

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

PAULA ANDRÉIA DE SOUZA RODRIGUES DOS SANTOS

**Genotoxicidade do antiparasitário dipropionato de imidocarb
(imizol®) em células de *Aspergillus nidulans***

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
DEZEMBRO – 2011

PAULA ANDRÉIA DE SOUZA RODRIGUES DOS SANTOS

**Genotoxicidade do antiparasitário dipropionato de imidocarb
(imizol®) em células de *Aspergillus nidulans***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof^a Dr^a Marialba Avezum Alves de Castro Prado.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
DEZEMBRO – 2011

Ao meu esposo, Rogério, que sempre esteve e está ao meu lado, apoiando, cuidando de mim e que embarcou comigo neste sonho, tornando-o seu sonho também. Vida, eu te amo.

Aos meus pais, Neide e Paulo, que em todos os momentos da minha vida estiveram presentes. Mãe, eu também sei que este sonho é o seu. Amo vocês.

Ao meu irmão e à minha cunhada, Adriano e Miriam. Obrigada pelo apoio e por terem nos dado um presente tão especial, minha princesa Natália, uma criança iluminada, que amo tanto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nunca permitiu que eu desistisse, pois conhece minha capacidade e dedicação.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

À professora doutora Marialba Avezum Alves de Castro-Prado, por sua compreensão, amizade, orientação e por seus ensinamentos que me fizeram crescer tanto profissionalmente.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular e Genética que contribuíram para realização deste trabalho. Em especial, à Luzia Aparecida Regassi, pela amizade e carinho, e à Rosinete Gonçalves, Marli Licero Schuete Silva e Maroly V. A. Pinto, pela assistência, amizade e dedicação.

À professora Carmen Querol e às minhas colegas, Juliane Rocha de Sant'Anna, Lúcia Jacovozzi Rosada, Giovanna Natiele Esquissato, pelo companheirismo, amizade e carinho.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Paula Andréia de Souza Rodrigues dos Santos, filha de Paulo Roberto de Souza e Neide Aparecida Jandoti de Souza, nasceu em 01 de janeiro de 1977, na cidade de Santa Cruz do Monte Castelo, estado do Paraná.

Em dezembro de 1992, concluiu o Ensino Fundamental, no Instituto de Educação Estadual de Maringá e, em dezembro de 2000, concluiu o Ensino Médio, no Colégio Estadual Vinícius de Moraes, ambos na cidade de Maringá, estado do Paraná.

Em dezembro de 2008, graduou-se em Biomedicina, Bacharelado com habilitação em Análises Clínicas, pela Faculdade Ingá (Uningá) em Maringá, estado do Paraná.

Em março de 2009, iniciou o curso de Pós-Graduação *Lato sensu* em Anatomia e Histologia: Métodos de Ensino e Pesquisa, área de concentração Morfologia, na Universidade Estadual de Maringá (UEM). Apresentou seu trabalho de conclusão de curso em setembro de 2010.

Em março de 2010, iniciou o curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá, Paraná, realizando estudos na área de Genética de Microrganismos.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Ciclo de vida da <i>Babesia</i> sp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado	3
2.2. Babesiose animal.....	6
2.3. Diagnóstico da <i>Babesia</i> sp.....	9
2.4. Principais babesicidas.....	12
2.4.1. Dipropionato de imidocarb	13
2.5. Recombinação mitótica.....	16
2.6. <i>Aspergillus nidulans</i> e ciclo parassexual.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Obtenção da linhagem diplóide UT448//A757	23
3.2.1. Meio mínimo (MM).....	24
3.2.2. Meio completo (MC):.....	24
3.2.3. Meio suplementado (MS).....	24
3.3. Tratamento do diplóide UT448//A757 com dipropionato de imidocarb (IMD)..	25
3.4. Avaliação da citotoxicidade do IMD	25
3.5. Seleção dos segregantes haplóides	25
3.6. Ensaio de homozigotização	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5. CONCLUSÕES	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Genótipo e origem das linhagens de <i>A. nidulans</i>	25
Quadro 2 -	Índice de Homozigotização (HI), valores dos marcadores nutricionais para UT448//A757 linhagens diplóides após tratamento com 10 μ M (D4-D6), 5 μ M (D7-D9) e 2.5 μ M (D10-D12) de imidocarb.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida no hospedeiro invertebrado.....	07
Figura 2 - Esfregaços de sangue periférico humano.....	10
Figura 3 - Esfregaços sangüíneos corados por Giemsa de paciente infectado por babesiose.....	10
Figura 4 - Esquema da reação de imunofluorescência indireta.....	11
Figura 5 - Estrutura química do imidocarb.....	13
Figura 6 - Esquema das Segregações mitóticas x e z.....	18
Figura 7 - Esquema da regulação da passagem da fase G1 para a fase S através da fosforilação da proteína pRb. MRM: ,ATM: ;ATR: , p53.....	19
Figura 8 - Esquema da perda da condição de heterozigose (<i>Rb+/-rb</i>).....	20
Figura 9 - Esquema do ciclo parassexual.....	21
Figura 10 - Origem da linhagem diplóide UT448//A757.....	24
Figura 11 - Seleção dos segregantes haplóides.....	26
Figura 12 - Instabilidade Mitótica.....	27
Figura 13 - Fórmula para cálculo dos valores do Índice de homozigotização.....	28
Figura 14 - Origem dos diplóides heterozigotos (-/+ e +/-) e homozigoto (+/+) resultantes do <i>crossing-over</i> mitótico entre o gene <i>paba</i> e o centrômero.....	28
Figura 15 - Crescimento micelial do diplóide UT448//A757 em MM (controle), MM + 2,5 µM, 5 µM e 10 µM de IMD.....	29
Figura 16 - Esquema da segregação do diplóide D5 (<i>y</i> -amarelo).....	31

RESUMO

SANTOS, Paula Andréia de Souza Rodrigues, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, dezembro de 2011. **Genotoxicidade do antiparasitário dipropionato de imidocarb (imizol®) em células de *Aspergillus nidulans***. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marialba Avezum Alves de Castro-Prado. Professoras Conselheiras: Prof^a. Dr^a. Claudete Aparecida Mangolin e Prof^a. Dr^a. Sandra Aparecida de Oliveira Collet.

O dipropionato de imidocarb (IMD) é um inibidor da síntese de ácidos nucléicos, amplamente utilizado no tratamento e controle da babesiose. Estudos realizados com bovinos, suínos e ovinos tratados com IMD revelaram a persistência de altas quantidades deste babesicida no corpo destes animais. Considerando-se que inibidores da síntese de DNA podem ter efeitos recombinagênicos e que o processo de recombinação mitótica tem participação na carcinogênese, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial genotóxico do IMD, por meio de seu efeito sobre o *crossing-over* mitótico, em células diplóides de *Aspergillus nidulans*. A linhagem heterozigota UT448//A757 de *A. nidulans* e o ensaio de homozigotização foram utilizados para atingir os objetivos propostos. O efeito recombinagênico do IMD pode ser observado em concentrações não-citotóxicas de 2,5 µM, 5,0 µM e 10,0 µM, por meio dos índices de homozigotização, calculados para diferentes marcadores nutricionais, e pela origem de um diplóide recombinante, homozigoto para marcadores dos cromossomos I e II de *A. nidulans*. O potencial recombinagênico do IMD pode estar associado ao reparo recombinagênico de lesões no DNA, induzidas por este babesicida. Inibidores da síntese de DNA, tal como o IMD, induzem quebras no DNA e atuam como promotores no processo de carcinogênese. Considerando-se que a recombinação mitótica pode originar clones de células homozigotas para alelos deletérios, os resultados do presente estudo destacam a necessidade de novas investigações acerca do potencial genotóxico deste composto, não somente pela associação entre os processos de recombinação homóloga e tumorigênese, mas também pela persistente retenção do IMD no leite e em tecidos comestíveis de animais.

Palavras-chave: *Aspergillus nidulans*, Índice de homozigotização, genotoxicidade, babesiose, inibidores da síntese de DNA.

ABSTRACT

SANTOS, Paula Andréia de Souza Rodrigues, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, december, 2011. **Genotoxicity of the antiparasitic imidocarb dipropionate (imizol®) in cells of *Aspergillus nidulans***. Adviser: Marialba Avezum Alves de Castro-Prado. Committee Members: Claudete Aparecida Mangolin and Sandra Aparecida de Oliveira Collet.

Imidocarb dipropionate (IMD) is a chemotherapeutic agent prescribed for the treatment and control of babesiosis and it has been described as a nucleic acid synthesis inhibitor. Although it is an effective babesicide, previous studies have reported that IMD residues are retained in high and persistent amount in animal edible tissues of cattle, swine and sheep. Since the carcinogenic potential of a chemical compound may be assessed through its effect on the homologous recombination, this study aims to investigate whether the IMD is recombinogenic in *Aspergillus nidulans* diploid cells and capable of inducing the homozygosis of genes previously present in heterozygous condition. In order to achieve our goal, the homozygotization assay and the heterozygous diploid strain of *Aspergillus nidulans* were employed. The recombinogenic action of IMD in non-toxic concentrations (2.5 μ M to 10.0 μ M) was demonstrated by Homozygotization Indices higher than 2.0 for diploids' markers obtained with IMD, and by the production of a diploid homozygous for genetic markers from chromosomes I and II as well. The IMD recombinogenic potential may be associated to the recombinational repair of lesions in DNA induced by this babesicide. DNA replication blockers, such as IMD, induce DNA strand breaks and have been classified as promoters in the carcinogenesis process. Since the mitotic homologous recombination may trigger neoplasms, this study highlights the need for further studies to investigate the genotoxic potential of IMD in mammalian cells, specially due to the long elimination time of IMD from milk and animal tissues.

Key words: *Aspergillus nidulans*, homozygotization index, genotoxicity, babesiosis, DNA synthesis inhibitors.

1. INTRODUÇÃO

O antiparasitário dipropionato de imidocarb (IMD) (3,3'-bis(2-imidazolin-2-yl)carbanilida) é um derivado da carbanilida, tradicionalmente usado na medicina veterinária para o tratamento de infecções causadas por parasitas intracelulares, tais como *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp. e *Babesia* sp. O mecanismo de ação do IMD, entretanto, não está totalmente elucidado (Rodrigues et al., 2006).

Estudos recentes demonstram que o IMD é retido em tecidos consumíveis de bovinos e ovinos por um período de até 6 meses após sua última administração. Estes resultados contrastam o período de carência determinado pelo fabricante do Imizol® (Intervet do Brasil Veterinária Ltda) que é de 28 dias. O IMD pode associar-se a macromoléculas intracelulares, como o DNA, além de apresentar similaridades estruturais com compostos que se ligam aos ácidos nucléicos, tais como as pentamidinas, poliaminas e spermidinas. (Moore et al., 1996). Diante disto, estudos que investigaram a capacidade de ligação do IMD ao DNA, das pentamidinas e spermidinas demonstraram a competitividade pelos sítios de ligação ao DNA entre estes compostos (Moore et al., 1996).

Compostos que se ligam ao DNA, tais como doxorubicina e etoposida são amplamente utilizados no tratamento do câncer, alterando processos celulares importantes, dentre os quais destaca-se a síntese de DNA. Inibidores da síntese de DNA foram também caracterizados como potentes indutores do *crossing-over* mitótico (Becker e Castro-Prado, 2004). Este processo, por sua vez, tem sido associado tanto à alteração de proto-oncogenes, quanto à progressão de neoplasias, por meio da perda da heterozigotidade de genes supressores de tumor (Weinber, 1991; Ramel et al., 1996; Miyamoto et al., 2007).

Considerando que em células heterozigotas a recombinação somática pode induzir a homozigose de genes deletérios, através da segregação de uma cromátide paternal e uma recombinante para o mesmo pólo mitótico (Souza-Júnior et al., 2007; Franco et al., 2007) e que a recombinação somática pode atuar como um mecanismo precursor da carcinogênese, o presente estudo tem como objetivo avaliar a genotoxicidade *in vivo* do IMD em células heterozigotas de *Aspergillus nidulans*. Este microrganismo é considerado um sistema modelo para o estudo do *crossing-over* mitótico, devido ao fato de que suas células permanecem na fase G2

por um grande período do ciclo celular. Nesta fase os cromossomos encontram-se duplicados, favorecendo a ocorrência da recombinação mitótica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ciclo de vida da *Babesia* sp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado

A Babesiose é uma doença parasitária, causada por protozoários hemotrópicos do gênero *Babesia* sp., família Babesiidae, ordem Piroplasmida e filo Apicomplexa (Vial e Gorenflot, 2006). O nome Apicomplexa é derivado da presença de um complexo de organelas situado no ápice celular de determinadas fases da vida destes protistas. Este complexo inclui vesículas que secretam enzimas, as quais permitem ao parasita invadir as células do hospedeiro (Vannier et al., 2008).

Pertencem a este gênero mais de 70 espécies, as quais foram descritas em vários animais, dentre elas, *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *B. divergens* em bovinos; *B. caballi* e *B. equi* em equinos; *B. canis* em cães; *B. microti* em roedores. Recentemente, foi descrita uma nova espécie em seres humanos, *B. duncani*, previamente denominada WA-1 (Quick et al., 1993; Gubernot et al., 2009).

Estes parasitas são transmitidos por carrapatos dos gêneros: *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Rhipicephalus*. Destaca-se que os carrapatos do gênero *Ixodes* são os mais comumente encontrados (Boustani e Gelfand, 1996).

Na América do Sul, os parasitas *B. bigemina* e *B. bovis* têm como vetor o carrapato *R. microplus* (Guglielmone, 1995). No nordeste dos Estados Unidos, *B. microti* é transmitida pela espécie *I. dammini*, enquanto, no Reino Unido, o referido parasita é transmitido pela espécie *I. trianguliceps*. Na Europa, a espécie *I. ricinus* é a responsável pela transmissão da babesiose bovina. Todavia, o vetor responsável pela transmissão de WA-1 ainda não foi definido, mas o carrapato *I. pacificus* é apontado como o candidato mais provável (Boustani e Gelfand, 1996).

O primeiro relato da babesiose foi feito no livro de *Êxodo*, capítulo 9, verso 3, no qual essa doença aparece no gado do Faraó egípcio Ramsés II (Earle, 1989; Boustani e Gelfand, 1996; Vannier et al., 2008; Mihalca et al., 2010). Estudiosos acreditam que a babesiose foi a quinta praga que sobreveio aos egípcios, pois se trata de uma doença parasitária transmitida por carrapatos, os quais eram abundantes nos tempos bíblicos e, portanto, com proliferação extremamente rápida (Earle, 1989). É, entretanto, questionável se a praga referida no livro de *Êxodo* se trate realmente do que hoje conhecemos por babesiose, uma vez que não há

maiores detalhes que possibilitem afirmar categoricamente se tratar da mesma maleza parasitária (Mihalca et al., 2010).

