	
	5.00	733 ± 41**	2.0	ND		ND	
PC ^d		1923 ± 210	5.2	1250 ± 172	9.1	2137 ± 288	14.6

ND, not determined.

^a Number of revertants/plate: mean of three plates ± S.D.

^b MI, mutagenic index: number of colonies induced in the sample/number of spontaneous colonies (negative control).

^c NC, negative control: distilled water.

^d PC, positive control: 4-nitroquinoline 1-oxide (0.5 µg/plate) for TA102; *tert*-butylhydroperoxide (50 µg/plate) for IC188 and IC203.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$ (ANOVA).

mutagenic response with an MI of 2.0 was observed in strain TA102, which detects oxidative and alkylating mutagens and ROS [25] at a SnCl₂ dose of 500 µM (Table 2). In this result, also a significant response for analysis of variance ($p \leq 0.05$) and a positive dose–response ($p \leq 0.01$) was observed. When using the oxidant-sensitive *E. coli* strain IC188 (WP2 *vrA*/pKM101) and its derivative, IC203 (WP2 *uvrA oxyR*/pKM101) with enhanced sensitivity to ROS, we found a dose-dependent mutation induction by SnCl₂ (Table 2). However, an MI of 2.0 was reached only in strain IC203 and only at 125 µM of SnCl₂, the highest dose tested.

3.2. Genotoxicity in yeast

Survival of SnCl₂-treated STAT cells of haploid yeast is influenced by cell aggregation and by DNA repair (Fig. 1). Sn²⁺-induced cell aggregation, when not corrected for (undone by diluting in PB or EDTA buffer) exaggerated the toxic effect. The extent of correction of survival by proper de-clumping of the Sn²⁺-treated yeast cells for the WT and the *rad4* mutant that is deficient in nucleotide excision repair (NER) is shown in Fig. 1 (inset). Clumping efficiency is the same for both strains as the relative increase in sensitivity of Sn²⁺-treated *rad4*Δ to the isogenic *RAD* WT re-

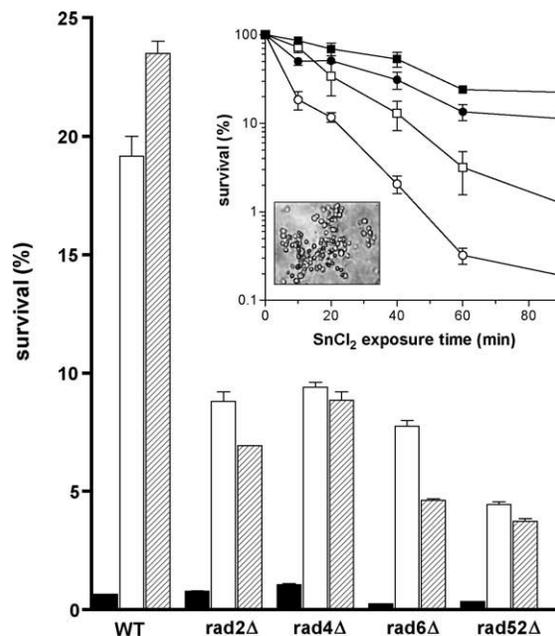


Fig. 1. Survival of STAT cells of WT and 4 DNA repair mutants after 90 min SnCl₂ exposure (25 mM) after dilution in saline (black columns), EDTA buffered saline (open columns), and phosphate buffer (hatched columns). Inset: Survival of Sn²⁺-treated WT (squares) and *rad4*Δ (circles), diluted in either phosphate buffer (filled symbols) or in saline (open symbols). Photo: Clumping haploid WT yeast after exposure to 25 mM SnCl₂.

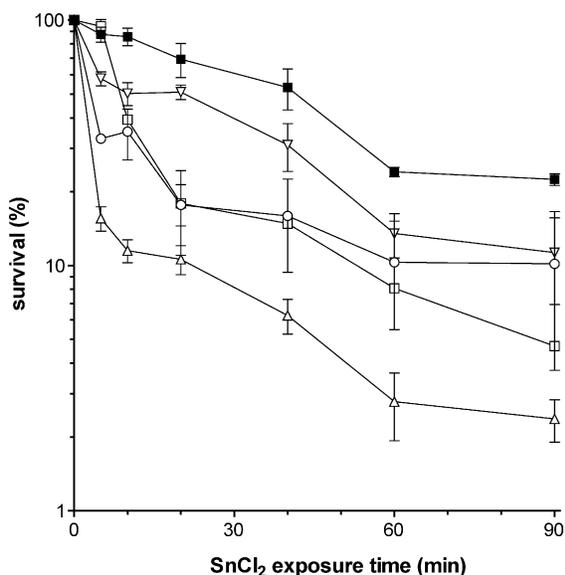


Fig. 2. Sensitivity to 25 mM SnCl₂ of five isogenic yeast strains. *RAD* (WT (■)); *rad4*Δ (▽); *rad2*Δ (○); *rad6*Δ (□); *rad52*Δ (△). In some points, error bars (standard deviation) do not exceed the size of the symbol. Cells were diluted in PB.

mained constant with a dose-modifying factor of about 1.6 (Fig. 1; inset).

The three main modes of DNA repair of *S. cerevisiae* each contribute to the observed resistance in the WT (*RAD*) strain. Fig. 2 shows sensitivity to Sn²⁺ of five isogenic yeast strains, four of which carry each one specific deletion of a DNA repair gene of *S. cerevisiae*. All four repair-deficient mutants were significantly more Sn²⁺-sensitive than the isogenic WT, with *rad52*Δ exhibiting the highest sensitivity amongst the isogenic repair mutants.

While Sn²⁺ was clearly mutagenic in two histidine reversion assays, it was more so for the *his1-798* mutant allele (Fig. 3). Survival of both strains was in the order of 70–80%, with the diploid being more resistant (Fig. 3). Clearly, mutation induction was exposure dose-dependent (Fig. 4). Sn²⁺ also reverted the putative frameshift allele *hom3-10* and the ochre *lys1-1* mutant allele in haploid strain XV185-14c at the highest exposure concentration (75 mM) at still low levels of toxicity (Fig. 5), in the absence of significant induction of ochre suppressor mutations (data not shown).

Under the same conditions we could not observe Sn²⁺-induced forward mutagenesis in the CAN-assay.

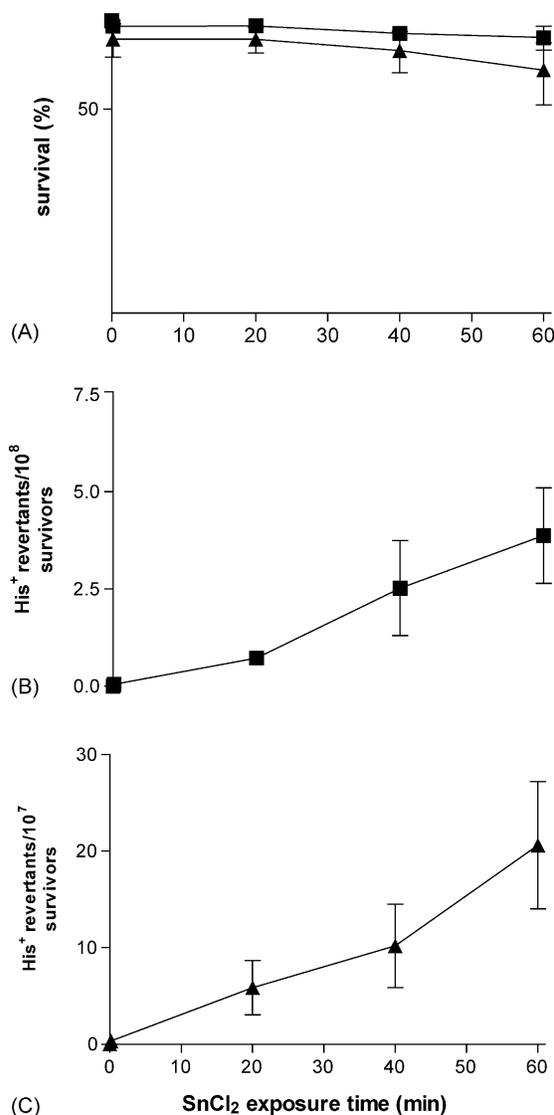


Fig. 3. Genotoxic effects of 25 mM SnCl₂ in STAT yeast cells of haploid XV185-14c (▲) and diploid XS2316 (■). (A) Survival; (B and C) reversion of different *his1* mutant alleles, depending on exposure time; (B and C) have the same abscissa. Cells were diluted in PB.

In fact, we found negative mutation induction, i.e. the frequency/survivors of *can1*^R mutations declined with increasing exposure to Sn²⁺ (Table 3). This was also observed when plating on lower CAN concentrations (from 60 μg/mL down to 20 μg/mL) for all five EU-ROSCARF strains (data not shown). The correct de-clumping by PB of Sn²⁺-treated cells was controlled

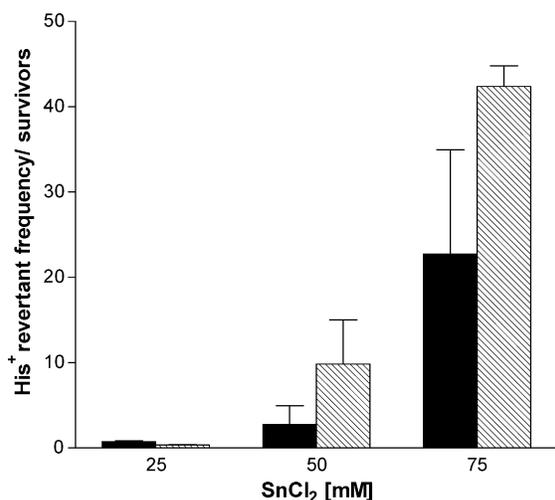


Fig. 4. Reversion of two different histidine mutant alleles depending on exposure concentration of Sn²⁺ in STAT cells (20 min) in haploid XV185-14c (*his1-7* [*his1-798*], per 10⁷ survivors), hatched and diploid XS2316 (*his1-1* [*his1-208*], per 10⁸ survivors), solid columns, respectively. Cells were diluted in PB.

by microscopic observation. The same yeast suspensions showed forward mutation to CAN-resistance (*CAN1* → *can1^R*) when treated with UVC (Table 3).

Possible recombinogenic effects of Sn²⁺ were investigated by using the diploid yeast strain XS2316 [32], which detects two forms of mitotic recombination (crossing-over and gene conversion), in addition to reversion by mutation. There was a slight increase in mitotic crossing-over at 50 and 75 mM Sn²⁺-exposure

Table 3
Differential response of the *rad52Δ* strain in the CAN forward mutation assay after SnCl₂ and UVC exposure

	Survival (%)	<i>can1^R</i> /10 ⁷ survivors	<i>can1^R</i> mutants*
SnCl₂ (25 mM)**			
Zero (control)	100	82	329
20 min	22	45	358
40 min	15	27	188
60 min	9.1	22	175
UVC (J/m²)**			
Zero (control)	100	82	1615
10	80	175	2800

* Mutant numbers scored on SC+CAN agar plates [60 μg/mL CAN].

** Cell suspensions were diluted with PB.

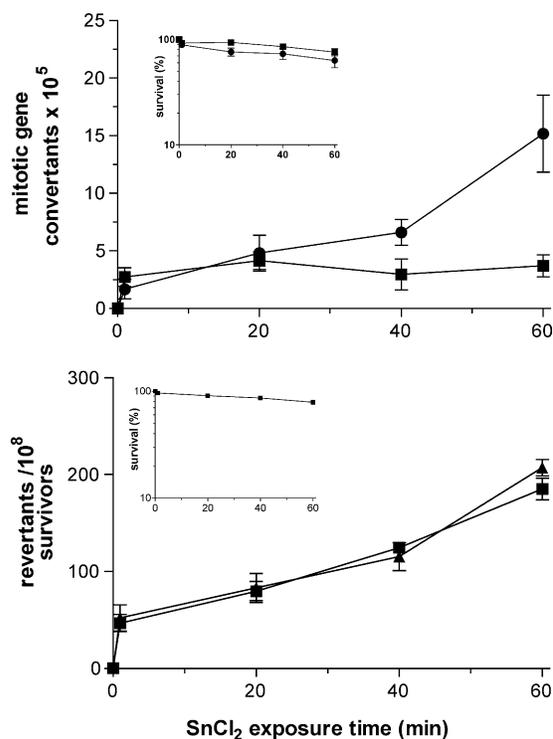


Fig. 5. SnCl₂-induced mitotic gene conversion in diploid strain XS2316 (upper panel): (●) 50 mM SnCl₂; (■) 25 mM SnCl₂. Lower panel: SnCl₂ (75 mM)-induced reversion to prototrophy of (■) *hom3-10* and (▲) *lys1-1* (locus-specific revertants) in haploid strain XV185-14c. All experiments include a 2-min exposure dose-sample to assess for eventual early effects of SnCl₂. Cells were diluted in PB.

concentrations while UVC-induced mitotic recombination was highly significant (Table 4). SnCl₂ at 50 mM resulted in significant mitotic gene conversion (Fig. 5; upper panel). Increasing the concentration of Sn²⁺ from 25 to 50 and to 75 mM, while maintaining the same exposure time, resulted in significantly higher reversion frequencies for both *his1* mutant alleles (Fig. 4).