A babesiose foi a primeira doença transmitida por vetores a ser descrita na literatura (Smith e Kilbourne, 1893). O protozoário *Babesia* sp., similarmente ao parasita da malária, possui uma estreita afinidade por eritrócitos e, devido a este fato, pode ser confundido com o agente da malária, *Plasmodium* sp. Ambos protozoários diferem entre si em uma série de características, tais como: a) a maioria das espécies de *Babesia* não possui a fase exoeritrocítica em seu desenvolvimento, sendo uma característica distinta em relação ao agente da malária, b) a *Babesia* sp. divide-se por fissão binária e não por esquizogonia, além de desenvolver-se no citoplasma do eritrócito hospedeiro e não no interior de um vacúolo parasitóforo, como o faz o parasita da malária, e c) as espécies de *Babesia* não formam o pigmento característico, denominado hemozoína, em eritrócitos infectados, como fazem as espécies do gênero *Plasmodium* (Schuster, 2002).

Os parasitas intraeritrocitários do gênero *Babesia* sp. são os causadores mais comuns de infecções parasitárias (Homer et al., 2000). Dessa forma, destaca-se sua importância na veterinária voltada para gados, cavalos e cães, ganhando, assim, cada vez mais a atenção dos profissionais da área, como um problema de doença zoonótica emergente (Brasseur et al., 1998; Vial e Gorenflot, 2006).

As babesioses são responsáveis por severos danos à sanidade animal, o que gera um grande impacto econômico na pecuária bovina mundial. A doença é desencadeada, sobretudo, pela massiva destruição eritrocítica, decorrente dos aspectos biológicos dos agentes causais, ao realizarem parte de seu ciclo no interior destas células. O risco de infecção por *Babesia* sp. é decorrente da presença de populações de carrapatos infestantes, da capacidade de transmissão do carrapato (Soares et al., 2000), e de mudanças climáticas que ocorrem em decorrência do aquecimento global, que prolongam o período de atividade do carrapato ou alteram sua distribuição em áreas de risco (Zintl et al., 2003).

As manifestações clínicas da babesiose em animais podem ser variáveis, sendo observados diferentes graus de gravidade, que oscilam em função da virulência e patogenicidade entre as espécies e entre isolados de *Babesia* sp. (Soares et al., 2000; Mendonça et al., 2003). Os sintomas comumente observados são hemoglobinemia, hemoglobinúria, palidez de mucosas, febre, sialorréia, depressão, distúrbios neurológicos e tremores (Zintl et al., 2003; Rodrigues et al.,

2005). Além desses sintomas, é possível verificar áreas edemaciadas, especialmente nos membros inferiores como, bolsa escrotal, vulva, baixo ventre e podem ocorrer também na região encefálica (Massard e Fonseca, 2004). Há ainda a motilidade intestinal e ruminal que são aumentadas, e os espasmos do esfíncter anal periportal podem levar a diarreia esquistossomótica (Zintl et al., 2003). Fezes ressecadas, apresentando acentuada mucosidade de coloração amarelada, podem também ser observadas (Massard e Fonseca, 2004).

Existem duas classes de hospedeiros para o gênero *Babesia* sp., um invertebrado (ou artrópode) e outro vertebrado. Os vetores invertebrados (*Ixodes* sp., *Dermacentor* sp., *Haemaphysalis* sp. e *Rhipicephalus* sp.) se alimentam de hospedeiros vertebrados, os quais são responsáveis por manterem a *Babesia* sp em um estado infeccioso (Homer et al., 2000; Vial e Gorenflot, 2006).

O ciclo de vida da *Babesia* sp., tem início quando o carrapato suga um hospedeiro vertebrado infectado. O artrópode ingere várias formas do parasita presentes nas hemácias do hospedeiro infectado (Fig. 1A), mas somente algumas formas, consideradas gametócitos, são capazes de evoluir no seu organismo (Mehlhorn e Schein, 1984; Chauvin et al., 2009).

No carrapato, os gametócitos desenvolvem-se em gametas masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas), os quais se fundem posteriormente (Figura 1B), formando um zigoto móvel (Figura 1C). Este zigoto móvel invade as células intestinais do carrapato, onde se multiplica assexuadamente, formando os esporocinetos (Homer et al., 2000). Os esporocinetos são disseminados pelo organismo do carrapato, atingindo todos os seus órgãos, incluindo os ovários e as glândulas salivares. Nos ovários podem penetrar nos ovos, que originam larvas infectadas, sendo transmitidas para a próxima geração de carrapato (transmissão transovariana). Nas glândulas salivares, os esporocinetos se multiplicam (Figura 1D) e formam os esporozoítos (Figura 1E), formas infectantes que são transmitidas aos hospedeiros vertebrados através da picada (Figura 1F e G).

Algumas espécies de *Babesia* sp. podem invadir inicialmente os linfócitos do hospedeiro vertebrado e, em seguida, diferenciar-se em esquizontes multinucleados. Estes, por sua vez, se diferenciarão em merozoítos, os quais brotam dos esquizontes, lisando a célula. Estes merozoítos e/ou esporozoítos (espécies de *Babesia* sem fase pré-eritrocítica) invadem os eritrócitos, infectando-os. Essa invasão acontece por meio do processo de invaginação (Figura 1H).

A partir deste momento, a maioria dos merozoítos se divide em trofozoítos por fissão binária, formando dois, ou às vezes quatro, indivíduos nos eritrócitos (Figura. 11) (Homer et al., 2000). Por fim, a célula hospedeira rompe-se e os organismos são liberados, penetrando em novos eritrócitos (Wright, 1991).

2.2. Babesiose animal

A babesiose bovina é uma importante doença parasitária nos países de clima tropical e subtropical, incluindo o continente das Américas. A doença é causada pelos agentes etiológicos *B. bigemina* e *B. bovis*, transmitidos pelo vetor *R. microplus* (Barci et al., 1994; Souza et al., 2000; Mendonça et al., 2003; Vieira et al., 2003; Juliano et al., 2007).

No Brasil, dentre os 24 surtos de babesiose bovina (ou tristeza parasitária bovina), ocorridos no período de agosto de 2007 a outubro de 2009 no sertão paraibano, dois foram causados por *B. bigemina*, dois por *Babesia* não identificada e outros dois por infecção mista de *Anaplasma marginale* e *Babesia* sp. (Costa et al., 2011).

O prejuízo econômico atribuído à babesiose é resultante da baixa produção de leite e carne, da mortalidade dos animais e das perdas indiretas, decorrentes de medidas de quarentena e de combate ao vetor com a utilização de drogas antiparasitárias (Barci et al., 1994).

As manifestações clínicas da doença podem apresentar diferentes graus de gravidade, que variam em função da virulência e patogenicidade entre espécies e isolados de *Babesia* sp. Os isolados, provenientes de diferentes regiões geográficas, podem apresentar variações genéticas e antigênicas entre si (Losos, 1986; Dalrymple et al., 1992).

O controle da babesiose bovina baseia-se na adoção de estratégias que visam reduzir ou eliminar as populações de carrapatos vetores, bem como a utilização de vacinas constituídas pelo parasita atenuado (Bastos et al., 2009). A eficácia destas vacinas, entretanto, é restrita às regiões endêmicas específicas, de onde o parasita foi isolado (Brayton et al., 2007).

O principal método de controle das populações de *R. microplus* baseia-se na utilização de carrapaticidas, uma vez que a eficácia das vacinas comerciais anti-carrapatos é inconsistente em diferentes regiões geográficas. O desenvolvimento de

populações de carrapatos resistentes a carrapaticidas representa uma séria ameaça à indústria do gado. Um melhor entendimento das interações entre vetor (carrapatos), parasita (protozoários) e hospedeiro (gado) é necessário para o desenvolvimento de modelos e estratégias epidemiológicas que visam a impedir a reinvasão do vetor *R. microplus* em zonas livres dessa espécie e a introdução de *B. bovis*, em áreas não-endêmicas (Bastos et al., 2009).

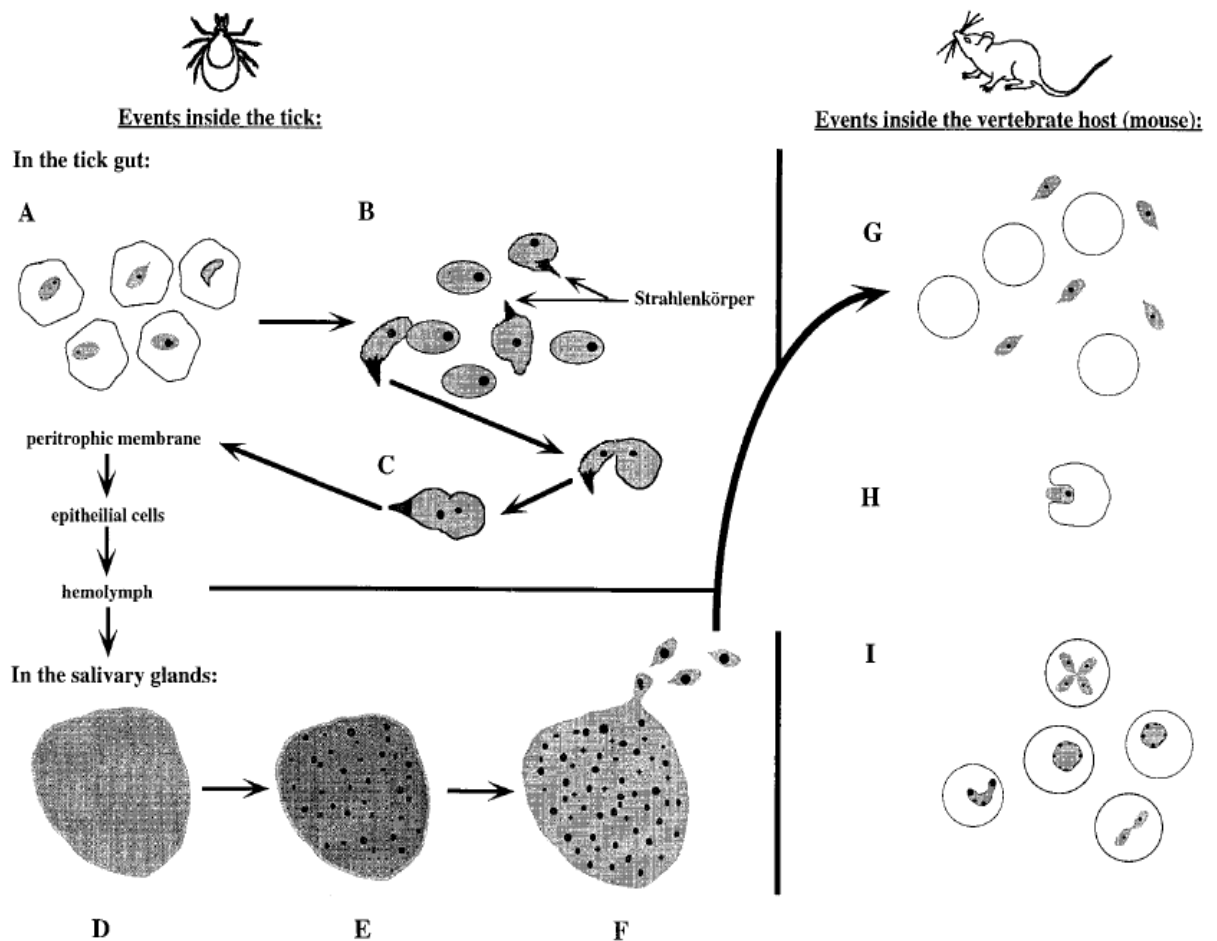


Figura 1 - Ciclo de vida no hospedeiro invertebrado. Parasitas visíveis no interior dos eritrócitos ingeridos pelos carrapatos (A). Fusão de gametas (B). O zigoto, então formado, passa a infectar e mover-se através dos tecidos dentro do carrapato (C). O zigoto chega às glândulas salivares, infectando os ácinos, o que culmina na formação de um esporoblasto multinucleado indiferenciado (D). Formam-se organelas especializadas dos futuros esporozoítos (E). Os esporozoítos maduros brotam dos esporoblastos (F). Os esporozoítos são inoculados no hospedeiro vertebrado (G). Os esporozoítos (ou merozoítos) atacam a células eritrocitárias do hospedeiro vertebrado, por um processo de invaginação, dando início à infecção (H). Os parasitas tornam-se trofozoítos dividindo-se por fissão binária dentro do eritrócito (I). (Extraído de Homer et al., 2000).

Os agentes etiológicos da Babesiose equína são *B. caballi* e *B. equi* (Vial et al., 2006), os quais são transmitidos por carrapatos (vetores) dos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (Souza et al., 2000). No Brasil, Pereira et al. (2004) observaram maior incidência de *B. equi* em relação à *B. caballi*, por meio do Teste de Fixação de Complemento (TFC). Essa observação foi realizada com base nas análises de 204 equínos, com sintomas de babesiose, em diferentes municípios dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. Posteriormente, a região Norte do estado do Rio Grande do Sul foi caracterizada como uma área de alto risco para surtos de babesiose equína ocasionada por *B. equi* (Golynski et al., 2008).

A distribuição geográfica das espécies de *Babesia* que infectam os equídeos é semelhante, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, mas havendo focos também em algumas áreas de clima temperado (Golynski et al., 2008).

A babesiose equína é caracterizada por lise eritrocitária ocasionando anemia, icterícia, hemoglobinúria e levando à morte do animal, quando não tratada adequadamente. A gravidade da resposta clínica pode, entretanto, ser variável, podendo evoluir para uma recuperação espontânea, após o hospedeiro apresentar uma resposta febril, sem o aparecimento de hemoglobinúria marcada por anemia (Vial et al., 2006).

A babesiose canina tem como agentes etiológicos a *B. canis* e *B. gibsoni*, sendo ambas transmitidas pelos carrapatos (vetores) dos gêneros *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Rhipicephalus* (Uilenberg et al., 2006).

A espécie *B. canis* possui três subespécies: a) *B. canis rossi* sendo transmitida pelo vetor *Haemaphysalis leachi*, causando infecção fatal em cães domésticos, mesmo após a realização do tratamento, b) *B. canis vogeli*, transmitida pelo vetor *Rhipicephalus sanguineus*, levando a um quadro de infecção moderada e muitas vezes clinicamente inaparente e c) *B. canis canis*, transmitida pelo vetor *Dermacentor reticulatus*, cuja patogenicidade é intermediária entre as duas subespécies acima citadas (Zahle et al., 1998).

As espécies *B. canis* e *B. gibsoni* são encontradas na Ásia, África, Europa, Oriente Médio e América do Norte, sendo este último, o continente de maior prevalência da primeira espécie citada (Vial et al., 2006). No Brasil, a baseiose canina causada predominantemente pelo patógeno *B. canis vogeli* foi descrita nos

estados de Goiás e Minas Gerais (Passos et al., 2005; Duarte et al., 2008), porém há relatos de babesiose causada pela espécie *B. gibsoni*, no sul do país. Os perfis de clivagens do material genômico de 105 cães infectados por *Babesia* sp., no estado do Paraná, foram identificados através da técnica da reação em cadeia da polimerase e da análise de restrição de fragmentos polimórficos (PCR-RFLP), os quais apresentaram-se compatíveis com *B. canis vogeli* em 23,4% das amostras e com *B. gibsoni* em 13,8%, das amostras restantes (Jojima et al., 2008).

Os aspectos clínicos da babesiose canina apresentam uma combinação de sintomas, envolvendo uma síndrome febril e hemolítica, e insuficiência renal grave, a qual pode evoluir para um choque fatal (Bourdoiseau et al., 2006).

2.3. Diagnóstico da *Babesia* sp.

O diagnóstico clínico da babesiose animal é composto, inicialmente, pela busca de informações a respeito de possíveis passagens dos animais por áreas onde a babesiose é endêmica, ou por áreas infestadas por carrapatos (Homer et al., 2000). O diagnóstico da babesiose humana, por outro lado, depende de uma suspeita clínica inicial, uma vez que os sintomas da infecção babesial se sobrepõem aos sintomas de outras doenças severas. Não existem sinais patognomônicos no exame físico, entretanto a babesiose deve ser considerada quando o paciente apresenta sintomas semelhantes a uma virose e esteve presente em áreas onde a babesiose é endêmica.

A babesiose também deve ser considerada em portadores da doença de Lyme ou de Anaplasmoose granulocítica, pois quaisquer combinações destas três infecções podem ser transmitidas simultaneamente pelo vetor *I. scapularis*. A babesiose é tipicamente mais severa em indivíduos imunocomprometidos, esplenectomizados e idosos (Krause et al., 2000; Pfeiffer et al., 2007; Vannier et al., 2008).

No diagnóstico laboratorial, observa-se anemia hemolítica normocítica, com diminuição da haptoglobina sérica e hiperbilirrubinemia, com fração de bilirrubina indireta. As concentrações das enzimas desidrogenase láctica, transaminases e fosfatase alcalina, podem apresentar-se elevadas (Boustani e Gelfand, 1996; Vannier et al., 2008). A análise de esfregaços sanguíneos revela contagem elevada

de reticulócitos, número de leucócitos variando de normal a reduzido, com desvio à esquerda, e trombocitopenia (Figuras 2 e 3) (Vannier et al., 2008).

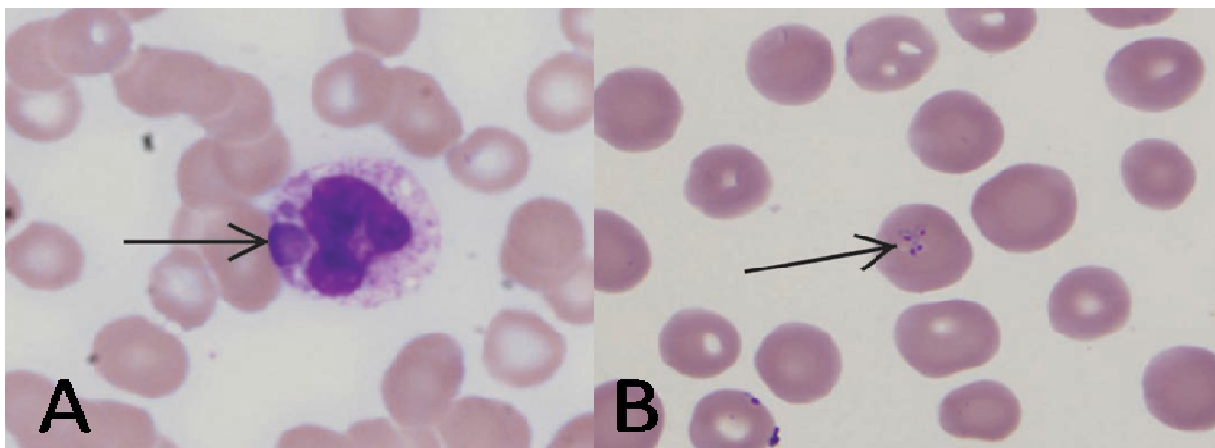


Figura 2 - Esfregaços de sangue periférico humano. A) Neutrófilo com corpo de inclusão intracitoplasmático (seta), classicamente associado a anaplasmoose granulocítica humana. B) Eritrócito infectado por *Babesia* sp., formando uma téttrade pioplásmica, ou cruz de malta (seta), sinal patognomônico para babesiose. (Patnaik, 2009).

A confirmação do diagnóstico de infecção por *Babesia* é realizada pela identificação microscópica do parasita em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa (Zintl et al., 2003). Nesta preparação, a *Babesia* sp. pode aparecer em forma de pêra, circular ou oval, com citoplasma azul e cromatina avermelhada. Características diferenciais da babesiose nesse tipo de teste analítico incluem a presença de formas extraeritrocíticas nos casos severos e ausência de depósitos de pigmento (hemozoína).



Figura 3 - Esfregaços sanguíneos corados por Giemsa de paciente infectado por babesiose. (A) Parasitas piriformes emparelhados. (B-C) Parasitas em forma de anel. (Kim et al., 2007).

Múltiplos parasitas podem estar presentes em uma única célula sanguínea infectada, porém a porcentagem de eritrócitos infectados varia durante o curso da infecção. Frequentemente, menos de 1% dos eritrócitos são parasitados no início da doença. Portanto, múltiplos esfregaços sanguíneos devem ser examinados durante vários dias, para a identificação efetiva do parasita. Se, entretanto, a suspeita de babesiose persiste, a despeito da ausência do parasita em esfregaços sanguíneos, o DNA babesial pode ser amplificado das amostras de sangue do paciente, usando, para isso, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Souza et al., 2000; Vannier et al., 2008).

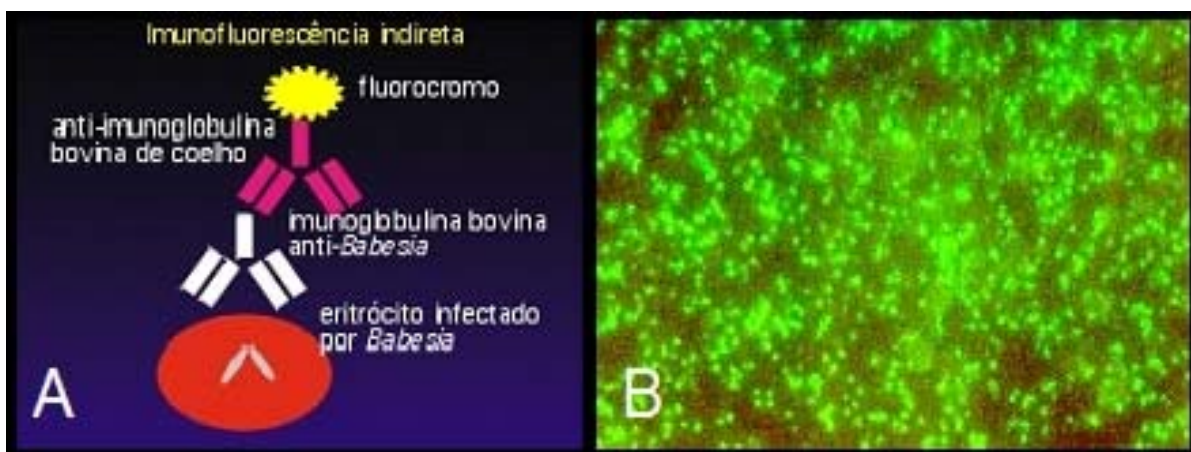


Figura 4 - A) Esquema da reação de imunofluorescência indireta. B) Microscopia da fluorescência da reação IFI para *Babesia*. Extraído de <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/naoseriadas/babesia/babesia.html>.

A sorologia também é utilizada na confirmação do diagnóstico de babesiose. Testes de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) podem ser utilizados para detecção de anticorpos anti-babesiais específicos (IgM e IgG) (Zintl et al., 2003). Nos testes de IFI, os anticorpos contra *Babesia* sp. são detectados por meio de uma anti-imunoglobulina de bovino, conjugada com um composto fluorescente (Figura 4A). Nas reações com resultados positivos, as células parasitadas, ligadas aos anticorpos anti-*Babesia*, exibem fluorescência esverdeada (Figura 4B).

Os estudos sorológicos são de extrema importância não só para o monitoramento das infecções causadas pelo parasita, como, também, para a adoção de estratégias adequadas no controle da doença (Soares et al., 2000; Juliano et al., 2007).

2.4. Principais babesicidas

Relatos na literatura referem-se a uma série de babesicidas eficazes no tratamento da babesiose. Atualmente, o aceturato de diminazeno e o dipropionato de imidocarb são os mais amplamente utilizados (Bock et al., 2004).

O aceturato de diminazeno tem sido utilizado como agente de primeira linha no tratamento de infecções ocasionadas por *B. gibsoni* em cães, tanto no Brasil quanto no Japão (Dantas-Torres e Figueredo, 2006; Sakuma et al., 2009). Embora, o aceturato de diminazeno tenha ação anti-*Babesia*, na maioria das vezes, ele não consegue eliminar esta espécie de *Babesia*, levando a ocorrência de recidivas (Sakuma et al., 2009). O aceturato de diminazeno também é utilizado contra infecções causadas por *B. bovis* e *B. divergens* em bovinos. Uma única aplicação, via subcutânea ou intramuscular, na dose de 2,5-3,5mg/kg de aceturato de diminazeno, tende a ser eficaz contra a infecção. Este fármaco, entretanto, pode ocasionar efeitos adversos como ataxia, depressão e convulsão (Brandão et al., 2003; Bock et al., 2004). Seu mecanismo de ação parece interferir na glicólise aeróbica e na síntese de DNA do parasita (Dantas-Torres e Figueredo, 2006).

Uma estratégia alternativa de tratamento proposta por Baggish e Hill (2002), consiste na combinação dos fármacos atovaquona (ATV), um análogo da ubiquinona e azitromicina (AZM); um antibiótico macrolídeo. O antiparasitário atovaquona apresentou excelente resultado contra duas espécies de *Babesia*, a *B. microti* e a *B. divergens*. A combinação ATV + AZM eliminou a parasitemia por *B. microti* em humanos e em *hamsters*. Estes dois fármacos parecem apresentar efeito sinérgico, ou seja, nenhum dos fármacos conseguiu eliminar a parasitemia causada por *Babesia* quando administrados separadamente (Birkenheuer et al., 2004). Segundo estudos realizados por Weiss et al. (2001), a combinação de AZM, na dose de 12mg/kg, e ATV na dose de 40mg/kg ao dia, em recém nascidos, foi efetiva no tratamento da babesiose, com o benefício de não ter sido detectado o aparecimento de efeitos tóxicos. Os autores também investigaram o efeito sinérgico da AZM com ATV em pacientes imunocomprometidos, portadores de HIV, obtendo resultados promissores quando utilizaram a combinação de 500 a 1000 mg de AZM ao dia, e 750mg de ATV, duas vezes ao dia.

Em 1982, foi utilizada pela primeira vez a combinação de clindamicina e quinona no tratamento da babesiose em um recém-nascido, que adquiriu a doença

por meio de transfusão sanguínea. Posteriormente, esta combinação se tornou o tratamento referencial para babesiose humana. Esta combinação, entretanto, na maioria das vezes, produz efeitos indesejáveis, tais como zumbido, vertigem e desarranjo gastrointestinal. A combinação de AZM e quinona tem sido utilizada alternativamente, em pacientes que não apresentavam melhora com a associação de clindamicina e quinona (Krause, 2003).

2.4.1. Dipropionato de imidocarb

O dipropionato de imidocarb (IMD) (Figura 5) foi licenciado por alguns países e introduzido no mercado na década de 1970. Assim que entrou em circulação, tornou-se rapidamente o produto de escolha no tratamento da babesiose animal, por apresentar ação terapêutica e também ação profilática contra *Babesia* sp. (Zintl et al., 2003).

O IMD [3,3-bis-(2-imidazolin-2-yl)carbanilida] é um derivado da carbanilida, altamente solúvel em água e tradicionalmente utilizado na medicina veterinária para o tratamento de infecções causadas por parasitas intracelulares, tais como *Babesia* sp. (Coldham et al., 1995; Rodrigues et al., 2006). Em 1989, o IMD foi utilizado no tratamento de mais de cinco milhões de bovinos em 57 países, sendo usado amplamente em espécies produtoras de alimentos (Coldham et al., 1994).

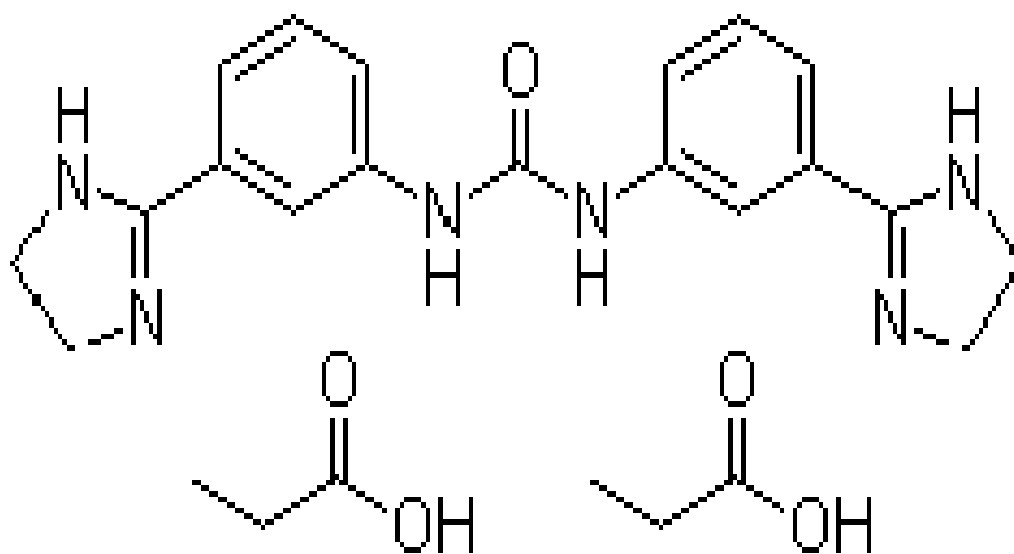


Figura 5 - Estrutura química do imidocarb - C₂₅H₃₂N₆O₅ - (Cas 55750-06-6, Riedel-de Haën #33441).

O IMD é o único fármaco com ação quimioprolática atualmente disponível no mercado. Ele fornece proteção contra doenças clínicas, por um período de 3 a 6 semanas, além de permitir um nível suficiente de infecção para o desenvolvimento da imunidade, o que é extremamente importante, principalmente nas regiões onde a babesiose é endêmica (Vial e Gorenflot, 2006). Este babesicida deve ser administrado por via intramuscular ou subcutânea, porém nunca por via endovenosa. A quimioterapia é geralmente efetiva contra babesiose bovina com a administração de IMD na concentração de 1 a 3 mg/kg. Na dose de 3 mg/kg, o IMD fornece proteção contra *B. bovis* por um período de 4 semanas e também contra a *B. bigemina*, por um período de 2 meses (Bock et al., 2004).

Os efeitos colaterais do IMD incluem vômitos, diarreia, tosse, tremores musculares, salivação, cólicas e irritação no local da injeção (Zintl et al., 2003). Para evitar estes efeitos colinérgicos adversos é recomendado a administração de atropina, na concentração de 0,04 mg/kg, 10 minutos antes da aplicação do IMD (Dantas-Torres e Figueredo, 2006).