Compared to STAT cells of the haploid DNA repair-proficient WT strain XV185-14c, pre diauxic-shift LOG cells were found slightly more sensitive at an exposure concentration of 25 μM, i.e. at 0.1% of the SnCl₂ concentration (Fig. 6). Thus, the difference in sensitivity to SnCl₂ was much greater between STAT and LOG cells of the same WT strain than amongst isogenic STAT phase cells of strains with different capacity of DNA repair, where the most sensitive *rad52Δ* mutant showed an about three-fold higher

Table 4
Induction of mitotic recombination by SnCl₂ in diploid *S.cerevisiae* strain XS2316

Agent (dose)	Treatment	Survival (%)	Crossing-over/10 ⁵ survivors
UVC (J/m ²)	0	100.0	42.8 ± 1.8 (231)
	40	75.5	1944 ± 189 (1008)***
	60	67.6	2534 ± 276 (1112)***
SnCl ₂ (mM)	Time (min)		
25	0	100.0	16.6 ± 5.0 (352)
	1	92.3	24.6 ± 5.0 (472)
	20	93.7	16.7 ± 1.0 (468)
	40	85.4	22.2 ± 2.6 (488)
	60	75.9	21.9 ± 5.7 (446)
50*	0	100.0	35.7 ± 8.3 (475)
	1	89.0	24.4 ± 6.0 (392)
	20	76.3	29.3 ± 9.3 (650)
	40	73.1	29.8 ± 0.7 (642)
	60	63.2	22.9 ± 4.5 (645)
75**	0	100.0	28.9 ± 1.2 (493)
	1	98.7	29.3 ± 2.2 (518)
	20	78.7	39.0 ± 2.8 (534)
	40	80.6	39.1 ± 18.9 (609)
	60	64.1	33.4 ± 16.0 (435)

UVC data is average of three experiments; data for 25, 50 and 75 mM SnCl₂ treatments are from an average of two independent experiments. Numbers in parenthesis represent the absolute number of mitotic recombinants in all plates per dose.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$ unpaired *t*-test.

*** $p < 0.001$ one-way ANOVA.

Sn²⁺-sensitivity compared to that of the *RAD* WT (Fig. 2).

The importance of anti-ROS defence systems of the yeast cell on SnCl₂-induced toxicity could be demonstrated by the higher sensitivity of haploid strains containing the *sod1* and *sod2* mutant alleles. Lack of cytosolic superoxide dismutase (*sod1*Δ) and, to a marginal extent, of mitochondrial superoxide dismutase (*sod2*Δ) sensitised the STAT cells to Sn²⁺ (Fig. 7). The *sod2*Δ single mutant may confer slight but insignificant sensitivity, but when in conjunction with the *sod1* mutant allele it increases the sensitivity of the double mutant significantly (Fig. 7), suggesting that Sod1p can apparently handle some of the Sod2p substrate, thus masking the potential contribution of Sod2p in coping with Sn²⁺-induced oxidative stress. On the other hand, lack of catalase did not impose any Sn²⁺-sensitivity, as the respective *ctl1*Δ mutant had WT-sensitivity (Fig. 7).

4. Discussion

SnCl₂ has been shown to be genotoxic when applied to single cells, be it of mammalian [13,14] or bacterial origin [17,18]. However, up to now mutation induction by SnCl₂ in the genetically well-established test system *S. cerevisiae* has not been described and data on putative DNA-repair of SnCl₂-induced DNA damage has been lacking. Our results clearly show that Sn²⁺ is both toxic and mutagenic in yeast, and that DNA lesions induced by it are repaired by different repair mechanisms.

In order to obtain realistic experimental conditions we had to overcome a Sn²⁺-specific complication that stemmed from the high reactivity of Sn²⁺ ions with the cell's surface, causing cell aggregates of up to 50 cells (Fig. 1; inset, photo). These clumps, however, could be undone by addition of chelating agents, e.g. EDTA or PB plus vortexing, and this procedure led to a realistic

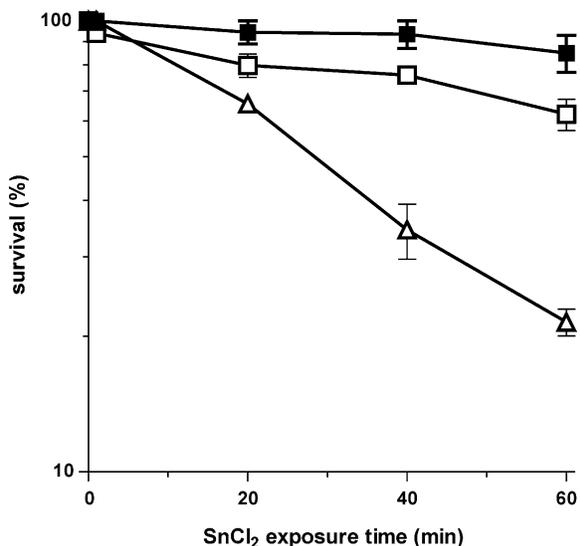


Fig. 6. Growth phase-related sensitivity to Sn^{2+} exposure of haploid strain XV185-14c (RAD). (■) STAT cells exposed to 25 mM; (□) LOG cells exposed to 25 μM ; (Δ) LOG cells exposed to 250 μM SnCl_2 . Cells were diluted in PB.

representation of surviving single cells (Fig. 1). Rapid binding of Sn^{2+} , apparently to poly-anionic polymers of the cell wall and cell capsule of *Streptococcus mutans*, most of it removable by washing with EDTA, has already been reported [33]. Similar processes, involv-

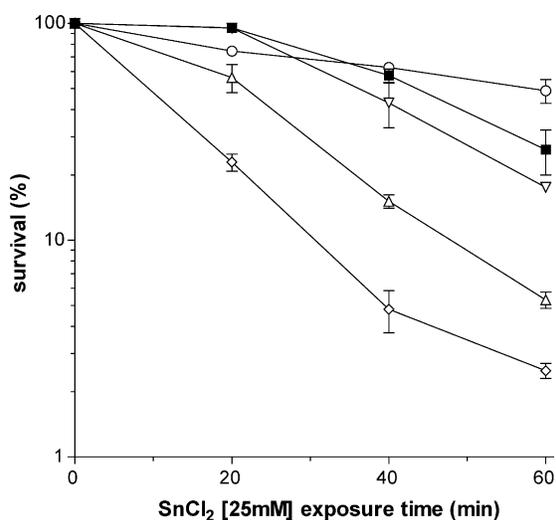


Fig. 7. Sensitivity to 25 mM SnCl_2 of haploid STAT cells of yeast. WT (■); *sod1*Δ (Δ); *sod2*Δ (∇); *sod1*Δ *sod2*Δ (\diamond); *ctt1*Δ (\circ). Cells were diluted in PB.

ing mannoproteins, might occur in Sn^{2+} -induced yeast cell clumping (Viau, unpublished data). This is suggested by the finding that post-treatment protease digestion could undo the clumps as efficiently as EDTA or PB (data not shown). Induction of cell aggregation seems to be a typical characteristic of Sn^{2+} (SnF_2 does likewise), whereas Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} and Cu^{2+} did not induce this (data not shown). These aggregation processes may have contributed to some negative results presented in literature (i.e. *B. subtilis* and *Salmonella* [34,16]) and the only report that SnCl_2 is not genotoxic in yeast [11] might have resulted from an experimental shortcoming, in that SnCl_2 was applied on agar media where several putative chelating agents in the media would neutralize most, if not all, Sn^{2+} -activity. This might also have happened in the *B. subtilis* Rec-assay [10,34] that uses filter disks on agar medium and, therefore these negative results may be questionable.

After correcting for clumping we found that SnCl_2 has significant genotoxic potential as all isogenic DNA repair mutants of *S. cerevisiae* were more sensitive than the WT (Fig. 2). The recombination-deficient *rad52*Δ mutant, unable to repair DNA single- and double-strand breaks [35], was the most sensitive while *rad6*Δ, representing a blocked error-prone repair [36], displayed intermediate Sn^{2+} -sensitivity; mutants *rad2*Δ and *rad4*Δ, both deficient in NER [37], showed only a weak (i.e. less than two-fold) and nearly identical sensitivity response as compared to the isogenic WT (Fig. 1; inset and Fig. 2). The *rad6* mutant showed some variability in its SnCl_2 -sensitivity, perhaps owing to its slow-growth characteristics and tendency to accumulate suppressors [38], and responded to EDTA-treatment with significantly improved survival (Fig. 1) (at the same declumping efficiency as PB). We also want to point out that different WT strains, i.e. EUROSCARF versus XY185-14C differed significantly in SnCl_2 -sensitivity (Figs. 1 and 3). Of seven WT strains tested by us, six fell into two sensitivity groups: three strains, amongst them the EUROSCARF WT, showing around 80% survival (25 mM SnCl_2 , 60 min), while three others, amongst them XV185-14c, had around 35% survival at the same treatment. One, W303, had intermediate sensitivity with a survival at about 55% (data not shown).

The sensitivity ranking of the five isogenic EUROSCARF strains indicates a major repair contribu-

tion of recombinational processes (RAD52 pathway) whereas SnCl₂-induced DNA lesions seem to be a poor substrate for NER. Error-prone repair is clearly involved in lesion removal (Fig. 2) and the observed mutation induction (Figs. 3–5). Gene conversion requires DNA synthesis and during repair of damaged DNA this apparently includes error-prone repair enzymes [39]. Thus, processes associated with translesion synthesis, including the activity of polzeta might be involved, and a homoallelic diploid *rev3* mutant might be a good candidate for testing the putative involvement of polzeta in Sn²⁺-induced mitotic gene conversion.

The yeast *rad52Δ* mutant's specific sensitivity to strand breaks-generating mutagens suggests that SnCl₂ directly or indirectly leads to this type of DNA lesion in yeast as it does in vitro in plasmid DNA [20,21]. Tin chloride-induced DNA oxidation is suggested to cause mutagenicity in bacteria [18,19]; this is confirmed by the high sensitivity of bacterial tester-strains lacking anti-ROS defences (*Salmonella* TA102 and Mutoxitest strain WP203; Table 2). Sn²⁺-induced toxicity can be prevented by ROS scavengers (i.e. thiourea, sodium benzoate and dipyrindyl [40]) as well as by chelating agents (i.e. glucoheptonic acid [41] and EDTA [21]). Our finding that SnCl₂ was mutagenic for strain IC203 and non-mutagenic for IC188 may again indicate oxidative mutagenesis, since both strains have the same genetic background and only differ in that the transcription regulator of many genes involved in the response to oxidants, OxyR is missing in strain IC203 [42]. The fact that H₂O₂ is able to induce a cross-adaptive response against SnCl₂-promoted lethality [43] suggests that OxyR participates, via regulating catalase, alkyl hydroperoxide reductase and superoxide dismutase, in the defense against Sn²⁺-generated ROS. Finally, the about extremely high resistance to Sn²⁺ of STAT cells as compared to LOG cells of the same strain (Fig. 6) may also be due, at least in part, to the maximal expression of anti-ROS defence systems in the former [44].

From Figs. 3 and 4 we can deduce that the *his1-798* missense mutant allele can be reverted by Sn²⁺ much more readily than the *his1-208* chain termination mutant allele of the homozygous diploid, which is also true for spontaneously arising His⁺ revertants in haploids containing these mutant alleles [45]. Mutation induction by Sn²⁺ in these two His reversion systems clearly depends on exposure dose, be it variable expo-

sure time at constant dose (Fig. 3) or variable concentration at constant time (Fig. 4). Treatment with SnCl₂ also induced reversion of a putative frameshift allele (*hom3-10*) and locus-specific reversion of the ochre allele *lys1-1* (Fig. 5) while induction of ochre suppressor mutations was negligible (data not shown). The moderate mutagenicity of Sn²⁺ was achieved at low cytotoxicity so that selection of spontaneous mutants can be ruled out.

The significant mutagenicity of Sn²⁺ in yeast certainly justifies further research as to the types of DNA lesions induced by it and the cellular repair responses elicited. The strong induction of Sn²⁺-resistance during diauxic shift and growth to STAT phase, that leads to a better survival at a 1000-fold higher Sn²⁺ exposure dose (Fig. 6), suggests that cellular defences against ROS, i.e. expression and activity of enzymes not involved in DNA repair, play a much more prominent role in Sn²⁺-resistance than does the DNA repair machinery. This high resistance to oxidative stress is a typical hallmark of resting yeast cells [46]. However, the ratio of metal uptake as well as the metal binding to the outer cell wall (mannoproteins) may vary between LOG and STAT cells and thus might greatly influence sensitivity as well. This question must be addressed and may be answered by molecular dosimetry; with this approach we might be able to determine not only the amount of totally cell-bound Sn²⁺ but also the fraction of the metal ions that passes the cytoplasmic membrane, i.e. that is actually taken up by the cells (LOG versus STAT).

In summary, our results clearly show that Sn²⁺ ions are genotoxic in our pro- and eukaryotic microbial test systems. Tin chloride can thus be defined as a moderate mutagen of low toxicity. Most probably, DNA damage is caused by ROS and is preferentially repaired via recombinational and error-prone processes in haploid and diploid yeast.

Acknowledgements

We thank Dr. Bernardo-Filho for his support and encouragement during the initial phase of the work. Research supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), GENOTOX and Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). C.P. held fellowships by

FAPERJ (2002), CNPq (2003) and is currently supported by FAPESB (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia). M.B. is visiting scientist supported by CNPq/FAPESB.

References

- [1] WHO Food Additives Series, Toxicological Evaluation of Certain Food Additives, No. 17, 1982, pp. 521–553 (on INCHEM).
- [2] J.R. McLean, D.H. Blakey, G.R. Douglas, J.R. Kaplan, The effect of stannous and stannic (tin) chloride on DNA in Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res.* 119 (1983) 195–201.
- [3] J.I. Rader, Anti-nutritive effects of dietary tin, *Adv. Exp. Med. Biol.* 289 (1991) 509–524.
- [4] D.J. White, Return to stannous fluoride dentifrices, *J. Clin. Dentol.* VI (Special issue) (1995) 29–36.
- [5] J.L. Harbert, W.C. Eckelman, R.D. Newman, *Nuclear Medicine Diagnosis and Therapy*, Thieme Medical Publishers, New York, USA, 1996.
- [6] H.A. Schroeder, J.J. Balassa, I.H. Tipton, Abnormal trace metals in man, tin, *J. Chron. Dis.* 17 (1964) 483–502.
- [7] H.C. der Meulen, V.J. Feron, H.P. Til, Pancreatic atrophy and other pathological changes in rats following the feeding of stannous chloride, *Pathol. Eur.* 9 (1974) 185–192.
- [8] H.A. Schroeder, M. Kanisav, V. Frost, Germanium, tin and arsenic in rats, effects on growth, survival, pathological lesions and life span, *J. Nutr.* 96 (1968) 37–45.
- [9] A.P. Groot, V.J. de Feron, H.P. Til, Short-term toxicity studies on some salts and oxides of tin in rats, *Fd. Cosmet. Toxicol.* 11 (1973) 19–30.
- [10] T. Kada, K. Hirano, Y. Shirasu, Screening of environmental chemicals mutagens by the Rec-assay system with *Bacillus subtilis*, in: A. Hollaender, F.J. de Serres (Eds.), *Chemical Mutagens, Principles and Methods, for their Detection*, vol. 6, Plenum, New York, 1980, pp. 149–173.
- [11] I. Singh, Induction of reverse mutation and mitotic gene conversion by some metal compounds in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat. Res.* 117 (1983) 149–152.
- [12] N.K. Tripathy, F.E. Wurgler, H. Frei, Genetic toxicity of six carcinogens and six non-carcinogens in the *Drosophila* wing spot test, *Mutat. Res.* 242 (1990) 169–180.
- [13] J.R. McLean, J.G. Kaplan, The effect of tin on unscheduled and semi-conservative DNA synthesis, in: J.G. Kaplan (Ed.), *The Molecular Basis of Immune Cell Function*, Elsevier Biomedical, Amsterdam, 1979.
- [14] J.R. McLean, H.C. Birnboim, R. Pontefact, J.G. Kaplan, The effect of tin chloride on the structure and function of DNA in human white blood cells, *Chem. Biol. Interact.* 46 (1983) 189–200.
- [15] P. Olivier, D. Marzin, Study of genotoxic potential of 48 inorganic derivatives with the SOS chromotest, *Mutat. Res.* 189 (1987) 263–269.
- [16] J. Ashby, R.W. Tennant, Definite relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP, *Mutat. Res.* 257 (1991) 229–306.
- [17] M. Bernardo-Filho, M.C. Cunha, J.O. Valsa, A. Caldeira-de-Araújo, F.C.P. Silva, A.S. Fonseca, Evaluation of potential genotoxicity of stannous chloride: inactivation, filamentation and lysogenic induction of *Escherichia coli*, *Food Chem. Toxicol.* 32 (1994) 477–479.
- [18] F.C. Silva, A.S. Fonseca, A.S. Corrêa, C.C. Lee, A. Caldeira-de-Araújo, J.O. Valsa, M. Bernardo-Filho, A. Favre, Near UV light protection effect against lethality induced by stannous chloride in *Escherichia coli*, *Microbios* 79 (1994) 241–244.
- [19] R.E. Cabral, A.C. Leitão, C. Lage, A. Caldeira-de-Araújo, M. Bernardo-Filho, F.J.S. Dantas, J. Cabral-Neto, Mutational potentiality of stannous chloride: an important reducing agent in the 99mTc-radio-pharmaceuticals, *Mutat. Res.* 408 (1998) 129–135.
- [20] J.C. Mattos, F.J. Dantas, R.J. Bezerra, M. Bernardo-Filho, J. Cabral-Neto, C. Lage, A.C. Leitão, A. Caldeira-de-Araújo, Damage induced by stannous chloride in plasmid DNA, *Toxicol. Lett.* 116 (2000) 159–163.
- [21] F.J. Dantas, M.O. Moraes, J.C. de Mattos, R.J. Bezerra, E.F. Carvalho, M. Bernardo-Filho, A. Caldeira-de-Araújo, Stannous chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA through reactive oxygen species formation, *Toxicol. Lett.* 110 (1999) 129–136.
- [22] D. Burke, D. Dawson, T. Stearns, *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual CSH Laboratory Press, NY, 2000.
- [23] K. Mortelmans, E. Zeiger, The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.* 455 (2000) 29–60.
- [24] M. Blanco, A. Urios, A. Martínez, New *Escherichia coli* WP2 tester strains highly sensitive to reversion by oxidative mutagens, *Mutat. Res.* 413 (1998) 95–101.
- [25] C. Pungartnik, J. Picada, M. Brendel, J.A.P. Henriques, Further phenotypic characterisation of *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with respect to DNA repair and response to oxidative stress, *Gen. Mol. Res.* 1 (2002) 79–89.
- [26] L. Myers, N. Adams, L. Kier, T.K. Rao, B. Shaw, L. Williams, Microcomputer software for data management and statistical analysis of the Ames/Salmonella test, in: D. Krewski, C.A. Franklin (Eds.), *Statistics in Toxicology*, Gordon and Breach, New York, 1991, pp. 265–279.
- [27] J.N. Picada, A.F. Maris, K. Ckless, M. Salvador, N.N. Khromov-Borsov, J.A.P. Henriques, Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast, *Mutat. Res.* 539 (2003) 29–41.
- [28] D.C. Hawthorne, R.K. Mortimer, Genetic mapping of nonsense suppressors in yeast, *Genetics* 60 (1968) 735–742.
- [29] R.C. von Borstel, K.T. Cain, C.M. Steinberg, Inheritance of spontaneous mutability in yeast, *Genetics* 69 (1971) 17–27.
- [30] R.C. Schuller, Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration, *Mutat. Res.* 24 (1974) 17–23.
- [31] C. Cassier, R. Chanet, J.A.P. Henriques, E. Moustacchi, The effects of the three *PSO* genes on induced mutagenesis: a novel class of mutationally defective yeast, *Genetics* 96 (1980) 841–857.

- [32] I. Machida, S. Nakai, Induction of spontaneous and UV-induced mutations during commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat. Res.* 73 (1980) 59–68.
- [33] A. Attramadala, B. Svaton, Uptake and retention of tin by *S. mutans*, *Acta Odontol. Scand.* 38 (1980) 349–354.
- [34] H. Nishioka, Mutagenic activities of metal compounds in bacteria, *Mutat. Res.* 31 (1975) 185–195.
- [35] M. Kupiec, Damage-induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat. Res.* 451 (2000) 91–105.
- [36] J.C. Game, The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair genes at the end of the century, *Mutat. Res.* 451 (2000) 277–293.
- [37] S.N. Guzder, Y. Habraken, P. Sung, L. Prakash, S. Prakash, Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A, and transcription factor TFIIH, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 12973–12976.
- [38] L. Prakash, The RAD6 gene and protein of *Saccharomyces cerevisiae*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 726 (1994) 267–273.
- [39] J.E. Haber, Recombination: a frank view of exchanges and vice versa, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000) 286–292.
- [40] F.J. Dantas, M.O. Moraes, E.F. Carvalho, J.O. Valsa, M. Bernardo-Filho, A. Caldeira-de-Araujo, Lethality induced by stannous chloride on *Escherichia coli* AB1157: participation of reactive oxygen species, *Food Chem. Toxicol.* 34 (1996) 959–962.
- [41] M.L. Assis, M.R. Caceres, J.C. de Mattos, A. Caldeira-de-Araujo, M. Bernardo-Filho, Cellular inactivation induced by a radio-pharmaceutical kit: role of stannous chloride, *Toxicol. Lett.* 99 (1998) 199–205.
- [42] A. Martínez, A. Urios, M. Blanco, Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in *OxyR*, and its *oxyR*⁺ parent WP2 *uvrA*/pKM101: detection of 31 oxidative mutagens, *Mutat. Res.* 467 (2000) 41–53.
- [43] M.L. Assis, J.C. de Mattos, M.R. Caceres, F.J.S. Dantas, L.M.B.O. Asad, R.J.A.C. Bezerra, N.R. Asad, A. Caldeira-de-Araujo, M. Bernardo-Filho, Adaptive response to H₂O₂ protects against SnCl₂ damage: the OxyR system involvement, *Biochimie* 84 (2002) 291–294.
- [44] A.F. Maris, A.L. Kern, J.N. Picada, F. Boccardi, M. Brendel, J.A.P. Henriques, Glutathione, but not transcription factor Yap1, is required for carbon source-dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* 37 (2000) 175–182.
- [45] R.C. von Borstel, E.A. Savage, Q. Wang, U.G.G. Hennig, R.G. Ritzel, G.S.-F. Lee, M.D. Hamilton, M.A. Chrenek, R.W. Tomaszewski, C.J. Higgins, L. Liviero, P.J. Hastings, C.T. Korch, C.M. Steinberg, Topical reversion at the *HIS1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*—a tale of three mutants, *Genetics* 148 (1998) 1647–1654.
- [46] J.H. DeWinde, J.M. Thevelein, J. Winderickx, Adaptation to nutrient depletion in yeast, in: S. Hohmann, W.H. Mager (Eds.), *Yeast Stress Responses*, Springer, Berlin/Heidelberg/New York, 1997, pp. 7–52.