Existem também relatos sobre a retenção de resíduos do IMD pós-tratamento quimioterápico, em tecidos comestíveis de animais, tais como fígado, rins e músculos. Essa retenção pode ocorrer por até seis meses após sua administração. São insuficientes as informações sobre a cinética da degradação do IMD, entretanto, sabe-se que os resíduos metabólicos deste fármaco são depositados no fígado e no rim, o que pode resultar na necrose destes tecidos. (Coldham et al., 1994; Souza et al., 2004).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2008), é obrigatório para todos os fármacos da classe dos antiparasitários que o fabricante de tais medicamentos indique no rótulo, na bula e na caixa do produto, o período de retirada (ou de carência) para cada espécie animal. Este período tem como objetivo evitar a presença de resíduos do produto veterinário nos alimentos como carne, leite, ovos, pescado e mel, acima do permitido e considerado prejudicial à saúde humana. Os limites máximos de resíduos (LMRs) são fixados com base em análises da substância ativa do produto veterinário usado para tratar ou prevenir doenças dos animais.

O período de carência estipulado pelo fabricante (Intervet do Brasil Veterinária Ltda) é de 28 dias após a última administração, isto é, os bovinos

tratados com IMD (Imizol®) só poderão ser abatidos após este período. O período de carência para o consumo de leite de vacas tratadas com este fármaco é de dois dias após a última administração (CPVS – Compêndio de Produtos Veterinários).

Adicionalmente, a retenção de xenobióticos nos tecidos animais depende de muitos fatores, tais como: a ligação da droga à macromoléculas celulares e a biotransformação da droga em metabólitos solúveis em água (Coldham et al., 1994).

Estudos realizados sobre a farmacocinética do IMD em cães demonstram que a meia-vida plasmática deste fármaco é de 207 minutos, sendo 80% dele eliminados em 8 horas. Sua eliminação parece ser por meio da urina e das fezes. Entretanto, altas concentrações deste antiparasitário podem ser encontradas no fígado e no rim dos animais (Dantas-Torres e Figueredo, 2006).

Segundo Aliu e colaboradores (1977), com base em estudos realizados em ovinos, o IMD foi eliminado rapidamente do plasma, no entanto, permaneceu detectável em muitos tecidos um mês após uma única administração intramuscular. Coldham e colaboradores (1994), posteriormente, demonstraram que o IMD em bovinos poderia ser detectado também no fígado, até 224 dias após uma única dose intramuscular, apresentando uma meia-vida de 42.7 dias.

A dificuldade em detectar os metabólitos do IMD na bile, urina, fígado e rins, bem como sua retenção prolongada no fígado, rins e nos músculos, sugerem um metabolismo mínimo do IMD em ovinos. Adicionalmente, em bovinos, poucas evidências foram observadas no metabolismo do IMD, em estudos realizados *in vitro* (Aliu et al., 1977). Já estudos de resíduos *in vivo* também demonstraram retenção prolongada do IMD em tecidos comestíveis de bovinos, sugerindo a baixa taxa no metabolismo deste fármaco (Moore et al., 1996).

O mecanismo de ação do IMD baseia-se na indução de alterações morfológicas e funcionais do núcleo e do citoplasma do parasita (Silva et al., 2008). No entanto, a toxicidade seletiva do IMD não está totalmente clara, mas sabe-se que possui uma relação estrutural com as poliaminas, interferindo na produção e/ou na utilização destas moléculas, as quais estão envolvidas no metabolismo dos ácidos nucléicos (Coldham et al., 1995; Dantas-Torres e Figueredo, 2006).

A poliamina alifática, ou simplesmente poliamina, é derivada da ornitina, após a etapa de descarboxilação inicial (ODC), sendo utilizada para designar três outras substâncias, tais como: espermidina, espermina e putrescina (Moinard et al., 2005). As poliaminas são polications alifáticos presentes em todas as células e

desempenham um papel regulatório na síntese de macromoléculas e na taxa de proliferação celular. A indução da biossíntese das poliaminas precede à síntese de ácidos nucleicos, como, também, a síntese protéica. (Medina et al., 2005).

A presença de níveis elevados de poliaminas em células com rápida atividade de crescimento sugere que tais polycations podem interagir diretamente com os ácidos nucleicos (Medina et al., 2003). Os fosfatos, presentes nesses mesmos ácidos, podem atuar como alvos importantes nas interações DNA-poliaminas (espermina e espermidina), embora não se possa excluir a interação das poliaminas com as bases nitrogenadas. De fato, diferentes graus de afinidade das poliaminas pelos dinucleotídeos CG e AT foram observados (Deng et al., 2000).

A condensação do DNA induzida pelas poliaminas pode estar relacionada com as valências desses cátions, neutralizando a carga negativa dos fosfatos dos ácidos nucleicos. A espermina, em detrimento das poliaminas putrescina e espermidina, é mais eficaz em estabilizar e condensar o DNA. (Vijayanathan et al., 2001).

Segundo Bloomfield (1997), cátions análogos às poliaminas podem, da mesma forma, auxiliar na compactação do DNA celular, levando à redução da energia livre de transcrição. O DNA compactado apresenta uma característica morfológica toroidal, semelhante a um “*doughnut*”, que é estabilizada por pontes dissulfeto, tornando o núcleo mais compacto e hidrodinâmico. Além disso, essa extrema condensação protege o DNA da ação de agentes mutagênicos, radicais livres e nucleases (Feuerstein et al., 1989, Bloomfield et al., 1997).

Embora o IMD seja um babesicida efetivo e amplamente utilizado nos países em que é licenciado, a semelhança estrutural entre este composto e as poliaminas, sugere a existência de possíveis efeitos genotóxicos decorrentes da ação do IMD, uma vez que as poliaminas apresentam efeitos inibitórios no metabolismo dos ácidos nucleicos e na síntese de proteínas, podendo ainda competir com o IMD pelo mesmo sítio de ligação ao DNA (Bacchi et al., 1981; Coldham et al., 1995).

2.5. Recombinação mitótica

O ciclo de divisão celular, crucial para o desenvolvimento dos organismos eucarióticos (Kee et al., 2011), é regulado por uma seqüência organizada de

eventos, que assegura a cada célula-filha, um conjunto cromossômico balanceado e completo, necessário à sua sobrevivência (Lehninger, 2011).

O material genético celular está continuamente sujeito a lesões, de efeito direto ou indireto, oriundas de fontes exógenas e endógenas. Em resposta a estes danos, o DNA possui mecanismos de reparo que garantem a manutenção da integridade do genoma, promovendo a reparação e/ou a tolerância de lesões genotóxicas. Quando estes mecanismos de reparo falham, mutações potencialmente nocivas, como também rearranjos cromossômicos, são acumulados na molécula do DNA (Goldman et al., 2002).

As mutações espontâneas, bem como aquelas induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos geram instabilidade genômica e, em função disto, podem ser cruciais nos processos iniciais da carcinogênese (www.inca.gov.br).

Dois eventos cromossômicos estão envolvidos no desenvolvimento de neoplasias: a) a alteração genética ou epigenética que implica em uma condição heterozigota pré-maligna (m/+) e b) um rearranjo cromossômico envolvendo o *locus* afetado, que resulta na expressão do caráter maligno recessivo, devido à indução de homozigose (m/m) ou hemozigose (m/0) do alelo mutante (Beumer et al., 1998).

A perda da heterozigosidade, isto é, a perda do alelo funcional em um *locus* heterozigoto, pode originar-se através de vários mecanismos, tais como: deleção, recombinação mitótica, não-disjunção cromossômica, conversão gênica, mutação de ponto ou mecanismo ou mesmo inativação alélica epigenética (Yischifield, 1997). A segregação das cromátides irmãs constitui um processo fundamental da divisão celular, onde cada célula filha recebe uma cópia de cada cromátide. Eventualmente, entretanto, as cromátides homólogas podem estabelecer contatos entre si, levando ao processo de permuta mitótica, provavelmente em decorrência de quebras cromossômicas (Zimmermann, 1971). A segregação de uma cromátide paternal e uma recombinante, para o mesmo pólo mitótico, pode originar células homozigotas para os genes distais ao ponto de permuta. Assim, uma das conseqüências do *crossing-over* mitótico em células diplóides heterozigotas é a indução da homozigose de genes, processo este denominado de perda da heterozigosidade (Zimmermann, 1971; Chua e Jinks-Robertson, 1991; Helleday, 2010). A perda da heterozigosidade pode envolver grandes segmentos ou até mesmo braços inteiros de cromossomos, ocasionando perda substancial de informação genética. Estas

alterações são comumente observadas no processo de tumorigênese (Stark e Jasin, 2003).

Três tipos de segregação podem ocorrer na mitose: i) a segregação x, resultante da segregação das cromátides recombinantes para pólos opostos. Esta segregação faz com que a recombinação mitótica seja uma ferramenta útil para análise do genótipo mosaico (Figura 6), ii) segregação y, que ocorre devido a uma falha na segregação das cromátides irmãs, as quais segregam juntas para a mesma célula filha. Esta segregação é equivalente à divisão reducional da meiose I e não é observada com freqüência e iii) segregação z, quando as duas cromátides recombinantes migram para o mesmo pólo mitótico (Figura 6). A perda da heterozigosidade, como consequência do *crossing-over* mitótico, é resultante da segregação do tipo x (Chua e Jinks-Robertson, 1991; Beumer et al., 1998).

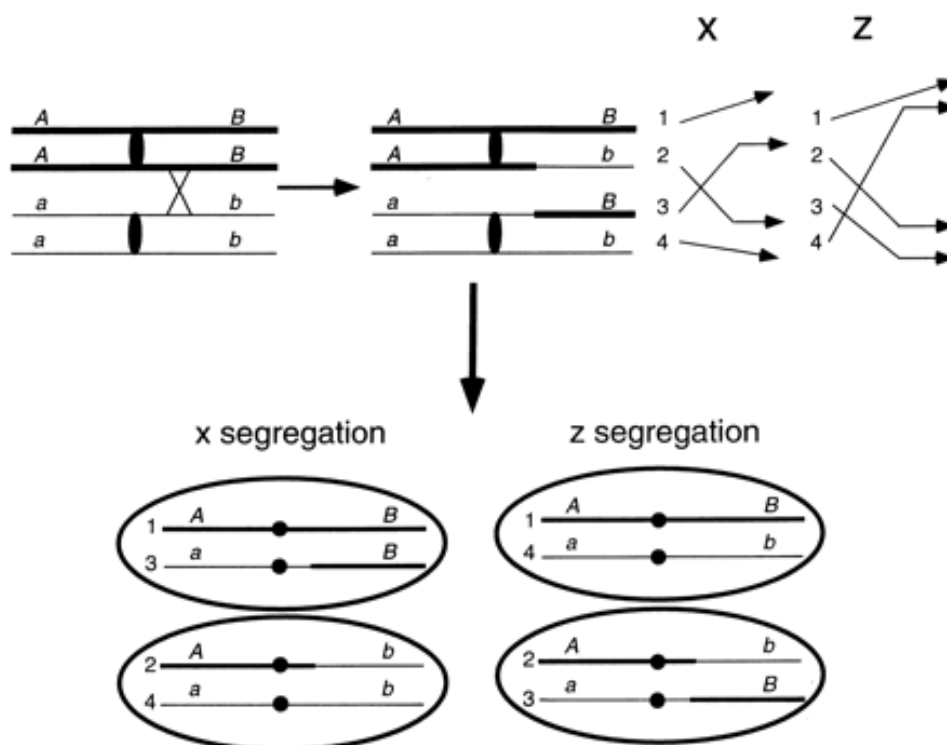


Figura 6 - Esquema das Segregações mitóticas X e Z, conforme proposto por Beumer et al. (1998).

Segundo Meadows et al. (2011), a perda da heterozigosidade tem sido associada ao desequilíbrio alélico e à indução de homozigose de alelos mutantes de genes supressores de tumor (m/m), previamente presentes em heterozigose (m^+/m).

O gene supressor de tumor RB1 codifica a proteína pRb, que na presença de uma lesão na molécula de DNA desempenha papel fundamental na regulação do

ciclo celular, impedindo a passagem da fase G1 para a fase S. Isto ocorre devido à associação de pRb, em sua forma não fosforilada, ao fator de transcrição E2F, que por sua vez, não estimula a transcrição de genes necessários à síntese de DNA. Por outro lado, na ausência de danos no DNA, a associação pRb-E2F não ocorrerá em função da fosforilação de pRb pela ciclina E-CDK2. (Figura 7) (Lehninger, 2011).

Alelos mutantes do gene RB1 já foram observados em vários tipos de tumores humanos, quando presentes em homozigose (m/m) ou hemozigose (m/0). A primeira associação entre perda de heterozigidade e tumorigênese resultou da análise molecular de um retinoblastoma familiar (Figura 8). Neste tipo de neoplasia, a recombinação somática contribui com cerca de 75% dos eventos de perda da heterozigidade (Lasko et al., 1991; Rousseau-Nerck et al., 1999; Vrieling, 2001; Moynahan e Jasin, 2010; Berge et al., 2010; Berge et al., 2011; Coschi et al., 2010).

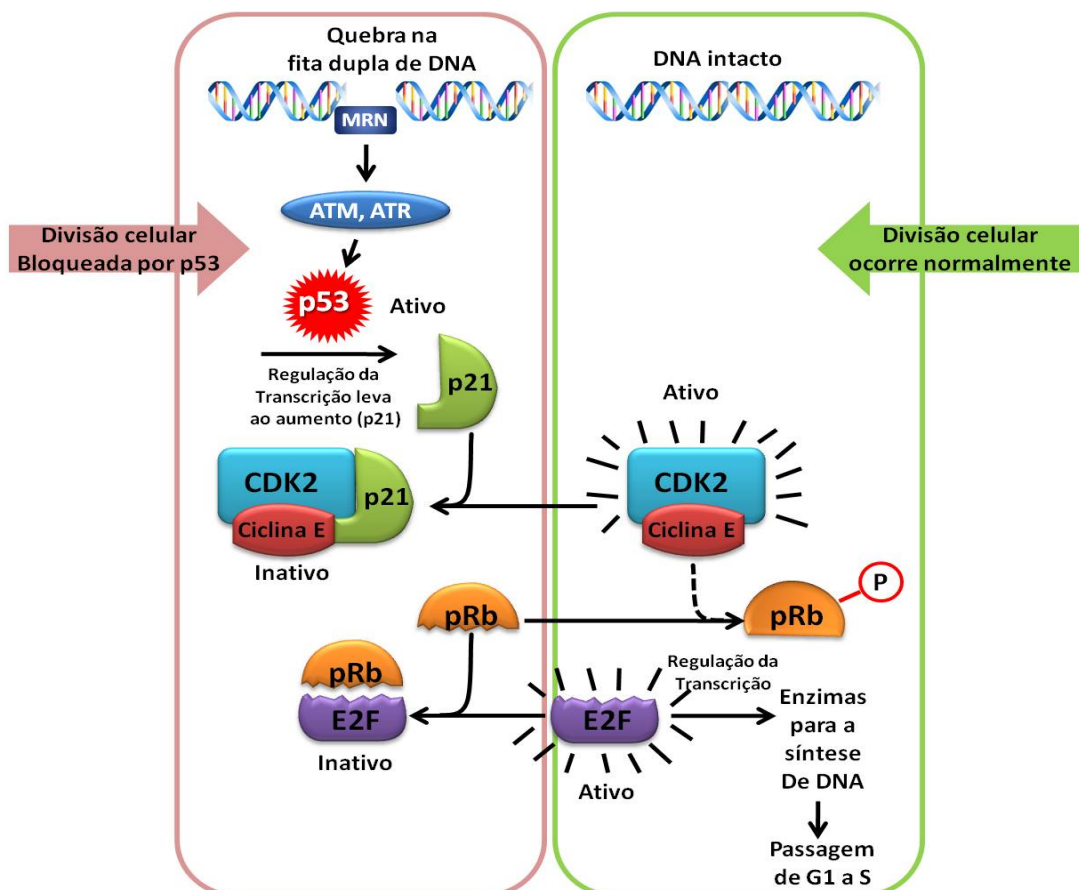


Figura 7 - Esquema da regulação da passagem da fase G1 para a fase S através da fosforilação da proteína pRb. MRN; ATM; ATR; p53: Proteína codificada pelo gene supressor de tumor, p21: Proteína supressora de tumor, CDK2: Proteína-cinase dependente de ciclina, Ciclina E, E2F: Fator de transcrição; Adaptado de Lehninger (2011).