DISCUSSÃO

Os processos vitais seriam impossíveis na ausência de determinados íons metálicos (Eide 2003; Rutherford e Bird 2004). No entanto, nas sociedades industrializadas, os metais pesados representam um potencial prejudicial à saúde humana (Ikem e Egiebor 2005). Particularmente, o estanho e seus compostos têm despertado o interesse da comunidade científica por estarem presentes em vários segmentos da vida cotidiana (Rüdel 2003; Blunden e Wallace 2003).

A exposição da população ao estanho ocorre, basicamente, através da dieta, pelo consumo de alimentos e líquidos enlatados. Há vários agravantes que ocasionam um contato ainda maior com esse metal: determinados tipos de alimentos, como o tomate enlatado, apresentam uma quantidade maior de estanho por já terem sido expostos a esse metal e seus compostos (utilização de formulações de agrotóxicos com organoestanhados); peixes enlatados também podem conter maior quantidade de estanho em virtude da contaminação das águas com produtos utilizados nos cascos dos navios, barcos e similares a fim de evitar a ação da corrosão (utilização de formulações que contém compostos de estanho) (Tobin e Cooney 1999; Burger *et al.* 2002).

O presente estudo utilizou o cloreto estanoso (SnCl_2) para verificar os tipos de danos que o íon metálico Sn^{2+} gera nos componentes celulares, principalmente em nível do material genético da célula. O primeiro cuidado que se tomou foi em relação ao pH. Sabe-se que, em soluções aquosas, o cloreto estanoso se dissocia e forma o íon Sn^{2+} . A estabilidade dessa espécie iônica é somente em pH abaixo de, aproximadamente, 5 (Pettine *et al.* 1981). Em valores de pH alcalinos, o íon metálico Sn^{2+} forma o composto chamado hidróxido de estanho $\text{Sn}(\text{OH})_2$ que é insolúvel e, por essa razão, não reage com os

componentes celulares (Rüdel 2003). Apenas o Sn^{2+} é capaz de entrar na célula e gerar danos aos seus componentes (McLean *et al.* 1983a).

A espécie iônica Sn^{2+} é mais reativa do que a Sn^{4+} . Quimicamente, o Sn^{2+} pode reagir, em solução aquosa, com os átomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre, enquanto que o Sn^{4+} forma óxidos de estanho insolúveis incapazes de entrar na célula e gerar algum tipo de lesão (McLean *et al.* 1983a).

A alta reatividade da espécie iônica Sn^{2+} foi demonstrada, quando se iniciou o presente estudo, com a pronunciada capacidade que o estanho apresenta de agregar as células da levedura *S. cerevisiae*. Esse fenômeno não é levedura-específico, uma vez que há relatos na literatura de que o estanho agrega células de *Streptococcus mutans* (Attramadal e Svatun 1980) e células sangüíneas humanas (McLean *et al.* 1983a). No teste *Salmonella*/Microsoma e no Mutoxiteste, constatou-se o mesmo fato.

Testaram-se outros íons metálicos (cobalto, cádmio, ferro, cálcio e alumínio) para verificar se as células da levedura se agregavam. Constatou-se que o fenômeno é estanho-específico, já que o fluoreto de estanho igualmente levou as células a apresentar o mesmo comportamento. Estudos estão sendo realizados no nosso laboratório para verificar a interação do estanho com as manoproteínas presentes na parede celular de *S. cerevisiae*, utilizando-se um método físico-químico chamado Infra Vermelho com a Transformante de Fourier (FTIR). Isso porque as manoproteínas são glicoproteínas situadas na superfície mais externa da parede celular, estando essa fração em contato direto com o meio onde a levedura se encontra (Manners *et al.* 1973; Fleet e Manners 1977; Pastor *et al.* 1984; Krizková *et al.* 2001).

Para que todos os experimentos do presente trabalho fossem realizados de uma maneira correta, houve a necessidade de, após o tratamento com o cloreto estanoso nas doses e tempos estabelecidos, remover a fração do estanho que ficou aderida à parede celular e que, conseqüentemente, não foi

absorvida pela célula. Uma remoção inadequada foi observada com a utilização de solução salina (NaCl 0,9%, cloreto de sódio). Nesse caso, o estanho ficou aderido à parede e pôde ser lentamente internalizado na célula, provocando uma toxicidade acentuada (Capítulo I, figura 1).

Quando se utilizou tampão fosfato e EDTA (etilenodiaminotetraacético), a toxicidade e a genotoxicidade puderam ser inferidas corretamente nos ensaios. Por praticidade e custo, ajustou-se a metodologia com tampão fosfato pH 7,4 para cessar a reação e remover a fração do metal que não foi absorvida pela célula, bem como desfazer a agregação das células. Acredita-se que a remoção tenha sido eficiente, e testes posteriores confirmarão essa afirmação. Pretende-se comparar os testes de sobrevivência pré-tratados com protease com a metodologia empregada no trabalho (tampão fosfato) para inferir se os danos que o estanho promove no interior da célula devem-se, exclusivamente, ao metal absorvido durante os tempos propostos, e não a entradas progressivas do metal na célula.

Outro fato que contribuiu para os achados de que o estanho interage fortemente com os componentes da parede celular da levedura e com os componentes de membrana foi a impossibilidade de realização do teste de mutagênese para a frente (*Forward mutation*) (Capítulo I, tabela 3). O ensaio baseia-se na reversão de um fenótipo dominante (homozigoto, heterozigoto ou hemizigoto) sensível à canavanina em um fenótipo recessivo resistente à canavanina. O gene *CAN1* codifica uma arginina permease capaz de importar para a célula tanto arginina quanto canavanina. A canavanina é um análogo tóxico da arginina (para revisão, ver Burke *et al.* 2000).

Quando as células tratadas com cloreto estanofo foram semeadas em meio contendo canavanina, houve uma acentuada toxicidade, e o número absoluto de mutantes contados nas placas decresceu significativamente. Até mesmo os mutantes espontâneos desapareceram. Pensou-se que o fato fosse

intrínseco à linhagem utilizada, mas logo se descartou essa possibilidade, porque se observou o mesmo fato inclusive nas quatro linhagens defectivas nas três principais vias de reparação de danos ao DNA (EUROSCARF) empregadas no estudo. Partiu-se para o controle das placas, tanto da canavanina quanto das concentrações das placas. Fizeram-se placas com 20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL e utilizou-se uma outra fonte de canavanina, mas obteve-se o mesmo resultado.

Sabe-se que, ao ligarem-se às proteínas da membrana, os metais pesados podem modificar canais protéicos ou os receptores de membranas, assim como alterar a permeabilidade e, conseqüentemente, alterar o fluxo de compostos das células (Carpenter 1994; Narahashi *et al.* 1994; Györi *et al.* 2000). O estanho pode entrar na célula e, ao acumular-se, pode competir com íons divalentes endógenos e alterar processos metabólicos intracelulares.

Estudos em ratos demonstraram que o estanho afeta o metabolismo do cálcio (Yamaguchi *et al.* 1982; Hattori *et al.* 2001), e estudos em humanos constataram que o estanho interfere na homeostase do zinco (Johnson *et al.* 1982; Johnson e Greger 1982). Essas interferências nos níveis de metais essenciais para a célula são preocupantes quando se trata de grupos de risco que estão num estado nutricional marginal. Os grupos de risco são idosos (Greger e Sciscoe 1977; Greger 1977), crianças (Hambidge *et al.* 1976) e gestantes (Jameson 1976).

Estudos na levedura *S. cerevisiae* estão sendo idealizados no nosso laboratório para verificar se há a interferência no metabolismo de outros metais essenciais, como o magnésio, ferro e cobre, quando as células são tratadas com estanho. Para tal fim, será utilizado o método físico-químico PIXE (Emissão de Raios X Induzida por Partícula).

Ao analisar a sensibilidade dos mutantes defectivos nas três principais vias de reparação de danos ao DNA, evidenciou-se uma maior

sensibilidade do mutante *rad52Δ* ao estanho quando comparado com os outros mutantes (*rad2Δ*, *rad4Δ*, *rad6Δ*) e com a linhagem selvagem isogênica (BY10000) (Capítulo I, figura 1). Esse mutante é deficiente no mecanismo de reparação recombinacional, sendo incapaz de reparar lesões que geram quebras simples e duplas na estrutura do material genético da célula (Kupiec 2000). Nesse contexto, com a significativa sensibilidade do mutante *rad52Δ*, pôde-se inferir que o tipo de lesão que o estanho causa *in vivo* no DNA são quebras simples e duplas. Dantas *et al.* (1999) e De Mattos *et al.* (2000) já haviam demonstrado *in vitro* que o cloreto estanooso gera quebras em DNA plasmidial.

Sabe-se que o Sn^{2+} pode formar espécies neutras e aniônicas, as quais são ótimas doadoras de elétrons. Essas espécies podem agir diretamente com o DNA e, com isso, clivar as fitas de nucleotídeos. Além disso, o Sn^{2+} pode coordenar com vários átomos (oxigênio, nitrogênio, halogênio), formando compostos covalentes e apresentando um potencial de formar pontes intercadeias (DNA-DNA, DNA-proteína) (McLean *et al.* 1983a,b).

Claramente, a reparação sujeita a erro (Via RAD6) está envolvida na reparação dos danos que o estanho induz. Isso porque o mutante *rad6Δ* apresentou uma sensibilidade intermediária ao estanho. O envolvimento dessa via corrobora a mutagenicidade observada na levedura *S. cerevisiae* (Capítulo I, figuras 3-5). Nota-se, também, que os tipos de lesões provocadas pelo cloreto estanooso são um fraco substrato para as proteínas envolvidas na via de reparação por excisão de nucleotídeos. Tanto o mutante *rad2Δ* quanto o *rad4Δ* apresentaram uma sensibilidade baixa ao Sn^{2+} e similar à da linhagem selvagem (Capítulo I, figura 1).

A recombinação mitótica é um dos mecanismos usados pelas células para reparar os danos ao DNA, restaurando a integridade do mesmo, e que requer a participação das enzimas envolvidas na reparação sujeita a erros (Via RAD6) (Haber 2000). Logo, a participação dessa via, juntamente com a reparação

recombinacional, é justificada pelo fato de o SnCl_2 ser um agente convertogênico (Capítulo I, figura 5). O tipo de recombinação mitótica que o estanho promove é a conversão gênica (troca não recíproca de informação genética). A recombinação mitótica do tipo permuta ou *crossingover* (troca recíproca de informação genética) praticamente não foi observada nas doses estabelecidas no estudo (Capítulo I, tabela 4).

Singh (1983) não detectou o poder convertogênico e mutagênico do SnCl_2 na concentração de 100 mM. Contudo, a realização do seu estudo diferiu do presente trabalho, uma vez que a análise foi qualitativa e foram utilizados discos embebidos com cloreto estanoso colocados diretamente nas placas com o meio de cultura. Pode ter ocorrido o mascaramento da atividade do SnCl_2 por agentes que seqüestram metais, presentes no meio de cultura. Observa-se a importância da utilização de uma metodologia correta, bem como da eliminação de fatores que possam mascarar a atividade tóxica e genotóxica de um determinado agente estudado.

O SnCl_2 foi mutagênico para a linhagem IC203, que não apresenta o fator de transcrição OxyR, responsável pela regulação da transcrição de vários genes envolvidos na resposta a agentes oxidativos (Blanco *et al.* 1998; Martinez *et al.* 2000), bem como para a linhagem TA102 de *S. typhimurium*, que detecta mutágenos oxidativos e agentes alquilantes. Portanto, esses achados corroboram a idéia de que o íon Sn^{2+} apresenta um poder de formar pontes intercadeias no DNA e de produzir espécies reativas de oxigênio (Capítulo I, tabela 2).

Os resultados encontrados no presente trabalho confirmaram os resultados demonstrados por Silva *et al.* (1994) e por Cabral *et al.* (1998). O Sn^{2+} promoveu danos oxidativos, produzindo, de uma maneira indireta, espécies reativas de oxigênio. Esse fato é de suma importância, uma vez que os danos oxidativos têm sido relacionados a doenças neurodegenerativas, problemas na

circulação sangüínea, câncer e envelhecimento precoce (Ames *et al.* 1993; Stohs e Bagchi 1995; Silva *et al.* 2002).

A significativa sensibilidade do mutante *sod1Δ* sugeriu a formação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) após o tratamento com o $SnCl_2$. A maior sensibilidade do duplo mutante (*sod1Δsod2Δ*) em relação à do simples mutante *sod1Δ* (Capítulo I, figura 7) demonstrou que a proteína superóxido dismutase mitocondrial Sod2 também tem uma participação na proteção contra os danos oxidativos gerados pelo $SnCl_2$.

O fato de o simples mutante *ctt1Δ* ter apresentado praticamente a mesma sensibilidade da linhagem selvagem quando exposto ao $SnCl_2$ (Capítulo I, figura 7) indica que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi formado apenas pela reação de dismutação do ânion superóxido ($2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \Rightarrow O_2 + H_2O_2$), catalisada pela proteína superóxido dismutase. Para confirmar a não participação da enzima catalase citosólica (catalase T, Ctt1p) e, por conseguinte, a não formação de peróxido de hidrogênio, seria interessante testar, em estudos posteriores, a sensibilidade do mutante *cta1Δ*. O gene *CTA1* codifica a proteína catalase A (catalase peroxissomal) e, igualmente, dismuta H_2O_2 .

A sensibilidade mais acentuada ao $SnCl_2$ foi observada quando as células estavam em metabolismo fermentativo (fase logarítmica ou exponencial). Nessa fase, as células mostraram-se mil vezes mais sensíveis ao estanho do que quando em metabolismo respiratório (sensibilidade calculada com base na dose de exposição necessária para obter uma mesma curva de sobrevivência) (Capítulo I, figura 6).

Sabe-se que as células adquirem resistência a compostos que geram danos oxidativos durante e logo após a fase diáuxica. É quando as células são desreprimidas (desrepressão catabólica), e as funções celulares são adaptadas ao metabolismo respiratório (Maris *et al.*, 2000). Independentemente

dos mecanismos de reparação e das enzimas ligadas a danos oxidativos, há uma maior contribuição do estado fisiológico (metabólico) da célula para a resistência ao estanho.

Cogita-se a possibilidade de ocorrer uma diferença na captação do íon metálico Sn^{2+} quando as células estão em metabolismo fermentativo e respiratório. Através de uma análise quantitativa, utilizando o método PIXE (Emissão de Raios X Induzida por Partícula), poderá ser verificado se há uma maior eficiência de captação do metal quando as células estão em crescimento devido à maior ativação dos transportadores de membrana.

O fato do íon metálico Sn^{2+} ser um agente mutagênico moderado e de baixa citotoxicidade não significa que se pode, indiscriminadamente, utilizá-lo ou assumi-lo como seguro.

CONCLUSÕES

1.1 Conclusão geral

Com este estudo, conclui-se que o cloreto estanoso é um agente genotóxico e que pode ser definido como sendo um agente mutagênico moderado de baixa toxicidade. Além disso, os danos que o íon metálico Sn^{2+} gera ao DNA são causados pela formação de espécies reativas de oxigênio podendo resultar em quebras na estrutura do material genético.

1.2 Conclusões específicas

- ✓ Os testes realizados em organismos procarióticos, *Salmonella/Microsoma* e Mutoxiteste indicam que o SnCl_2 causa danos oxidativos à célula;
- ✓ O alto poder agregante do íon metálico Sn^{2+} e a impossibilidade de realização do teste de mutação para a frente (*forward mutation*) sugerem uma alta afinidade desse íon com os componentes da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ O SnCl_2 é um agente mutagênico e convertogênico em *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ O SnCl_2 não induz recombinação mitótica do tipo permuta ou *crossingover* em *Saccharomyces cerevisiae*;
- ✓ Tanto a toxicidade quanto a genotoxicidade do SnCl_2 apresentam um perfil dose e tempo dependentes;

- ✓ O simples mutante *sod1Δ* e o duplo mutante *sod1Δsod2Δ* de *Saccharomyces cerevisiae* foram sensíveis ao SnCl₂, sugerindo a formação do ânion superóxido (O₂⁻);
- ✓ As células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em metabolismo fermentativo são extremamente sensíveis ao SnCl₂ quando comparadas ao metabolismo respiratório;
- ✓ O mutante *rad52Δ* é o mais sensível ao SnCl₂ quando comparado com os outros mutantes de outras vias de reparação do estudo, o que permite inferir que o Sn²⁺ causa quebras simples e duplas no DNA;
- ✓ A moderada sensibilidade dos mutantes *rad2Δ* e *rad4Δ*, bem como a do mutante *rad6Δ*, sugerem a participação da via de reparação por excisão de nucleotídeos e da via sujeita a erros na remoção dos danos provocados pelo SnCl₂.

PERSPECTIVAS

Para melhor compreender como o íon metálico Sn^{2+} age, primeiramente, com os componentes da parede celular e, posteriormente, com o material genético da célula, faz-se necessário aprofundar os estudos, realizando:

- ✓ Análises com métodos físico-químicos aplicados à microbiologia que permitam analisar interações de metais com os componentes da célula. A espectroscopia no Infra Vermelho com a Transformante de Fourier (FTIR) é capaz de prover essa informação;
- ✓ Estudos que esclareçam quais são os metais essenciais que estão sendo descompensados com a presença do estanho. A espectroscopia por Emissão de Raios X Induzida por partículas (PIXE) pode fornecer esse dado;
- ✓ Análises que possam contribuir com as informações iniciais obtidas neste trabalho de que o estanho induz danos oxidativos. Nesse sentido, genes envolvidos na proteção contra o estresse oxidativo em levedura poderiam ser estudados, tais como: *GSH1* (envolvido na biossíntese da glutatona) e *YAP1/YAP2* (fator de transcrição que regula a síntese de enzimas envolvidas nas respostas a danos oxidativos), dentre outros;
- ✓ Estudos moleculares que possam elucidar quais as proteínas que estão sendo expressas quando as células de levedura são tratadas com SnCl_2 , empregando metodologias de macro e/ou microarranjos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abia - Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação, 1998. Portaria No. 685, Serviço de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde. <http://www.abia.org.br/> Acessado em 29 de agosto de 2005.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 7915-7922, 1993.

ARIAS, M.; PÉREZ-NOVO, C.; OSORIO, F.; LÓPEZ, E.; SOTO, B. Adsorption and desorption of copper and zinc in the surface layer of acid soils. **J. Colloid. Interface Sci.**, v. 288, p. 21-29, 2005.

ASHBY, J.; TENNANT, R.W. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. **Mutat. Res.**, v. 257, p. 229-306, 1991.

ATKIN, A.L.; RIAZI, M.A.; GREER, C.L.; ROY, K.L.; BELL, J.B. The functional analysis of nonsense suppressors derived from in vitro engineered *Saccharomyces cerevisiae* tRNA (Trp) genes. **Genes**, v. 134, p. 57-65, 1993.

ATTRAMADAL, A.; SVATUN, B. Uptake and retention of tin by *S. mutans*. **Acta Odontol. Scand.**, v. 38, p. 349-354, 1980.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E. MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (eds.) **Curr. Protocols in Mol. Biol.**, New York: Wiley, 1995.

BARAJAS-ACEVES, M. Comparison of different microbial biomass and activity measurement methods in metal-contaminated soils. **Bioresour. Technol.**, v. 96, p. 1405-1414, 2005.

BARNES, J.M.; STONER, H.B. The toxicology of tin compounds. **Pharmacol. Rev.**, v. 11, p. 211-231, 1959.

BENOY, C.J.; HOOPER, P.A.; SCHNEIDER, R. The toxicity of tin in canned fruit juices and solid foods. **Food Cosmet. Toxicol.**, v. 9, p. 645-656, 1971.

BERNARDO-FILHO, M.; CUNHA, M.C.; VALSA, J.O.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; SILVA, F.C.P.; FONSECA, A.S. Evaluation of potential genotoxicity of stannous chloride: inactivation, filamentation and lysogenic induction of *Escherichia coli*. **Food Chem. Toxicol.**, v. 32, p. 477-479, 1994.

BLANCO, M.; URIOS, A.; MARTÍNEZ, A. New *Escherichia coli* WP2 tester strains highly sensitive to reversion by oxidative mutagens. **Mutat. Res.**, v. 413, p. 95-101, 1998.

BLUNDEN, S.; WALLACE, T. Tin in canned food: a review and understanding of occurrence and effect. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 1651-1662, 2003.

BOEIRA, J.M.; VIANA, A.F.; PICADA, J.N.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxic and recombinogenic activities of the β -carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 500, p. 39-48, 2002.

BOER, J.; HOEIJMAKERS, I.H.J. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 453-460, 2000.

BOOGAARD, P.J.; BOISSET, M.; BLUDEN, S.; DAVIES, S.; ONG, T.J.; TAVERNE, J.P. Comparative assessment of gastrointestinal irritant potency in man of tin(II) chloride and tin migrated from packaging. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 1663-1670, 2003.

BRENDEL, M.; BONATTO, D.; STRAUSS, M.; REVERS, L.F.; PUNGARTNIK, C.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. Role of PSO genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 179-193, 2003.

BRENDEL, M. HENRIQUES, J.A.P. The *pso* mutants *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. **Mutat. Res.**, v. 489, p. 79-96, 2001.

BRUINS, M.R.; KAPIL, S.; OEHME, F.W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 45, p. 198-207, 2000.

BUDAVARI S. Tin. **The Merck Index** - An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th edition. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 1985, 2001.

BUDD, M.E.; CAMPBELL, J.L. Interrelationships between DNA repair and DNA replication. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 241-255, 2000.

BURBA, J.V. Inhibition of hepatic azo-reductase and aromatic hydroxylase by radiopharmaceuticals containing tin. **Toxicol. Lett.**, v. 18, p. 269-272, 1983.

BURGER, J.; GAINES, K.F.; SHANE BORING, C.; STEPHENS, W.L.; SNODGRASS, J.; DIXON, C.; McMAHON, M.; SHUKLA, S.; SHUKLA, T.; GOCHFELD, M. Metal levels in fish from the Savannah river: potential hazards to fish and other receptors. **Environ. Res.**, v. 89. p. 85-87, 2002.

BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, T. **Methods in yeast genetics**, Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual, CSH Laboratory Press, NY, 2000.

CABRAL, R.E.C.; LEITÃO, A.C.; LAGE, C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; BERNARDO-FILHO, M; DANTAS, F.F.S.; CABRAL-NETO, J. Mutational potentiality of stannous chloride: an important reducing agent in the ^{99m}Tc-radiopharmaceuticals. **Mutat. Res.**, v. 408, p. 129-135, 1998.

CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; DANTAS, F.J.S.; MORAES, M.O.; FELZENSZWALB, I.; BERNARDO-FILHO, M. Stannous chloride participates in the generation of reactive oxygen species. **J. Braz. Assoc. Adv. Sci.**, v. 48, p. 109-113, 1996.

CALLOWAY, D.H.; MCMULLEN, J.J. Fecal excretion of iron and tin by men fed stored canned foods. **Am. J. Clin. Nutrition**, v. 18, p. 01-05, 1966.

CAPAR, S.G.; BOYER, K.W. Multielement analysis of food stored in their opened cans. **J. Food Safety**, v. 2, p. 105-119, 1980.

CARPENTER, D.O. The public health significance of metal neurotoxicity. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 14, p. 591-597, 1994.

CHIBA, M.; SHINOHARA, A. Inhibition of erythrocyte 5-aminolaevulinate hydrolyase activity by tin and its prevention by selenite. **Br. J. Ind. Med.**, v. 49, p. 355-358, 1992.

CHIBA, M.; OGIHARA, K.; INABA, Y.; NISHIMA, T.; KIKUCHI, M. The organ distribution of tin and the effect of tin on concentrations of several essential elements in rabbit. **Toxicology**, v. 31, p. 23-32, 1984.

CHMIELNICKA, J.; ZAREBA, G.; GRABOWSKA, U. Protective effect of zinc on heme biosynthesis disturbances in rabbits after administration per os of tin. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 24, p. 266-274, 1992.

CHMIELNICKA, J.; SZYMANSKA, J.A.; SNIEC. Distribution of tin in the rat and disturbances in the metabolism of zinc and copper due to repeated exposure to SnCl₂. **Arch. Toxicol.**, v. 47, p. 263-268, 1981.