A neurofibromatose tipo 1 é uma doença autossômica dominante, caracterizada pela formação de tumores complexos e multicelulares, denominados neurofibromas. De maneira geral, a perda somática do alelo selvagem do gene supressor de tumor $NF1^+$, em uma célula heterozigota ($NF1^+/NF1$), pode ocorrer tanto na célula de Schwann quanto em sua célula precursora (Gottfried et al., 2010).

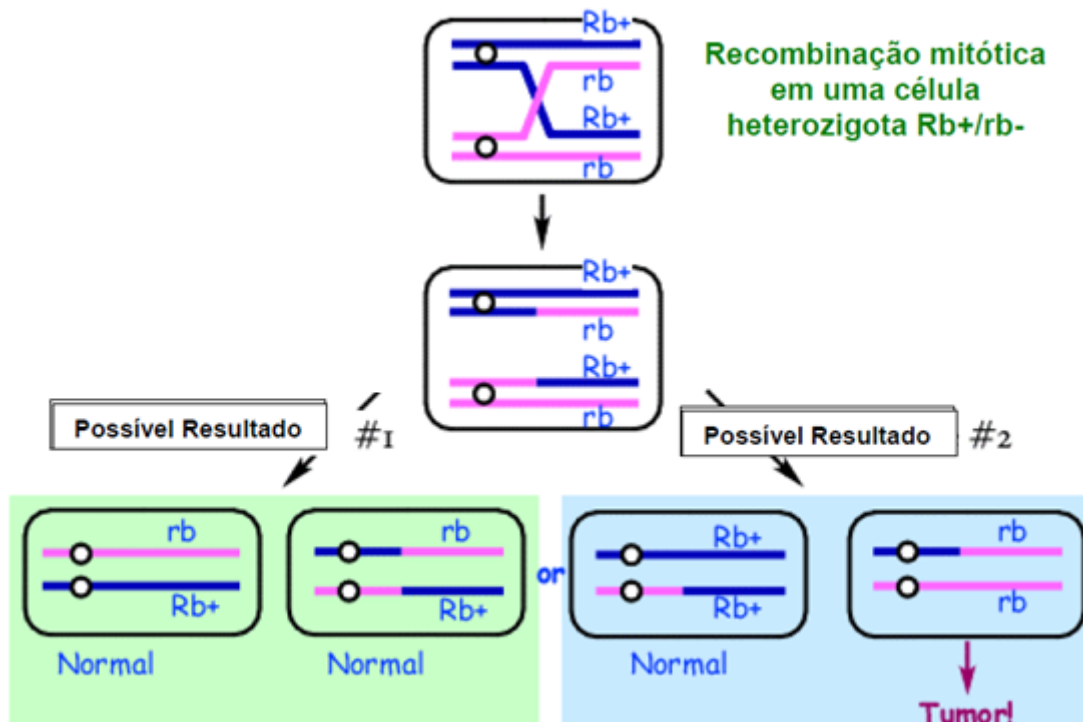


Figura 8 - Esquema da perda da condição de heterozigose (Rb^+/rb) e origem de células homozigotas (Rb^+/Rb^+ e rb/rb), por meio do *crossing-over* mitótico. Adaptado de Griffiths et al. (2001).

Análises de neurofibromas, derivados de células de Schwann homozigotas para um alelo mutante do gene $NF1$, demonstraram que a recombinação mitótica era o processo responsável pela perda da heteroziguidade de quase todo o braço longo do cromossomo 17. Neste caso, o *crossing-over* ocorreu provavelmente entre o centrômero e o *locus* do gene $NF1$ (Serra et al., 2001).

A Anemia de Fanconi é uma doença autossômica recessiva, ligada ao cromossomo X e causada por mutações bialélicas em pelo menos um dos treze genes FA. As células de indivíduos afetados apresentam altas frequências de quebras cromossômicas, recombinação somática e predisposição ao desenvolvimento de neoplasias. A perda da heteroziguidade em determinados

genes FA, por meio da recombinação em células somáticas, tem sido associada à elevada incidência de cânceres em pacientes portadores desta enfermidade (Thyagarajan e Campbell, 1997; Hucl e Gallmeier, 2011).

2.6. *Aspergillus nidulans* e ciclo parassexual

O fungo filamentosso *Aspergillus nidulans* é homotático, possui oito cromossomos geneticamente definidos e é considerado um excelente organismo para a realização de estudos sobre o potencial carcinogênico de substâncias químicas (Franco et al., 2007). Isto se deve a dois importantes fatores: i) a mitose em *A. nidulans* é muito semelhante à mitose de eucariotos superiores e ii) as células de *A. nidulans* passam a maior parte de seus ciclos no período G2. Nesta fase, os cromossomos apresentam-se duplicados, favorecendo o *crossing-over* mitótico (Busso e Castro-Prado, 2003; Souza-Júnior et al., 2007).

Diferentemente da maioria dos fungos filamentosso, o *A. nidulans* apresenta três ciclos de proliferação: assexual, sexual e parassexual. Dentre estes, apenas os ciclos sexual e parassexual favorecem a variabilidade genética (Roper, 1952; Kafer, 1961).

A recombinação mitótica neste ascomiceto foi demonstrada através do ciclo parassexual por Pontecorvo et al. (1953). Posteriormente, o ciclo parassexual foi identificado em mais de 40 espécies de fungos (Caten, 1981; Azevedo et al., 2008). Este ciclo envolve, essencialmente, a anastomose entre hifas de homocários geneticamente distintos, resultando em um micélio formado por dois núcleos haplóides diferentes (micélio heterocariótico). A fusão de dois núcleos diferentes resulta em um núcleo diplóide heterozigoto. Este núcleo, após sofrer sucessivas divisões mitóticas, pode retornar ao estado haplóide, através do processo de não-disjunção mitótica (Figura 9) (Pontecorvo et al., 1953; Debets, 1998).

Durante o crescimento do micélio heterocariótico, a probabilidade de núcleos haplóides distintos fundirem-se, formando assim núcleos diplóides heterozigotos, é de 10^{-6} e a probabilidade de recombinantes haplóides surgirem é de 10^{-3} (Schoustra et al., 2007).

Em algumas espécies de fungos, os núcleos diplóides são muito instáveis e podem sofrer haploidização e/ou troca mitótica ainda no interior das hifas heterocarióticas. Este processo, denominado paramiose, é uma variação do ciclo

parassexual e pode resultar na formação de haplóides recombinantes, diretamente do heterocário, sem a recuperação da fase diplóide (Ball e Hamlyn, 1982; Baptista et al., 2003).

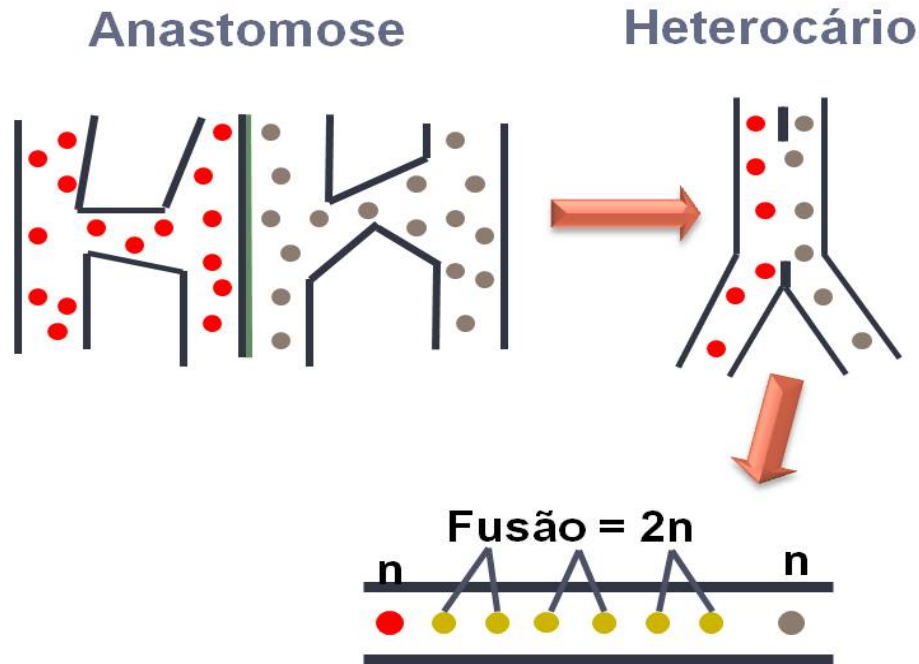


Figura 9 - Esquema do ciclo parassexual.

Pires e Zucchi (1994) desenvolveram um sistema biológico, denominado *Ensaio de Homozigotização* (HI), específico para o estudo do potencial recombinagênico de substâncias químicas. Este ensaio utiliza uma ou mais linhagens diplóides de *A. nidulans* heterozigotas para vários marcadores genéticos e detecta a homozigose de genes recessivos, resultante do *crossing-over* mitótico. Estas linhagens possuem marcadores nutricionais e de coloração de conídios bem caracterizados e previamente mapeados. Os eventos de recombinação tornam-se evidentes através da determinação do Índice de Homozigotização (HI) para cada um dos marcadores nutricionais das linhagens diplóides heterozigotas.

Considerando-se, portanto, a associação entre a recombinação mitótica e tumorigênese, o efeito inibitório do IMD na síntese de DNA (Nott et al., 1990) e a escassez de informações sobre a genotoxicidade do IMD, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial recombinagênico do IMD em uma linhagem diplóide heterozigota de *A. nidulans*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da linhagem diplóide UT448//A757

Os genótipos e as origens das linhagens de *A. nidulans* utilizadas no presente estudo encontram-se no Quadro 1. A linhagem diplóide UT448//A757 (Figura 10) foi obtida segundo metodologia descrita por Roper (1952), cuja técnica consiste, inicialmente, na obtenção do heterocário (presença de núcleos distintos em um citoplasma comum). O heterocário é formado quando conídios das linhagens UT448 (com conídios brancos; y^+, w) e A757 (com conídios amarelos; y, w^+) são co-inoculados em Meio Mínimo líquido. Posteriormente, a massa micelial formada (heterocário) é inoculada em placas de petri contendo Meio Mínimo (MM) e estas, por sua vez, são incubadas a 37°C durante cinco dias. Ao final desse período, observa-se, a partir do heterocário, algumas regiões/setores de crescimento vigoroso, homogêneo e com conídios verdes. Estes setores consistem em prováveis diplóides ($y^+, w//y, w^+$), uma vez que o gene w^+ é epistático sobre os alelos y^+ e y . As regiões com conídios verdes são transferidas para novas placas, contendo MM e novamente incubadas a 37°C por cinco dias, para que haja a confirmação de prototrofia destes conídios, resultantes da condição heterozigota dos marcadores nutricionais. O crescimento dos conídios verdes ($y^+, w//y, w^+$) em MM confirma a condição diplóide (UT448//A757) dos mesmos. Os diplóides obtidos são estocados em MM a 5°C.

Quadro 1 - Genótipo e origem das linhagen de *A. nidulans*

Linhagem	Genótipo	Origem
A757	$yA2$ (I), $methA17$ (II), $pyroA4$ (IV).	FGSC*
UT448	$riboA1$ (I), $pabaA124$ (I), $biA1$ (I), $AcrA1$ (II), $wA2$ (II)	Utrecht**

Requerimentos nutricionais para: riboflavina= *riboA1*, ácido p-aminobenzóico= *pabaA124*, biotina= *biA1*, metionina= *methA17*, pirodoxina= *pyroA4*. Coloração de conídios: branco= *wA2*, amarelo= *yA2*, *AcrA1*, resistência à acriflavina. *FGSC= Fungal Genetic Stock Center. University of Kansas Medical Center. Kansas. USA.**Utrecht, Holanda. Os parênteses representam os cromossomos I, II, e IV de *A. nidulans*.

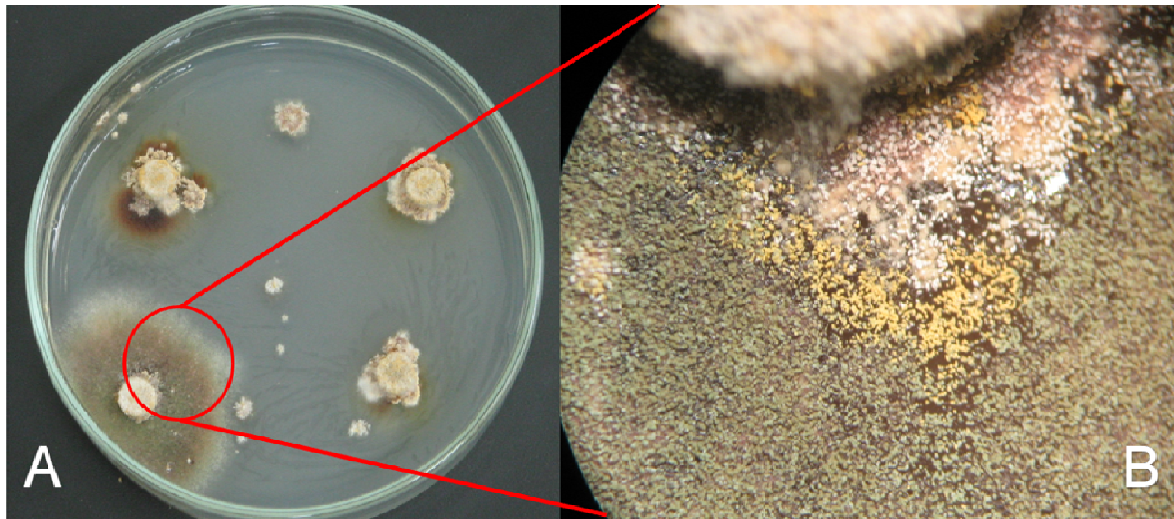


Figura 10 - Origem da linhagem diplóide UT448//A757. A) Placa de petri contendo MM com 4 discos de heterocáριο. B) Em maior aumento observam-se os parentais UT448 (conídios brancos), A757 (conídios amarelos) e em verde o diplóide UT448//A757 denominado PAS (conídios verdes).

3.2. Meios de cultura

3.2.1. Meio mínimo (MM)

Adiciona-se 900 mL de água destilada, 100 mL da solução concentrada de MM (1000 mL de água destilada; 60,0 g de NaNO₃; 15,2 g de KH₂PO₄; 5,2 g de MgSO₄ . 7 H₂O; 5,2 g de KCl; 0,02 g de FeSO₄ . 7 H₂O; 0,01 g de CuSO₄ . 5 H₂O; 0,01 g de ZnSO₄ . 7 H₂O); 10 g de glicose, 15 g de ágar.