CORBIN, H.B. Rapid and selective pyrocatechol violet method for tin. **Anal. Chem.**, v. 45, p. 534-537, 1973.

DACH, J.; STARMANS, D. Heavy metals balance in Polish and Dutch agronomy: actual state and previsions for the future. **Agri. Ecosyst. Environ.**, v. 107, p. 309-316, 2005.

DANTAS, F.J.S.; MORAES, M.O.; DE MATTOS, J.C.P.; BEZERRA, R.J.A.C.; CARVALHO, E.F.; BERNARDO-FILHO, M.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Stannous

chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA through reactive oxygen species formation. **Toxicol. Lett.**, v. 110, p. 129-136, 1999.

DANTAS, F.J.S.; MORAES, M.O.; CARVALHO, E.F.; VALSA, J.O.; BERNARDO-FILHO, M.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Lethality induced by stannous chloride on *Escherichia coli* AB1157: participation of reactive oxygen species. **Food Chem. Toxicol.**, v. 34, p. 959-962, 1996.

DE GROOT, A.P.; FERON, V.J.; TIL, H.P. Short-term toxicity studies on some salts and oxides of tin in rats. **Fd. Cosmet. Toxicol.**, v. 11, p. 19-30, 1973.

DE MATTOS, J.C.P.; DANTAS, F.J.S.; BEZERRA, R.J.A.C.; BERNARDO-FILHO, M.; CABRAL-NETO, J.B.; LAGE, C.; LEITÃO, A.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Damage induced by stannous chloride in plasmid DNA. **Toxicol. Lett.**, v. 116, p. 159-163, 2000.

DE VRIES, S.; MARRES, C.A.M. The mitochondrial respiratory chain of yeast structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 895, p. 205-239, 1988.

DREFF-VAN DER MEULEN, H.C.; FERON, V.J.; TIL, H.P. Pancreatic atrophy and other pathological changes in rats following the feeding of stannous chloride. **Path. Europ.**, v. 9, p. 185-192, 1974.

DUDÁS, A.; CHOVANEC, M. DNA double-strand break repair by homologous recombination. **Mutat. Res.**, v. 566, p. 131-167, 2004.

DUDÁSOVÁ, Z.; DUDÁS, A.; CHOVANEC. Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, p. 581-601, 2004.

EIDE, D. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Nutr.**, v. 133, p. 1532-1535, 2003.

- EIDE, D.J. Functional genomics and metal metabolism. **Genome Biol.**, v. 2, p. 1028.1-1028.3, 2001.
- EIDE, D.J.; GUERINOT, M.L. Metal ion uptake in eukaryotes: research on *Saccharomyces cerevisiae* reveals complexity and insights about other species. **ASM News**, v. 63, p. 199-205, 1997.
- EISEN, J.A.; HANAWALT, P.C. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. **Mutat. Res.**, v. 435, p. 171-213, 1999.
- FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 26, p. 100-117, 1996.
- FISCHER, H.; ZIMMERMAN, G.R. Long retention of stannic oxide. Lack of tissue reaction in laboratory animals. **Arch. Pathol.**, v. 88, p. 259-264, 1969.
- FLEET, G.H.; MANNERS, D.J. Enzymic degradation of an alkali-soluble glucan cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 98, p. 315-327, 1977.
- FOURY, F.; ROGANTI, T.; LECRENIER, N.; PURNELLE, B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 440, p. 325-331, 1998.
- FRIEDBERG, E.C. How nucleotide excision repair protects against cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 1, p. 22-23, 2001.
- FRIEDBERG E.C.; WALKER, G.C. SIEDE, W. **DNA repair and mutagenesis**. Washington, DC: ASM Press, USA, 1995.
- FRIEDBERG E.C. **DNA repair**. Ron Newcomer & Associates, San Francisco, USA. 1991.

FRITSCH, P.; DE SAINT BLANQUAT, G.; DERACHE, R. Nutritional and toxicological study of rats fed a diet containing tin. **Toxicology**, v. 8, p. 165-175, 1977.

FUGE, E.F.; WERNER-WASHBURNE, M.; Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: HOHMANN, S.; MAGER, W.H. (eds). **Yeast stress responses**. New York: Springer, 1997.

GADD, G.M. Microbial metal transformations. **J. Microbiol.**, v. 39, p. 83-88, 2001.

GAME, J.C. The *saccharomyces* repair genes at the end of the century. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 277-293, 2000.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 563-567, 1996.

GREGER, J.L.; BAIER, M. Tin and iron content of canned and bottled food. **J. Food Sci.**, v. 46, p. 1751-1765, 1981.

GREGER, J.L.; JOHNSON, M.A. Effect of dietary tin on zinc. Copper and iron utilization by rats. **Food Cosmet. Toxicol.**, v. 19, p. 163-166, 1981.

GREGER, J.L.; SCISCOE B.S. Zinc nutriture of elderly participants in an urban feeding program. **J. Am. Dietet. Assoc.**, v. 70, p. 37-41, 1977.

GREGER, J.L. Dietary intake and nutritional status in regard to zinc of institutionalized aged. **J. Gerontol.**, v. 32, p. 549-553, 1977.

GILLESPIE, G. Y.; BARTH, R. F.; GOBUTTY, A. Labeling of mammalian nucleated cells with ^{99m}Tc. **J. Nucl. Med.** v. 14, p. 706-708, 1973.

GYÖRI, J.; PLATOSHYN, O.; CARPENTER, D.O.; SALÁNKI, J. Effect of inorganic tin compounds on Ach- and voltage-activated Na currents. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 20, p. 591-604, 2000.

HABER, J.E. Recombination: a frank view of exchanges and vice versa. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 12, p. 286-292, 2000.

HALLAS, L.E.; COONEY, J.J. Tin and tin-resistant microorganisms in Chesapeake Bay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 41, p. 446-471, 1981.

HAMASAKI, T.; SATO, T.; NAGASE, H.; KITO, H. The mutagenicity of organotin compounds as environmental pollutants. **Mutat. Res.**, v. 300, p. 265-271, 1993.

HAMBIDGE, K.M.; WALRAVENS, P.A.; BROWN, R.M.; WEBSTER, J.; WHITE, S.; ANTHONY, M.; ROTH, M.L. Zinc nutrition of preschool children in the Denver Head Start program. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 29, p. 734-738, 1976.

HAMILTON, E.I.; MINSKI, M.J.; CLEARLY, J.J. The concentration and distribution of some stable elements in healthy human tissues from the United Kingdom: an environmental study. **Sci. Total Environ.**, v. 1, p. 341-374, 1972.

HATTORI, T.; MAEHASHI, H.; MIYAZAWA, T.; NAITO, M. Potentiation by stannous chloride of calcium entry into osteoblastic MC3T3-E1 cells through voltage-dependent L-type calcium channels. **Cell Calcium**, v. 30, p. 67-72, 2001.

HAWTHORNE, D.C. LEUPOLD, U. Current topics in microbiology and immunology. Springer Verlag, Berlin, 1974.

HENRIQUES, J.A.P.; BROZMANOVA, J.; BRENDEL, M. Role of *PSO* genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v. 39, P. 185-196, 1997.

- HENRIQUES, J.A.P.; BRENDDEL, M. The role of *PSO* and *SNM* genes in DNA repair of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 18, p.387-393, 1990.
- HILES, R.A. Absorption, distribution and excretion of inorganic tin in rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 27, p. 366-379, 1974.
- HIETER, P.; BASSETT, D.E.J.; VALLE, D. The yeast genome-a common currency. **Nat. Genet.**, v. 13, p. 253-255, 1996.
- HOEIJMAKERS, J.H.J. Nucleotide excision repair I: from *E. coli* to yeast. **Trends Genet.**, v. 9, p. 173-177, 1993a.
- HOEIJMAKERS, J.H.J. Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. **Trends Genet.**, v. 9, p. 211-217, 1993b.
- IKEM, A.; EGIEBOR, N.O. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). **J. Food Compos. Anal.**, v. 18, P. 771-787, 2005.
- JAMESON, S. Effects of zinc deficiency in human reproduction. **Acta Med. Scand.**, v. 593, p. 1-80, 1976.
- JESUS, J.B.; LOPES, A.H.C.S.; MEYER-FERNANDES. Characterization of an ecto-ATPase of *Tritrichomonas foetus*. **Vet. Parasitol.**, v. 103, p. 29-42, 2002.
- JI, G.; SILVER, S. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. **J. Ind. Microbiol.**, v. 14, p. 61-75, 1995.
- JOHNSON, M.A.; GREGER, J.L. Effects of dietary tin on tin and calcium metabolism of adult males. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 35, p. 655-660, 1982.
- JOHNSON, M.A.; BAIER, M.J.; GREGER, J.L. Effects of dietary tin on tin on zinc, copper, iron, manganese and magnesium metabolism of adult males. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 35, p. 1332-1338, 1982.

KADA, T.; HIRANO, K.; SHIRASUY. In **Chemical Mutagens**. Principles and Methods for their Detection. Plenum Press, New York, p. 149-173, 1980.

KASPRZAK, K.S. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 32, p. 958-967, 2002.

KEHOE, R.A.; CHOLAK, J.; STORY, R.V. A spectrochemical study of the normal ranges of concentration of certain trace metals in biological materials. **J. Nutr.**, v. 19 p. 579-592, 1940.

KERN, A.L.; BONATTO, D.; DIAS, J.F.; YONEAMA, M-L.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. The function of Alr1p of *Saccharomyces cerevisiae* in cadmium detoxification: insights from phylogenetic studies and particle-induced X-ray emission. **BioMetals**, v. 18, p. 31-41, 2004.

KERN, A.L.; BONATTO, D.; DIAS, J.F.; YONEAMA, M-L.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. The importance of yeast Alr proteins in cadmium detoxification as indicated by particle-induced x-ray emission and phenotypic analyses. **X-ray Spectrom.**, v. 34, p. 355-358, 2005.

KRIZKOVÁ, L.; DURACKOVÁ, Z.; SANDULA, J.; SASINKOVÁ, V.; KRAJCOVIC, J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. **Mutat. Res.**, v. 497, p. 213-222, 2001.

KUPIEC, M. Damage induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 91-105, 2000.

KUTZNER, J.; BROD, K.H. Studies on absorption and secretion of tin following oral administration ^{113}Sn . **Nucl. Med.**, v. 10, p. 286-297, 1971.

LABORDE, N.P.; LACHANT, N.A.; TOMODA, A.; CHAN, M.H.; TANAKA, K.R. Effect of triethyltin on enzyme activity in human adult and cord red cells, **Enzyme**, v. 35, p. 87-95, 1986.

LEHMANN, A.R. Replication of UV-damage DNA: new insights into links between DNA polymerases, mutagenesis and human disease. **Gene**, v. 253, p. 1-12, 2000.

LUFF, A.P.; METCALFE, G.H. Four cases of tin poisoning caused by tinned cherries. **Br. Med. J.**, v. 1, p. 833-834, 1990.

MACDIARMID, C.W.; GARDNER, R.C. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 1727-1732, 1998.

MACHIDA, I.; NAKAI, S. Induction of spontaneous and UV-induced mutations during commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 73, p. 59-68, 1980.

MANNERS, D.J.; MASSON, A.J.; PATTERSON, J.C. Structure of a beta-(1-3)-d-glucan from yeast cell walls. **Biochem. J.**, v. 135, p. 19-36, 1973.

MARIS, A.F.; KERN, A.L.; PICADA, J.N.; BOCCARDI, F.; BRENDDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Glutathione, but not transcription factor Yap1, is required for carbon source-dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.** v. 37, p. 175-182, 2000.

MARTÍNEZ, A.; URIOS, A.; BLANCO, M. Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in OxyR, and its oxyR⁺ parent WP2 *uvrA*/pKM101: detection of 31 oxidative mutagens. **Mutat. Res.**, v. 467, p. 41-53, 2000.

MAYHEW, R.R.; BROWN, L.R. Comparative effect of SnF₂, NaF, and SnCl₂ on the growth of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, v. 60, p. 1809-1814, 1981.

MCLAUGHLIN, M.J.; JAMES, T.R. Effect of phosphorus supply to the surface roots of wheat on root extension and rhizosphere chemistry in an acidic subsoil. **Plant and Soil**, v.134, p.73-82, 1991.