3.2.2. Meio completo (MC):

Adiciona-se ao MM: peptona (2.000 mg/L⁻¹), extrato de levedura (500 mg/L⁻¹), casaminoácido (1.000 mg/L⁻¹) e solução de vitaminas (1.000 µg/L).

3.2.3. Meio suplementado (MS)

Adiciona-se ao MM os nutrientes requeridos pelas linhagens UT448 e A757, [riboflavina (0,1 µg/ml⁻¹), ácido *para*-aminobenzóico (0,6857 µg/ml⁻¹), biotina (0,02 µg/ml⁻¹), metionina (149,21 µg/ml⁻¹) e pirodoxina (0,05 µg/ml⁻¹), omitindo-se um dos nutrientes em cada tipo de meio.

O pH dos meios de cultura foi ajustado ao valor 6,0. Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C a uma atmosfera de pressão, durante 20 minutos, e

após este período foram distribuídos em placas de petri de 90 x 15 mm. A temperatura de incubação para o crescimento das linhagens foi de 37°C.

3.3. Tratamento do diplóide UT448//A757 com dipropionato de imidocarb (IMD)

Três concentrações do antiparasitário dipropionato de imidocarb (Imizol®) foram utilizadas no presente estudo, 2,5 µM, 5 µM e 10 µM, as quais apresentaram capacidade de ligação ao DNA de bovinos (Moore et al., 1996). O composto foi adicionado ao MM fundido, após ser solubilizado em H₂O destilada.

3.4. Avaliação da citotoxicidade do IMD

Conídios do diplóide UT448//A757 foram inoculados no centro de placas de petri contendo MM (controle) e MM + IMD (tratamento). Foram utilizadas dez placas para cada concentração (2,5 µM, 5 µM e 10 µM) e para o controle, as quais foram incubadas a 37°C. Os diâmetros das colônias foram medidos, com o auxílio de uma régua, após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de incubação. Os valores obtidos na presença e na ausência da droga foram comparados estatisticamente utilizando-se o teste *t* de Student, para $p < 0,05$.

3.5. Seleção dos segregantes haplóides

Conídios da linhagem diplóide UT448//A757 foram inoculados em placas de petri, contendo MM (controle negativo), MM + IMD, nas concentrações de 2,5 µM, 5 µM e 10 µM (tratamento) e MM + benznidazol (100µM) (controle positivo). Kaneshima e Castro-Prado (2005) observaram em seus estudos o efeito recombinagênico do benznidazol (antiparasitário) em células de *A. nidulans*. As placas foram incubadas por cinco dias em temperatura de 37°C. Os tratamentos originaram segregantes, ou setores, mitóticos diplóides nas colônias da linhagem diplóide original (UT448//A757) (Figura 11A).

Um segregante mitótico foi isolado do tratamento com benznidazol (D3) e nove segregantes foram isolados do tratamento com IMD: os diplóides D4 a D6 foram obtidos com 10µM de IMD, os diplóides D7 a D9, foram obtidos com 5µM de IMD e os diplóides D10 a D12, com 2,5 µM de IMD. Após a purificação em MM (Figura 11B), os diplóides não-tratados (controle, D1 e D2), e os tratados D4 a D12,

foram transferidos para placas contendo MC + *benomyl* (0.2 µg/ml) (agente haploidizante) (Figura 11C), para haploidização e obtenção dos segregantes haplóides parassexuais.

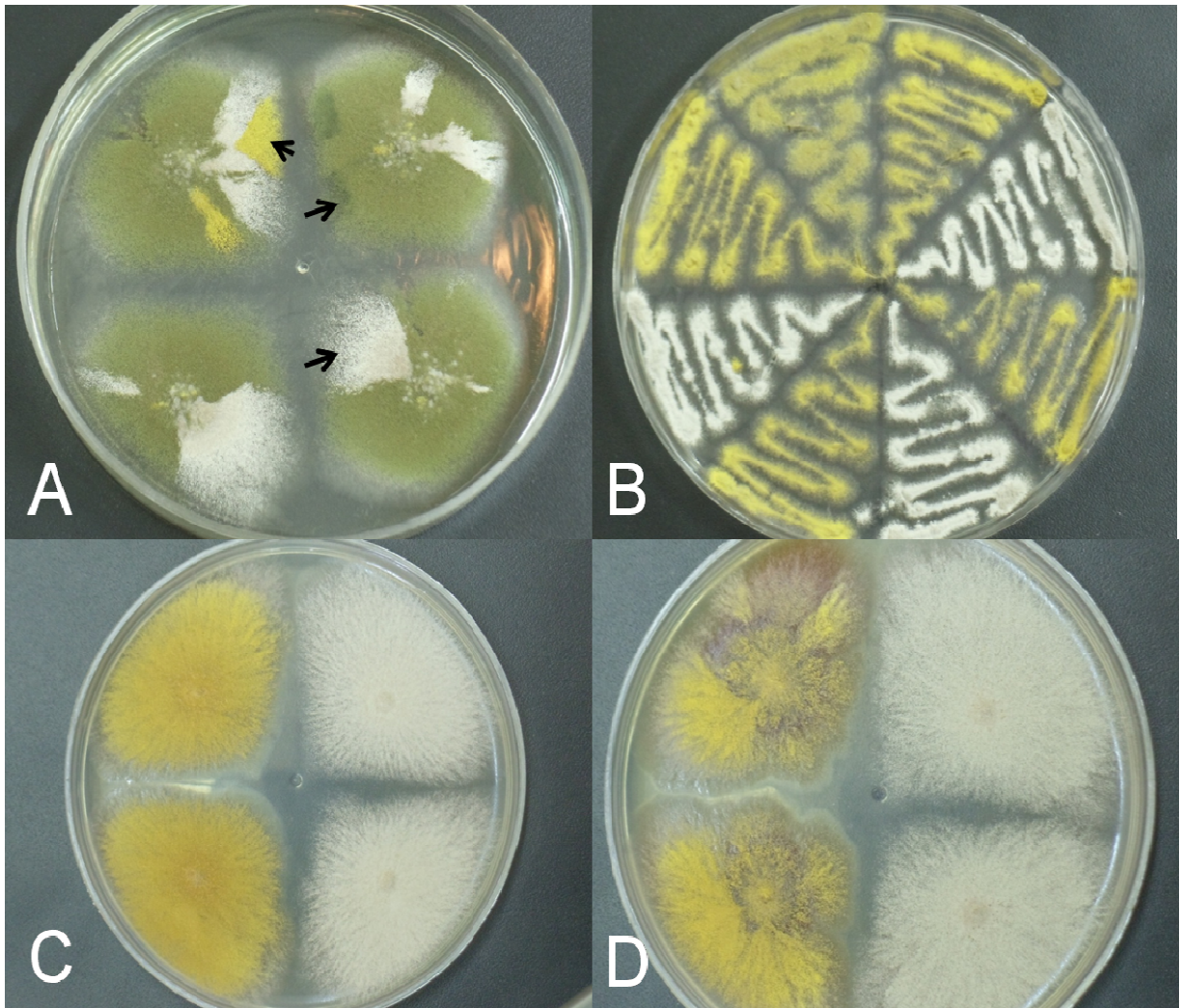


Figura 11 - Seleção dos segregantes haplóides. A) Haploidização do diplóide D6 (obtido com 10µM de IMD) em MC+benomyl (seta). B) Purificação dos setores (segregantes mitóticos) em meio MC. C) Segregantes haplóides, estáveis em MC+benomyl. D) Segregantes aneuplóide (à esquerda) e haplóide (à direita), derivados do diplóide cultivados em presença de benomyl.

Para a realização dos testes de recombinação, somente os segregantes haplóides derivados dos diplóides tratados (D3 a D12) e não tratados (D1 e D2) foram utilizados (Figura 11D). Durante o desenvolvimento dos núcleos diplóides, que ocorre através de mitoses sucessivas, o processo de não-disjunção cromossômica pode ocorrer originando núcleos aneuplóides ($2n-1$; $2n-2$, etc), extremamente

instáveis, que seguem perdendo cromossomos ao acaso, até que o estado haplóide seja novamente alcançado (PonteCorvo e Kafer, 1958).

A identificação dos segregantes haplóides foi realizada através do teste de instabilidade mitótica, que consiste em inocular os segregantes mitóticos, obtidos em MM + benomyl, em placas de petri contendo MC + benomyl (0,2 µg/mL). Aqueles que se apresentarem instáveis na presença de benomyl, originando novos setores em suas colônias, foram caracterizados como aneuplóides e descartados da amostra. Por outro lado, os segregantes que se mantiveram estáveis mitoticamente foram considerados haplóides e selecionados para a análise fenotípica (Franzoni et al., 1997).

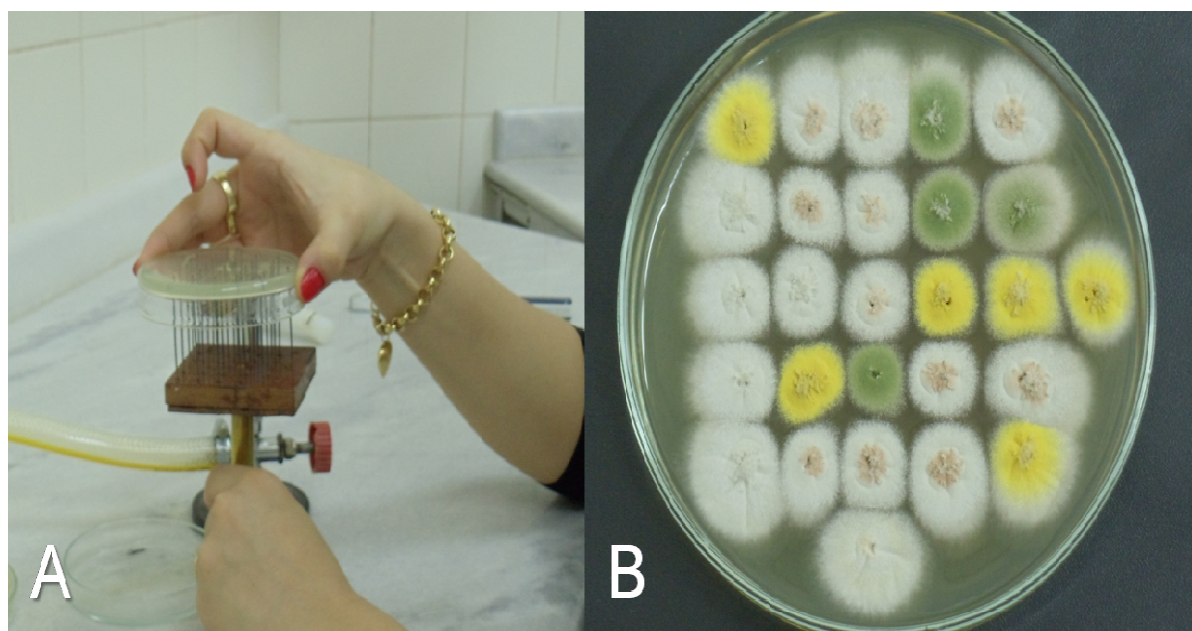


Figura 12 - Instabilidade Mitótica. A) Marcação das placas de petri contendo MC com replicador contendo 25 posições + duas posições para os paternos. B) Conídios dos setores haplóides selecionados inoculados em MC para posterior análise fenotípica.

Os conídios de cada setor haplóide foram transferidos, um a um, para posições definidas em placas contendo MC (modelo 5x5) (Figura 12). Após 48 horas de incubação a 37°C, as colônias foram replicadas para meios seletivos apropriados, visando à caracterização fenotípica dos segregantes haplóides. Os meios seletivos foram preparados por meio da suplementação do MM com os nutrientes requeridos pelas linhagens UT448 e A757, omitindo-se um dos nutrientes em cada tipo de meio.

3.6. Ensaio de homozigotização

O Índice de Homozigotização (HI) para um determinado marcador nutricional é definido pelo quociente entre o número de segregantes haplóides prototróficos e o número de segregantes auxotróficos (Pires e Zucchi, 1994) (Figura 13). O *crossing-over* mitótico induz a homozigotização de genes presentes originalmente em heterozigose. Desta forma, se o tratamento do diplóide UT448//A757 com IMD induzir o *crossing-over* mitótico, apenas diplóides prototróficos heterozigotos (+/- ou -/+) ou homozigotos (+/+) serão obtidos, uma vez que os diplóides auxotróficos (-/-) não se desenvolvem em MM. Neste caso, a haploidização destes diplóides produzirá haplóides prototróficos e auxotróficos na proporção 4:2, originando um valor de HI igual ao valor 2,0. Por outro lado, na ausência de *crossing-over*, os valores de HI serão inferiores a 2,0. No ensaio de Homozigotização, valores de HI menores que 2,0 indicam ausência de *crossing-over* para um determinado gene. Em contrapartida, HIs maiores que 2,0 indicam a ocorrência de mais de um evento de recombinação, envolvendo um determinado marcador.

$$HI = \frac{\text{N}^\circ \text{ segregantes prototróficos}}{\text{N}^\circ \text{ segregantes auxotróficos}}$$

Figura 13 - Fórmula para cálculos dos valores do Índice de homozigotização.

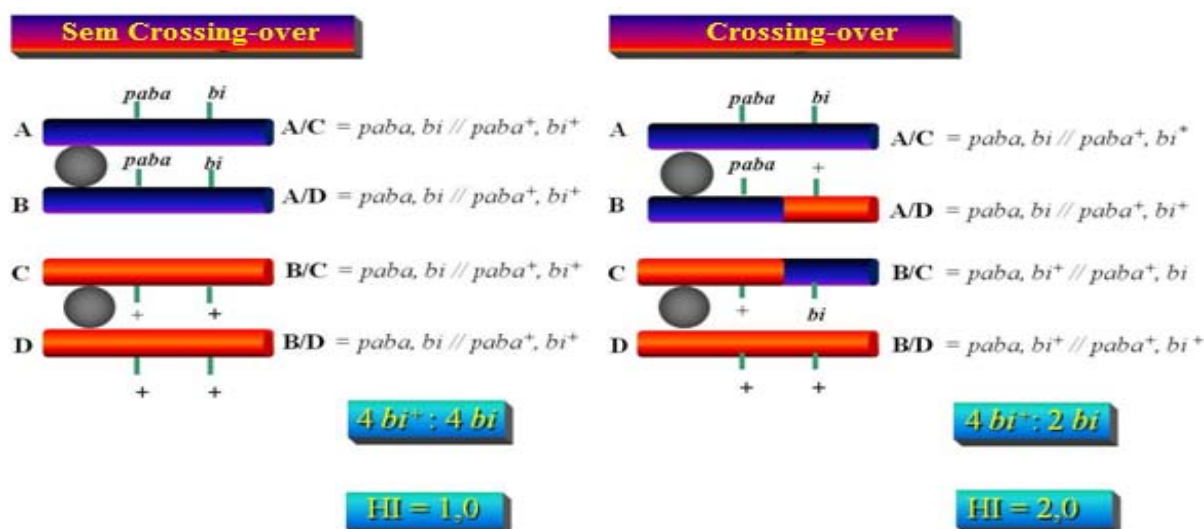


Figura 14 - Origem dos diplóides heterozigotos (-/+ e +/-) e homozigoto (+/+) resultantes do *crossing-over* mitótico entre os genes *paba* e *bi*. *Diplóides homozigotos (-/-) não são selecionados em MM.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do potencial recombinagênico de compostos químicos, por meio da indução de homozigose de alelos mutantes, tem permitido a identificação de diversas classes de compostos com efeito genotóxico (Pires e Zucchi, 1994; Miyamoto et al., 2007; Franco et al., 2010). No presente estudo, o ensaio de homozigotização realizado com o IMD, nas concentrações de 10 μ M, 5 μ M e 2,5 μ M, demonstrou que este babesicida é um potente indutor da recombinação mitótica em células de *Aspergillus nidulans*. Por outro lado, o crescimento micelial do diplóide UT448//A757, tratado com as concentrações de IMD acima citadas, não foram estatisticamente diferente do controle, uma vez que as colônias dos diplóides tratados não apresentaram alterações morfológicas distintas dos diplóides controle (não tratados com o IMD). Desta forma as concentrações de IMD utilizadas (10 μ M, 5 μ M e 2,5 μ M) foram caracterizadas como não-citotóxicas (Figura 15).

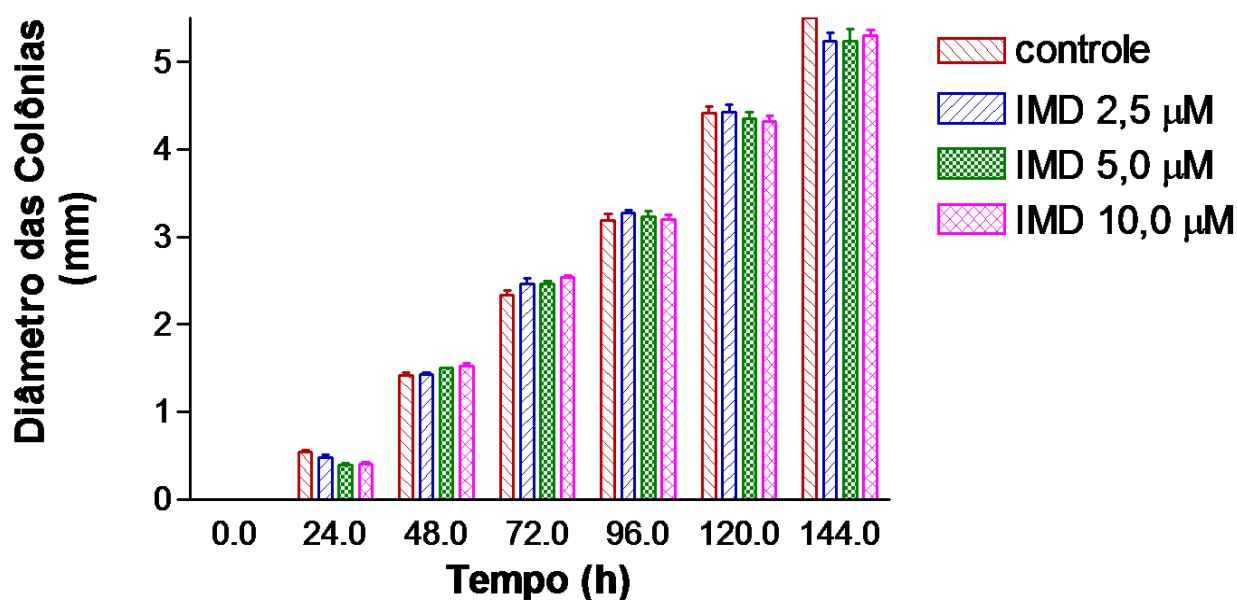


Figura 15 - Crescimento micelial do diplóide UT448//A757 em MM (controle), MM +2,5 μ M, 5 μ M e 10 μ M de IMD.

Os valores de HI para quaisquer marcadores nutricionais de uma linhagem heterozigota de *A. nidulans*, após sofrerem pelo menos um evento de *crossing-over* mitótico, serão iguais a 2,0 (o valor de HI é determinado pela razão entre o número

de segregantes prototróficos e o número de segregantes auxotróficos) (Pires e Zucchi, 1994). Por outro lado, valores de HI superiores a 2,0 indicam a ocorrência de mais de um evento de *crossing-over* mitótico no intervalo entre um determinado marcador genético e o centrômero (Stoll et al., 2008). O ensaio de homozigotização não permite a seleção de diplóides auxotróficos homozigotos (-/-), uma vez que estes diplóides não crescem em MM. Apesar disto, diplóides homozigotos para os marcadores de coloração de conídios (*y* e *w*) podem ser selecionados em MM, desde que estes sejam prototróficos (Franco et al., 2010).

Para que se possa avaliar o potencial recombinagênico de um composto, por meio do ensaio de homozigotização, é necessário que a linhagem diplóide original (UT448//A757) seja heterozigota para diferentes marcadores genéticos. A posterior análise fenotípica dos segregantes mitóticos, derivados do diplóide UT448//A757 tratado com IMD, permite a identificação do intervalo genético em que ocorreu o evento de permuta mitótica (Lynn et al., 2004; Miyamoto et al., 2007).

O tratamento do diplóide UT448//A757 com diferentes concentrações de IMD (10 µM, 5 µM e 2,5 µM) permitiu o isolamento de nove diplóides prototróficos (D4 a D12), os quais apresentaram as mesmas características morfológicas do diplóide original.

Um dos diplóides obtidos com a maior concentração de IMD (10 µM), denominado D5, produziu conídios amarelos, sendo, portanto, homozigoto para o gene *y* (*y//y*). Os segregantes mitóticos derivados do diplóide D5 foram analisados fenotipicamente para o cálculo dos valores de HI.

A ausência de segregantes auxotróficos para biotina e metionina (*bi*; *meth*) nesta análise indica que o diplóide D5 é homozigoto não só para o gene *y*, como também para os genes *bi*⁺ e *meth*⁺. O diplóide D5 é, portanto, recombinante para os cromossomos I e II (Figura 16). Índices de Homozigotização com valores superiores a 2,0 e significativamente diferentes dos valores do controle foram também obtidos para os outros dois diplóides tratados com 10 µM de IMD (D4 e D6) (Quadro 2).

Os valores de HI dos diplóides D7 a D9, obtidos com a concentração de 5 µM (intermediária), demonstraram, igualmente, o potencial recombinagênico do IMD, pois tais valores foram maiores do que 2,0 e estatisticamente diferentes do controle negativo, para os marcadores nutricionais analisados *paba* e *met* (Quadro 2).

O potencial genotóxico do IMD foi observado também na menor concentração utilizada no presente estudo (2,5 μM), onde os diplóides D10 a D12 originaram HIs > 2,0 e significativamente diferentes do controle negativo, para todos os marcadores analisados (Quadro 2).

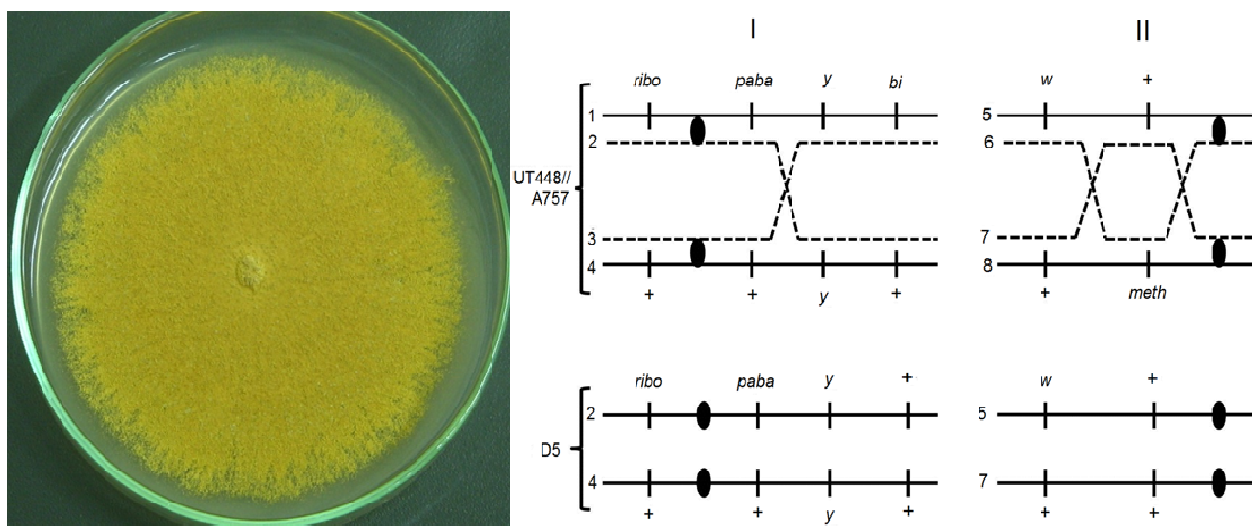


Figura 16 - Esquema da segregação do diplóide D5 (*y*-amarelo) recombinante para o intervalo *paba-y* no cromossomo I e no cromossomo II sofrendo duplo *crossing-over* entre o gene *w* e *meth* e outro entre o gene *meth* e o centrômero.

Estudos sobre o potencial genotóxico de alguns herbicidas demonstram que as mais altas concentrações utilizadas nos ensaios, nem sempre produzem as mais altas frequências de recombinação. Estes resultados foram explicados pelo potencial citotóxico destes herbicidas, quando utilizados em concentrações elevadas (Kunz, 1985). Em nossos estudos, as concentrações de 2,5 μM a 10 μM de IMD foram genotóxicas (Quadro 2), porém não interferiram no crescimento micelial dos diplóides tratados com as referidas concentrações (Figura 15).

A recombinação mitótica entre cromossomos homólogos pode ocasionar o processo de perda da heterozigosidade (LOH), observado em vários tipos de tumores. De fato, a LOH induzida pela recombinação mitótica tem sido caracterizada como um dos principais agentes promotores de neoplasias (Vrieling, 2001).

A LOH decorrente da recombinação mitótica ocorre quando, após um evento de permuta em um determinado intervalo genético, uma cromátide recombinante segrega com uma paternal para o mesmo pólo mitótico. Uma das células-filhas

formadas passará a apresentar homozigose para todos os alelos localizados em posição distal ao ponto de permuta (Wang et al., 2009) (Figura 8).

A associação entre os processos de recombinação somática e carcinogênese foi inicialmente descrita por Cavenne et al. (1983) em células humanas heterozigotas para o alelo mutante do *locus* Rb-1 (rb^+/rb), localizado no cromossomo 13. A recombinação somática foi responsável pela perda do alelo funcional, após a ocorrência de um *crossing-over* mitótico, em clones de células rb/rb (Figura 8). A frequência de eventos de homozigose no cromossomo 13 foi posteriormente estudada por Dryja et al. (1986) em células tumorais de retinoblastoma. Os autores observaram que cerca da metade de todos os retinoblastomas são homozigotos para grandes regiões do braço longo do cromossomo 13 e que esta homozigose pode representar um evento fundamental na oncogênese de um número considerável de retinoblastomas.

A carcinogênese decorre de uma série de alterações genéticas e/ou epigenéticas que direcionam a transformação de uma célula normal em neoplásica. Alterações em genes supressores de tumor, os quais, em condições fisiológicas, têm a função de retardar o processo de divisão celular, têm sido caracterizadas como relevantes no desenvolvimento de neoplasias (Velasco et al., 2008; Szewczuk et al., 2009).

O gene supressor de tumor P53 tem função preponderante na manutenção da estabilidade genômica, sendo, por este fato, denominado “guardião do genoma”. O gene *p53* codifica uma fosfoproteína nuclear (p53) que atua no *chek-point* G1/S do ciclo celular.

Mutações na proteína p53, freqüentemente observados em cânceres humanos, levam à instabilidade genômica e ao aumento da recombinação homóloga espontânea (Willers et al., 2000; Fett-Conte e Salles, 2002). Vários mecanismos genéticos de inativação do gene TP53 já foram descritos, tais como: mutações de ponto, deleções homozigotas e LOH.

A LOH do *locus* TP53 está associada aos processos de iniciação e progressão de várias malignidades humanas e tem sido observada tanto em estágios iniciais ou avançados de diferentes neoplasias (Lasko e Cavenee, 1991; Hainaut e Hollstein, 2000; Yang et al., 2002; Szewczuk et al., 2009)

Quadro 2 - Índice de Homozigotização (HI) com valores dos marcadores para UT448//A757, linhagens diplóides após tratamento com 10 μ M (D4-D6), 5 μ M (D7-D9) e 2.5 μ M (D10-D12) de imidocarb

Marcadores ^a	D1 ^b	D2 ^b	D3 ^c		D4	D5	D6	D7			D8	D9	D10		D11	D12					
	NS ^d	NS ^d	Total	HI	NS ^d	HI	NS ^d	NS ^d	NS ^d	Total	HI	NS ^d	NS ^d	NS ^d	Total	HI	NS ^d	NS ^d	NS ^d	Total	HI
<i>ribo+</i>	44	85	129	1.3	93	3.0*	99	41	99	239	2.3*	170	112	87	369	2.2	81	185	168	434	2.6*
<i>ribo</i>	33	68	101		31		35	32	36	103		73	44	51	168		32	62	72	166	
<i>paba+</i>	39	84	123	1.1	92	2.9*	96	67	99	262	3.3*	170	112	87	369	2.2*	84	185	166	435	2.6*
<i>paba</i>	38	69	107		32		38	06	36	80		73	44	51	168		29	62	74	165	
<i>bi+</i>	43	82	125	1.2	96	3.4*	106	73	99	278	4.3*	171	110	88	369	2.2	84	185	167	436	2.7*
<i>bi</i>	34	71	105		28		28	0	36	64		72	46	50	168		29	62	73	164	
<i>meth+</i>	43	85	128	1.3	96	3.4*	90	73	84	247	2.6*	186	139	123	448	5.0*	93	209	174	476	3.8*
<i>meth</i>	34	68	102		28		44	0	51	95		57	17	15	89		20	38	66	124	

^a *ribo* = riboflavina; *paba*=ácido *p*-aminobenzóico; *bi* = biotina; *meth* = metionina. ^bControle Negativo, não tratado com imidocarb ou benznidazol. ^cControle Positivo, diplóide tratado com 100 μ M de benznidazol. ^dNúmero de segregantes mitóticos.*Significamente diferente do controle negativo (Tabela de contingência, Yates Corrected Chi-Square, $p < 0.05$).

A recombinação homóloga (HR) é um processo envolvido no reparo de lesões que ocorrem espontaneamente durante a fase S do ciclo celular (Knudson, 1993; Arnaudeau et al., 2000; Helleday, 2003). Este reparo requer a presença de uma sequência homóloga para atuar como um molde no evento de reparação. No final das fases S ou G2 do ciclo celular, estes moldes podem ser fornecidos pela presença de cromátide irmã idêntica. Este processo é livre de erros e restaura a sequência do DNA, tornando-a como era antes do dano (Johnson e Jasin, 2001; Vrieling, 2001). Por outro lado, quando o doador homólogo é o cromossomo homólogo, o reparo por HR tem o potencial de levar à LOH dos marcadores parentais. Na verdade, a recombinação somática entre cromossomos homólogos leva à LOH do *locus* distal no evento de HR, se as cromátides irmãs recombinantes segregarem para pólos mitóticos opostos (Helleday, 2003; Moynahan e Jasin, 2010).