MCLEAN, J.R.N.; BLAKEY, D.H.; DOUGLAS, G.R.; KAPLAN, J.G. The effect of tin chloride on the structure and function of DNA in human white blood cells. **Chem. Biol. Interact.**, v. 119, p. 195-201, 1983a.

MCLEAN, J.R.N.; BIRNBOIM, H.C.; PONTEFACT, R.; KAPLAN, J.G. The effect of stannous and stannic (tin) chloride on DNA in Chinese hamster ovary cells. **Mutat. Res.**, v. 119, p. 195-201, 1983b.

MELO, A.A.; QUEROL, C.B.; HENRIQUES, A.T.; HENRIQUES, J.A.P. Cytostatic, cytotoxic and mutagenic effects of vincristine and indole alkaloid in wild-type and repair-deficient yeasts. **Mutat. Res.**, v. 171, p. 17-24, 1986.

MORENO, P.R.H.; VARGAS, V.M.F.; ANDRADE, H.H.R.; HENRIQUES, A.T.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. **Mutat. Res.**, v. 260, p. 145-152, 1991.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 29-60, 2000.

MOUSTACCHI, E. **DNA repair in yeast**: genetic control and biological consequences, In: Advances in radiation research. New York: Academic Press, 1987.

MOUSTACCHI, E.; FAVAUDON, V.; BISAGNI, E. Likelihood of the new antitumoral drug 10-[γ -diethylaminopropylamino]-6methyl-5H-pyrido[3',4':4,5]pyrrolo[2,3-g]isoquinoline (BD-40), a pyridopyrroloisoquinoline derivate, to induced DNA strand breaks in vivo and its nonmutagenicity in yeast. **Cancer Res.**, v. 43, p. 3700-3706, 1983.

NARAHASHI, T.; MA, J.Y.; ARAKAWA, O.; REUVENY, E.; NAKAHRO, M. GABA receptor channel complex as a target site of mercury, copper, zinc and lanthanides. **Cel. Mol. Neurobiol.**, v. 14, p. 599-621, 1994.

NICKOLOFF, J.A.; HOEKSTRA, M.F. **DNA Damage and Repair**. Totowa, New Jersey: Human Press, 1998.

NIEBOER, E.; RICHARDSON, D.H.S. The replacement of nondescript term "heavy metal" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. **Environ. Pollution**, v. 1, p. 3-26, 1980.

NIES, D.H. Microbial heavy-metal resistance. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, p. 730-750, 1999.

NIES, D.H.; SILVER, S. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. **J. Ind. Microbiol.**, v. 14, p. 186-199, 1995.

NISHIOKA, H. Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. **Mutat. Res.**, v. 31, p. 185-191, 1975.

OLIVARIUS, F.F.; BALSLEV, E., MENNÉ, T. Skin reactivity to tin chloride and metallic tin. **Contact Derm.**, v. 29, p. 110-111, 1993.

OLIVIER, P.; MARZIN, D. Study of the genotoxic potential of 48 inorganic derivatives with the SOS chromotest. **Mutat. Res.**, v. 189, p. 263-269, 1987.

PARRY, E.M. PARRY, J.M. **The assay of genotoxicity of chemicals using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae***. In: Mutagenicity testing: A practical approach, Venitt, S.; Parry, S.M. (Eds), ORL Press, Oxford, Washington DC, 1984.

PASQUAL, M.S.; LAUER, C.P.; MOYNA, P.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of the isoquinoline alkaloid berberine in prokariotic and eukariotic organisms. **Mutat. Res.**, v. 286, p. 243-252, 1993.

PASTOR, F.I.J.; VALENTIN, E.; HERRERO, E.; SENTANDREU, R. Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannoproteins released by zymolyase and their contribution to wall architecture. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 802, p. 292-300, 1984.

PAULA-RAMOS, A.L.L.; QUEROL, C.B.; MARQUES, E.K.; HENRIQUES, J.A.P. Cytotoxic activation of the pyrrolizidine alkaloid integerrimine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is caused by repairable DNA damage. **Rev. Bras. Genet.**, v.14, p. 897-912, 1991.

PEÑA, M.M.O.; LEE, J.; THIELE, D.J. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1251-1260, 1999.

PETES, T.D.; MALONE, R.E.; SYMINGTON, L.S. Recombination in yeast, in: J.R. Braach, J.R. Pringle, E.W. Jones (Eds) Molecular and Celular Biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plain-view, N.Y., 1991.

PETTINE, M.; MILLERO, F.J.; MACCHI, G. Hydrolysis of tin (II) in aqueous solutions. **Anal. Chem.**, v. 53, p. 1039-1043, 1981.

PÉTURSSON, S. New evidence for the mechanism of the tin(II) chloride catalyzed reactions of vicinal diols with diazodiphenylmethane in 1,2-dimethoxyethane. **Carbohydr. Res.**, v. 331, p. 239-245, 2001.

PICADA, J.N.; ROESLER, R.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxic, neurotoxic and neuroprotective activities of apomorphine and its oxidized derivative 8-oxo-apomorphine. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 477-486, 2005.

POLI, P.; BUSCHINI, A.; CANDI, A.; ROSSI, C. Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochrome P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutagenesis**, v. 14, p. 233-238, 1999.

PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Nucleotide excision repair in yeast. **Mutat. Res.**, v. 451, p. 13-24, 2000.

QUEIROZ, R.C.B.; SILVA SANTOS, L.M.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. Cytochemical localization of enzyme markers in *Tritrichomonas foetus*. **Parasitol. Res.**, v. 77, p. 561-566, 1991.

QUEVAUVILLER, P.; BRUCHET, A.; DONARD, O.F.X. Leaching of organotin compounds from poly(vinyl chloride) (PVC) material. **Appl. Organometallic Chem.**, v. 5, p. 125-129, 1991.

RADER, J.I. Anti-nutritive effects of dietary tin. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 289, p. 509-524, 1991.

RENSING, C.; GHOSH, M.; ROSEN, B. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 5891-5897, 1999.

RITCHEY, K.D.; SILVA, J.E.; COSTA, V.F. Calcium deficiency in clayey B horizons of savannah oxisols. **Soil Science**, v.133, p.378-382, 1982.

RÖLLA, G.; AMSBAUGH, S.M.; MONELL-TORRENS, E., ELLINGSEN, J-E; AFSETH, J.; CIARDIJ.E.; BOWEN, W.H. Effect of topical application of stannous fluoride, stannous chloride and stannous tartrate on rat caries. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 91, p. 351-355, 1983.

ROSA, R.M.; SULZBACHER, K.; PICADA, J.N.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. **Mutat. Res.**, v. 563, p. 107-115, 2004.

RÜDEL, H. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 56, p. 180-189, 2003.

RUTHERFORD, J.C.; BIRD, A.J. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. **Eukaryot. Cell**, v. 3, p. 1-13, 2004.

SANSONOWICZ, C.; SMYTH, T.J. Effects of hydrogen on soybean root growth in a subsurface solution. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.255-261, 1995.

SAVOLAINEN, H.; VALKOMEN, S. Dose-dependent brain tin concentration in rats given stannous chloride in drinking water. **Toxicol. Lett.**, v. 30, p. 35-39, 1986.

SCHROEDER, H.A.; BALASSA, J.J.; TRIPTON, I.H. Abnormal trace metals in man: tin. **J. Chron. Dis.**, v.17, p. 483-502, 1964.

SHELBY, M.D.; EREXSON, G.L.; HOOK, G.J.; TICE, R.R. Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: results with 49 chemical. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 21, p. 160-179, 1993.

SHELBY, M.D.; STASIEWICZ, S. Chemical showing no evidence of carcinogenicity in long term, two species rodent studies: the need for short term. **Environ. Mutagen.**, v. 6, p. 871-878, 1984.

SILVA, F.C.P.; FONSECA, A.S.; CORREA, A.S.; LEE, C.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; VALSA, J.O.; BERNARDO-FILHO, M.; FAVRE, A. Near UV light protection effect against lethality induced by stannous chloride in *Escherichia coli*. **Microbios**, v. 79, p. 241-244, 1994.

SILVA, C.R.; OLIVEIRA, M.B.N.; MELO, S.F.; DANTAS, F.J.S.; DE MATTOS, J.C.P.; BEZERRA, R.J.A.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; DUATTI, A.; BERNARDO-FILHO, M. Biological effects of stannous chloride, a substance that can produce stimulation or depression of the central nervous system. **Brain Res. Bull.**, v. 59, p. 213-216, 2002.

SILVER, S. Bacterial resistances to toxic metal ions-a review. **Gene**, v. 179, p. 9-19, 1996.

SINGH, I. Induction of reverse mutation and mitotic gene conversion by some metal compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 117, p. 149-152, 1983.

SMYTH, T.J.; CRAVO, M.S. Aluminum and calcium constraints to continuous crop production in a Brazilian amazon Oxisol. **Agron. J.**, v.84, p.843-850, 1992.

SOLOMON, N.W.; MARCHINI, J.S.; DUARTE-FAVARO; R.M.; VANNUCHI, H.; DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. Studies on the bioavailability of zinc in humans: Intestinal interaction of tin and zinc. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 37, p. 566-571, 1983.

STOHS, S.J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 18, p. 321-336, 1995.

SWANSON, R.L.; MOREY, N.J.; DOETSCH, P.W.; JINKS-ROBERTSON, S. Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination, and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 2929-2935, 1999.

TAN, K.; KELTJENS, W.G. Analysis of acid-soil stress in sorghum genotypes with emphasis on aluminum and magnesium interactions. **Plant and Soil**, v.171, p.147-150, 1995.

TAN, K.; KELTJENS, W.G.; FINDENEGG, G.R. Acid soil damage in sorghum genotypes: role of magnesium deficiency and root impairment. **Plant and Soil**, v.139, p.149-155, 1992.

TARLEY, C.R.T.; COLTRO, W.K.T.; MATSUSHITA, M.; de SOUZA, N.E. Characteristic levels of some heavy metals from Brazilian canned sardines (*Sardinella brasiliensis*). **J. Food Compost. Anal.**, v. 14, p. 611-617, 2001.

TEEZIYSKA, A.; WALTSCHWEA, L.; VENKOV, P. A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. **Environm. Pollution**, v. 109, p. 43-52, 2000.

TIPTON, I.H.; STEWART, P.L.; DICKSON, J. Patterns of elemental excretion in long term balance studies. **Health Phys.**, v. 16, p. 455-462, 1969.

TOBIN, J.M.; COONEY, J.J. Action of inorganic tin and organotins on a hydrocarbon using yeast, *Candida maltosa*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 36, p. 7-12, 1999.

TOMSETT, A.B.; THURMANN, D.A. Molecular biology of metal tolerance of plants. **Plant Cell Environm.**, v. 11, p. 383-394, 1988.

TRIPATHY, N.K.; WÜRGLER, F.E.; FREI, H. Genetic toxicity of six carcinogens and non-carcinogens in the *Drosophila* wing spot test. **Mutat. Res.**, v. 242, p. 169-180, 1990.

VALE, F.R.; FURTINI NETO, A.E.; RENÓ, N.B.; FERNANDES, L.A.; RESENDE, A.V. Crescimento radicular de espécies florestais em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, p.609-616,1996.

VAN DICK, E.; STASIAK, A.; STASIAK, A.; WEST, S.C. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. **Nature**, v. 398, p. 728-731, 1999.

VIDO, K.; SPECTOR, D.; LAGNIEL, G.; LOPEZ, S.; TOLEDANO, M.B.; LABARRES, J. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 8469-8474, 2001.

VILAPLANA, J.; ROMAGUERRA, C.; GRIMALT, F.; CORNELLANA, F. New trends in the use of metals in jewelry. **Contact Derm.**, v. 25, p. 145-148, 1991.

VOLKER, M.; MONE, M.J.; KARMAKAR, P.; VAN HOFFEN, A.; SCHUL, W.; VERMEULEN, W; HOEIJMAKERS, JH; VAN DRIEL, R; VAN ZEELAND AA; MULLENDERS, LH. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. **Mol. Cell.**, v. 8, p. 213-224, 2001.

VON MAYENBURG, J.; RAKOSKI, J.; SZLISKA, C. Patch testing with amalgam in various concentrations. **Contact Derm.**, v. 24, p. 266-269, 1991.

WACKETT, L.P.; DODGE, A.G.; ELLIS, L.B.M. Microbial genomics and the periodic table. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 647-655, 2004.

WANG, F.; KIM, B.E.; DUFNER-BEATTIE, J.; PETRIS, M.J.; ANDREWS, G.; EIDE, D.J. *Acrodermatitis enteropathica* mutations affect transport activity, localization and zinc-responsive trafficking of the mouse ZIP4 zinc transporter. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 13, p. 563-571, 2004.

WEBER G. Speciation of tin in lemon: an example of trace metal speciation in food. **Anal. Chim. Acta**, v. 200, p. 79-88, 1987.

WILLS, C. Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Vrit. Ver. Biochem. Mol. Biol.**, v. 25, p. 245-280, 1990.

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.; GENTALLEN, E.; GIAEVER, G.; HEGEMANN, J.H.; JONES, T.; LAUB, M.; LIAO, H.; DAVIS, R.W. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. **Science**, v. 285, p. 901-906, 1999.

WINZELER, E.A.; DAVIS, R.W. Functional analyses of the yeast genome. **Curr. Opin. Genet.**, v. 7, p. 771-776, 1997.

WOOD, M.J.; STORZ, G.; TJANDRA, N. Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. **Nature**, v. 430, p. 917-921, 2004.

XIAO, W.; CHOW, B.L.; BROOMFIELD, S.; HANNA, M. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. **Genetics**, v. 155, p. 1633-1641, 2000.

YAMAGUCHI, M.; SUGII, K.; OKADA, S. Inhibition of collagen synthesis in the femur of rats orally administered stannous chloride. **J. Pharm. Dyn.**, v. 5, p.388-393, 1982.

YAMAGUCHI, M.; SUGII, K.; OKADA, S. Inorganic tin in the diet affects the femur in rats. **Toxicol. Lett.**, v. 9, p. 207-209, 1981.

YAMAGUCHI, M.; SAITO, R. OKADA, S. Dose-effect of inorganic tin on biochemical indices in rats. **Toxicology**, v. 16, p. 267-273, 1980.

ZIMMERMANN, F.K.; VON BORSTEL, R.C.; VON HALLE, E.S.; PARRY, J.M., SIEBERT, D.; ZETTERBERG, G.; BARALE, R.;LOPRIENO, N. Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat. Res.**, v. 133, p. 199-244, 1984.

ZIMMERMANN, F.K. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat. Res.**, v. 31, p. 71-86, 1975.

Cassiana Macagnan Viau

CURRICULUM VITAE

Porto Alegre
2005

CURRICULUM VITAE

Novembro, 2005

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Cassiana Macagnan Viau
Nascimento: 07/01/1978, Ijuí/RS - Brasil
CPF: 66977037091

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

1998 - 2002 Graduação em Farmácia Industrial.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Rio Grande do Sul, Brasil.
Título: Identificação de Flavonóides em Extratos de Própolis do Rio Grande do Sul.
Orientador: Ivone Sartor.

2004 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Rio Grande do Sul, Brasil.
Título: Efeitos Tóxicos e Genotóxicos do Cloreto Estanoso em Bactéria e Levedura.
Orientador: João Antonio Pêgas Henriques.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPQ, Brasil.

3 ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Vínculo institucional

2001 - 2002 Vínculo: Bolsista de Iniciação Científi, Enquadramento funcional: Estudante, Carga horária: 20.

2001 - 2001 Vínculo: Bolsista de Iniciação Científi, Enquadramento funcional: Estaudante, Carga horária: 20.

2000 - 2001 Vínculo: Bolsista de Iniciação Científi, Enquadramento funcional: Estudante, Carga horária: 20.

Atividades

8/2001 - 7/2002 **Participação em projetos**, Faculdade de Química, Departamento de Química Pura.

Participação em projeto

1. Investigaçãode Quercetinaem Extratosde Própolisdo Rio Grande do Sul.

1/2001 - 7/2001 **Participação em projetos**, Faculdade de Química, Departamento de Química Pura.

Participação em projeto

1. Isolamentoe Determinaçãode CompostosBiologicamenteAtivosno Plygonumpunctatum.

5/2000 - 2/2001 **Participação em projetos**, Faculdade de Química, Departamento de Química Pura.

Participação em projeto

1. Obtenção do Polifenol Trans-Resveratrol.

4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E ARTÍSTICA/CULTURAL

4.1 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1.1 Trabalhos completos em anais de eventos

- 1 SCOPEL, Marina; VIAU, Cassiana Macagnan; SOUTO, André Arigony; BOCHTEIN, Betina. Determinação do Teor de Flavonóides Totais em Extratos de Própolis da Reserva do Pró-Mata (Rio Grande do Sul). In: 6 CONGRESSO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS E COSMÉTICOS DO RIO GRANDE DO SUL, 2002, Porto Alegre. **6 Congresso de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos do Rio Grande do Sul**. 2002.

4.1.2 Resumos simples em anais de eventos

- 1 PUNGARTNIK, Cristina; VIAU, Cassiana Macagnan; SOUTO, André Arigony; DIAS, Johnny Ferraz; BRENDEL, Martin; HENRIQUES, João Antonio Pêgas. Analysis of Stannous Chloride Effects in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by FTIR and Pixe Methodology. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGÊNESE AMBIENTAL, 2005, Natal. **VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental**. 2005.
- 2 VIAU, Cassiana Macagnan; PUNGARTNIK, Cristina; PICADA, Jaqueline; BRENDEL, Martin; HENRIQUES, João Antonio Pêgas. Evaluation of Potential Genotoxicity of Stannous Chloride (SnCl₂) in Yeast and Bacteria. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGÊNESE AMBIENTAL, **VII Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental**. 2005.
- 3 SCHMITT, Maria Cecília; VIAU, Cassiana Macagnan; PUNGARTNIK, Cristina. Cellular Activation and Deactivation of Genotoxicity of Tin Chloride in *Saccharomyces cerevisiae*. In: XXIV REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICROORGANISMOS, 2004, Gramado. **XXIV Reunião de Genética de Microorganismos**. 2004.
- 4 VIAU, Cassiana Macagnan; PUNGARTNIK, Cristina; SOUTO, André Arigony. FTIR as a tool for the analysis of effects of stannous chloride in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON VIBRATIONAL SPECTROSCOPY APPLIED TO MICROBIOLOGY AND BIOMEDICAL RESEARCH, 2004, La Plata. **International Workshop on Vibrational Spectroscopy Applied to Microbiology and Biomedical Research**. 2004.
- 5 PUNGARTNIK, Cristina; VIAU, Cassiana Macagnan; SOUTO, André Arigony. Interaction of genotoxic SnCl₂ with cell wall and membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: 11° INTERNATIONAL CONGRESS ON YEAST, 2004, Rio de Janeiro. **11° International Congress on Yeast**. 2004.
- 6 VIAU, Cassiana Macagnan; PUNGARTNIK, Cristina; SOUTO, André Arigony. Mannoproteins give a typical profile in FTIR of yeast cells and influence SnCl₂- Induced cell clumping. In: XIV ENCONTRO DE GENETICISTAS DO RIO GRANDE DO SUL, 2004, Canoas. **XIV Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul**. 2004.
- 7 VIAU, Cassiana Macagnan; PUNGARTNIK, Cristina; SOUTO, André Arigony. Monitoring Macromolecular Changes in *Saccharomyces cerevisiae* by FTIR Spectroscopy. In: XXIV REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICROORGANISMOS, 2004, Gramado. **XXIV Reunião de Genética de Microorganismos**. 2004.

- 8 PUNGARTNIK, Cristina; VIAU, Cassiana Macagnan; SCHMITT, Maria Cecília. Sensitivity to Sn²⁺ ions of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends on general energy metabolism, metal transport anti-oxidative defences, and DNA capacity. In: 11^o INTERNATIONAL CONGRESS ON YEAST, 2004, Rio de Janeiro. **11^o International Congress on Yeast**. 2004.
- 9 VIAU, Cassiana Macagnan; PUNGARTNIK, Cristina; SOUTO, André Arigony. Treatment of yeast cells with stannous chloride leads to physicochemical changes of membranes, proteins, and nucleic acids and results in toxicity and genotoxicity. In: 50^o CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2004, Florianópolis. **50^o Congresso Brasileiro de Genética**. 2004.
- 10 VIAU, Cassiana Macagnan; SCHMITT, Maria Cecília; PUNGARTNIK, Cristina. DNA and Membrane Damage Induced by Stannous Chloride. In: V CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE BIOFÍSICA, 2003, Rio de Janeiro. **V Congresso Ibero-Americano de Biofísica**. 2003.
- 11 SCHMITT, Maria Cecília; VIAU, Cassiana Macagnan; PUNGARTNIK, Cristina. Stannous Chloride Induces Oxidative Stress in Cox Deficient Yeast Strains. In: V CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE BIOFÍSICA, 2003, Rio de Janeiro. **V Congresso Ibero-Americano de Biofísica**. 2003.
- 12 SCOPEL, Marina; VIAU, Cassiana Macagnan. Determinação do Teor de Flavonóides em Extratos de Própolis da Reserva do Pró-Mata (Rio Grande do Sul). In: 6^o CONGRESSO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS E COSMÉTICOS DO RIO GRANDE DO SUL, 2002, Porto Alegre. **6^o Congresso de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos do Rio Grande do Sul**. 2002.
- 13 SCOPEL, Marina; VIAU, Cassiana Macagnan. Isolamento e Determinação de Compostos Bioativos no *Polygonum punctatum*. In: XIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - UFRGS, 2002, Porto Alegre. **XIII Salão de Iniciação Científica - UFRGS**. 2002.
- 14 VIAU, Cassiana Macagnan; SOUTO, André Arigony. The Bee species (Apini and Meliponini) determine the propolis profile. In: XIV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - UFRGS, 2002, Porto Alegre. **XIV Salão de Iniciação Científica - UFRGS**. 2002.
- 15 SCOPEL, Marina; VIAU, Cassiana Macagnan. Determinação de Flavonóides Totais e Quercetínicos em Extratos de Própolis Comerciais e Nativos. In: II SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - PUCRS, 2001, Porto Alegre. **II Salão de Iniciação Científica - PUCRS**. 2001.
- 16 VIAU, Cassiana Macagnan; SCOPEL, Marina. Isolamento e Determinação de Compostos Biologicamente Ativos no *P. punctatum*. In: II SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - PUCRS, 2001, Porto Alegre. **II Salão de Iniciação Científica - PUCRS**. 2001.
- 17 VIAU, Cassiana Macagnan; SCOPEL, Marina. Síntese dos Derivados (Hidroxi-fenil)-propionaldeídos. In: XII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - UFRGS, 2000, Porto Alegre. **XII Salão de Iniciação Científica - UFRGS**. 2000.

4.1.3 Artigos completos publicados em periódicos

- 1 VIAU, Cassiana Macagnan; YONEAMA, Maria Lúcia; DIAS, Jonny Ferraz; PUNGARTNIK, Cristina; BRENDEL, Martin; HENRIQUES, João Antonio Pêgas. Detection and quantitative determination by PIXE of the mutagen Sn²⁺ in yeast cells - Submetido à Nuclear Instruments and Methods B. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B - Beam Interactions With Materials and Atoms**, 2005.

- 2 PUNGARTNIK, Cristina; VIAU, Cassiana Macagnan; PICADA, Jaqueline; ARAUJO, Adriano Caldeira de; HENRIQUES, João Antonio Pêgas; BRENDEL, Martin. Geotoxicity of Stannos Chloride in Yeast and Bacteria. **Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis**, 2005.
- 3 VIAU, Cassiana Macagnan; PUNGARTNIK, Cristina; SCHMITT, Maria Cecília; BASSO, Tatiana; HENRIQUES, João Antonio Pêgas; BRENDEL, Martin. Sesity to Sn²⁺ of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends on general energy metabolism, metal transport, anti-oxidative defences, and DNA repair - Submetido à *BioMetals*. **Biometals**, 2005.

5 INDICADORES DE PRODUÇÃO

Produção bibliográfica

Artigos publicados em periódicos	3
Completos	3
Trabalhos em eventos	18
Completos	1
Resumos	17