Além de apresentar semelhanças estruturais com compostos que possuem capacidade conhecida de se ligar ao DNA, como as poliaminas, espermina e espermidina celulares (Lambros et al., 1977; Bacchi et al., 1981; Moore et al., 1996), o IMD tem sido descrito como um potente inibidor da síntese de ácidos nucléicos. Em baixas concentrações, o IMD inibiu mais de 50% da incorporação da hipoxantina [³H] nos ácidos nucléicos de *B. bovis in vitro* (Nott et al., 1990). Levando em conta o potencial recombinagênico dos bloqueadores da síntese de DNA, a ação recombinagênica do IMD, mostrada no presente estudo, pode estar associada à indução de reparo recombinacional na quebra das fitas de DNA, induzida por este babesicida.

A literatura descreve que uma alta e persistente concentração de IMD permanece no corpo do animal, especialmente no fígado e rins de espécies ruminantes. O "efeito reservatório" da droga no corpo dos animais tem sido associado à presença de concentrações de IMD detectáveis no leite de ovelhas até 10 dias após a injeção da droga (Moore et al., 1996; Lai et al., 2002). Adicionalmente, Lai et al. (2002) encontraram elevadas concentrações e de longa duração de IMD no cérebro de ovinos e caprinos, mostrando que a droga pode se difundir através da barreira hemato-encefálica, fornecendo evidências de possíveis efeitos neurotóxicos do IMD.

No presente estudo, o IMD foi caracterizado como um potente indutor de recombinação mitótica. Assim como o IMD, compostos químicos previamente descritos como recombinagênicos em *A. nidulans* foram também classificados como

recombinagênicos em células de mamíferos (Beaula e Subramanyan, 1991; Santos et al., 1994; Arnaudeau et al., 2000; Kaneshima e Castro-Prado, 2005; Miyamoto et al., 2007). Considerando o longo tempo de eliminação do IMD no leite e em tecidos de animais, bem como sua característica estrutural (Moore et al., 1996; Lai et al., 2002), pesquisas recentes sugerem que, embora o IMD seja eficaz no tratamento ou na profilaxia da babesiose, a sua presença nos tecidos de animais, utilizados como alimento, pode apresentar risco alimentar para os consumidores humanos. Todavia, é fato que demais estudos se fazem necessários para investigar o real potencial genotóxico do IMD em células de mamíferos, especialmente devido à associação entre a recombinação homóloga e tumorigêneses (Lasko et al., 1991; Moynahan e Jasin, 2010).

5. CONCLUSÕES

- a) O antiparasitário IMD induz recombinação mitótica em células diplóides de *A. nidullans*.
- b) O potencial recombinagênico do IMD pode estar associado à indução do reparo recombinagênico das quebras induzidas no DNA por este fármaco.
- c) Considerando que este composto é comercialmente utilizado na medicina veterinária e na pecuária e que o mesmo apresenta efeito residual no fígado, músculos e rins de animais tratados com IMD, os resultados do presente estudo destacam a necessidade de novas investigações sobre a genotoxicidade deste babesicida, uma vez que compostos caracterizados como recombinagênicos podem atuar como agentes promotores de neoplasias.
- d) Em suma, ressaltamos ser imprescindível a ampliação do período de carência para o consumo humano da carne de bovinos, ovinos e suínos, uma vez que o período de 28 dias, estabelecido pela Intervet do Brasil Veterinária Ltda, não é suficiente para garantir o consumo humano seguro de carne, leite e derivados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

STARK, J.M.; JASIN, M. Extensive Loss of Heterozygosity Is suppressed during homologous repair of chromosomal breaks. **Molecular and Cellular Biology**, 23:733–743, 2003.

ALIU, Y.O.; DAVIS, R.H. JR.; CAMP, B.J.; KUTTLER, K.L. Absorption, distribution, and excretion of imidocarb dipropionate in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, 38:2001-2007, 1977.

ARNAUDEAU, C.; TENORIO, M.E.; JENSEN, D.; HELLEDAY, T. Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. **Mutation Research**, 461:221-228, 2000.

AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos**. Goiânia: UFG, 2008. 536p.

BACCHI, C.J.; NATHAN, H.C.; HUTNER, S.H.; DUTCH, D.S.; NICHOL, C.A. Prevention by polyamines of the curative effect of amicarbalide and imidocarb for *Trypanosoma brucei* infections in mice. **Biochemical Pharmacology**. 30:883-886, 1981.

BAGGISH, A.L.; HILL, D.R. Antiparasitic agent atovaquone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46:1163–1173, 2002.

BALL, C.; HAMLIN, P.F. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important antibiotic Cephalosporin C. **Revista Brasileira de Genética**, 5:01-13, 1982.

BAPTISTA, F.; MACHADO, M.F.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Alternative reproduction pathway in *Aspergillus nidulans*. **Folia Microbiologica**, 48:597–604, 2003.

BARCI, L.A.G.; OLIVEIRA, M.R.; MACHADO, R.Z.; OLIVEIRA, D.A.; ARAÚJO FILHO, R.S. Epidemiologia da Babesiose bovina no Estado de São Paulo: I estudo em rebanhos produtores de leite tipo C do município de Pindamonhangaba, Vale do Paraíba. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 3:79-82, 1994.

- BASTOS, R.G.; UETI, M.W.; GUERRERO, F.D.; KNOWLES, D.P.; SCOLES, G.A. Silencing of a putative immunophilin gene in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* increases the infection rate of *Babesia bovis* in larval progeny. **Parasites & Vectors**, 2:1-11, 2009.
- BEAULA, H.K.D.; SUBRAMANYAM, S. Genotoxic evaluation of Ara-C by multiple parameters. **Mutation Research**, 263:185-196, 1991.
- BECKER, T.C.A.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Parameiosis in *Aspergillus nidulans* in Response to Doxorubicin. **Folia Microbiology**, 49:699–704, 2004.
- BERGE, E.O.; KNAPPSKOG, S.; GEISLER, S.; STAALESEN, V.; PACAL, M.; BORRESEN-DALE, A.L.; PUNTERVOLL, P.; LILLEHAUG, J.R.; LONNING, P.E. Identification and characterization of retinoblastoma gene mutations disturbing apoptosis in human breast cancers. **Molecular Cancer**, 9:173-186, 2010.
- BERGE, E.O.; KNAPPSKOG, S.; LILLEHAUG, J.R.; LONNING, E. Alterations of the retinoblastoma gene in metastatic breast cancer. **Clinical & Experimental Metastasis**, 28:319–326, 2011.
- BEUMER, K.J.; PIMPINELLI, S.; GOLIC, K.G. Induced chromosomal exchange directs the segregation of recombinant chromatids in mitosis of drosophila. **Genetics**, 150:173–188, 1998.
- BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Efficacy of combined atovaquone and azithromycin for therapy of chronic *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) Infections in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 18:494–498, 2004.
- BLOOMFIELD, V.A. DNA Condensation by multivalent cations. **Biopolymers**, 44:269-82, 1997.
- BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, 129:247–269, 2004.
- BOURDOISEAU, G. Canine babesiosis in France. **Veterinary Parasitology** 138:118–125, 2006.

BOUSTANI, M.R.; GELFAND, J.A. Babesiosis. **Clinical Infectious Diseases**, 22:611-615, 1996.

BRANDÃO, L.P.; HAGIWARA, M.K.; MYIASHIRO, S.I. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. **Veterinary Parasitology**, 114:253–265, 2003.

BRASSEUR, P.; LECOUBLET, S.; KAPEL, N. FAVENNEC, L.; BALLEET, J.J. In Vitro evaluation of drug susceptibilities of *Babesia divergens* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 42:818–820, 1998.

BRAYTON, K.A.; LAU, A.O.; HERNDON, D.R.; HANNICK, L.; KAPPMAYER, L.S.; BERENS, S.J.; BIDWELL, S.L.; BROWN, W.C.; CRABTREE, J.; FADROSH, D.; FELDBLUM, T.; FORBERGER, H.A.; HAAS, B.J.; HOWELL, J.M.; KHOURI, H.; KOO, H.; MANN, D.J.; NORIMINE, J.; PAULSEN, I.T.; RADUNE, D.; REN, Q.; SMITH, R.K.JR.; SUAREZ, C.E.; WHITE, O.; WORTMAN, J.R.; KNOWLES, D.P. JR.; MCELWAIN, T.F.; NENE, V.M. Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. **PLoS Pathogens**, 3:1401-1413, 2007.

BUSSO, C.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Cremophor EL stimulates mitotic recombination in *uvrH*//*uvrH* diploid strain of *Aspergillus nidulans*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 76:49-55, 2003.

CATEN, C.E. Parasexual processes in fungi. In: GULL, K.; OLIVER, G. (eds.). **The fungal nucleus**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. p. 191-214.

CAVENEY, W.K.; DRYJA, T.P.; PHILLIPS, R.A.; BENEDICT, W.F.; GODBOUT, R.; GALLIE, B.L.; MURPHREE, A.L.; STRONG, L.C.; WHITE, R.L. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. **Nature**, 305:779 - 784, 1983.

CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S.; PLANTARD, O.; MALANDRIN, L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, 40:1-18, 2009.

CHUA, P.; JINKS-ROBERTSON, S. Segregation of recombinant chromatids following mitotic crossing over in yeast. **Genetics**, 129:359-369, 1991.

COLDHAM, N.G.; MOORE, A.S.; DAVE, M.; GRAHAM, P.J.; SIVAPATHASUNDARAM, S.; LAKE, B.G.; SAUER, M.J. Imidocarb residues in edible bovine tissues and in vitro assessment of imidocarb metabolism and cytotoxicity. **Drug Metabolism and Disposition**, 23:501-505, 1995.

COLDHAM, N.G.; MOORE, A.S.; SIVAPATHASUNDARAM, S.; Sauer, M.J. Imidocarb depletion from cattle liver and mechanism of retention in isolated bovine hepatocytes. **The Analyst**, 119:2549-52, 1994.

COSCHI, C.H.; MARTENS, A.L.; RITCHIE, K.; FRANCIS, S.M.; CHAKRABARTI, S.; BERUBE, N.G.; DICK, F.A. Mitotic chromosome condensation mediated by the retinoblastoma protein is tumor-suppressive. **Genes & Development**, 24:1351–1363, 2010.

COSTA, V.M.M.; RODRIGUES, A.L.; MEDEIROS, J.M.A.; LABRUNA, M.B.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-CORREA, F. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 31:239-243, 2011.

CPVS – Compêndio de Produtos Veterinários – **SINDAN. IMIZOL®INJETÁVEL**. Intervet do Brasil Veterinária Ltda. Disponível em: <http://www.cpvs.com.br/cpvs/pagimpromir.aspx>.: Acesso em 07/01/2012.

DALRYMPLE, B.P.; CASU, R.E.; PETERS, J.M.; DIMMOCK, C.M.; GALE, K.R.; BOESE, R.; WRIGHT, I.G. Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 57:181–192, 1993.

DANTAS-TORRES F.; FIGUEREDO, L.A. Canine babesiosis: a brazilian perspective. **Veterinary Parasitology**, 141:197–203, 2006.

DEBETS, A.J.M. Parasexuality in fungi: mechanisms and significance in wild populations. In: BRIDGE, P.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J. (eds.). **Molecular variability of fungal pathogens**. London: CAB International, 1998, p. 41- 52..

DENG, X.W.; DUBIEL, W.; WEI, N.; HOFMANN, K.; MUNDT, K. Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: An essential regulator of development. **Trends Genetics**, 16:289, 2000.

DRYJA, T.P.; RAPAPORT, J.M.; EPSTEIN, J.; GOORIN, A.M.; WEICHSELBAUM, R.; KOUFOS, A.; CAVENEE, W.K. Chromosome 13 homozygosity in osteosarcoma without retinoblastoma. **The American Journal of Human Genetics**, 38:59-66, 1986.

DUARTE, S.C.; LOULY, C.C.B.; NETO, O.J.S.; ROMANOWSKI T.N.A.; LINO JUNIOR, R.S.; LINHARES, G.F.C. Diagnóstico parasitológico e molecular da babesiose canina na cidade de Goiânia-GO. **Revista de Patologia Tropical**, 37:229-236, 2008.

EARLE, D.P.A. Biblical disease updated. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, 100:132–141, 1989.

EMBRAPA. **Babesia**. Disponível em: <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/naoseriadas/babesia/babesia.html>. Acesso em: 12, março, 2011.

FETT-CONTE, A.C.; SALLES, A.B.C.F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 24:85-89, 2002.

FEUERSTEIN, B.G.; PATTABIRAMAN, N.; MARTON, L.J. Molecular dynamics of spermine-DNA interactions: sequence specificity and DNA bending for a simple ligand. **Nucleic Acids Research**, 17:6883-6892, 1989.

FRANCO, C.C.S.; CASTRO-PRADO, J.; ROSADA, .LJ.; SANT'ANNA, J.R.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Mitotic recombination: a genotoxic effect of the antidepressant citalopram in *Aspergillus nidulans*. **Experimental Biology and Medicine**, 235:1257-1262, 2010.

FRANCO, C.C.S.; MIYAMOTO, C.T.; SANT'ANNA, J.R.; CASTRO-PRADO, M. A.A. Genotoxicity of the cyclo-oxygenase-inhibitor sulindac sulfide in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38:430-434, 2007.

FRANZONI, M.G.M.; CASTRO-PRADO, M.A.A.; GEBARA, J.S. On the recombinogenic activity of norfloxacin in a diploid strain of *Aspergillus nidulans*. **Cytologia**, 62:39-45, 1997.

GOLDMAN, G.H.; MCGUIRE, S.L.; HARRIS, S.D. The DNA damage response in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, 35:183–195, 2002.

GOLYNSKI, A.A.; FERNANDES, K.R.; BALDANI, C.D.; GOLYNSKI, A.L.; MADEIRO, A.S.; MACHADO, R.Z.; BOTTEON, P.T.L.; MASSARD, C.L. Estudo soropidemiológico da Babesia equi em eqüinos do estado do Rio Grande do Sul, Brasil determinado pelos testes de imunofluorescência indireta e ELISA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 17:317-321, 2008.

GOTTFRIED, O.N.; VISKOCHIL, D.H.; COULDWELL, W.T. Neurofibromatosis type 1 and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Neurosurg Focus**, 28:E8, 2010.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. **Genética moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 438p.

GUBERNOT, D.M.; LUCEY, C.T.; LEE, K.C.; CONLEY, G.B.; HOLNESS, L.G.; WISE, R.P. Babesia infection through blood transfusions: reports received by the us food and drug administration, 1997–2007. **Clinical Infectious Diseases**, 48:25-30, 2009.

HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. **Advances in Cancer Research**, 77:81-137, 2000.

HELLEDAY, T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. **Carcinogenesis**, 31:955-960, 2010.

HELLEDAY, T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. **Mutation Research**, 532:103-115, 2003.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, 13:451–469, 2000.

HUCL, T.; GALLMEIER, E. DNA repair: exploiting the Fanconi anemia pathway as a potential therapeutic target. **Physiological Research**, 60:453-65, 2011.

INCA. Instituto Nacional de Combate ao Câncer. **Fisiopatologia do câncer**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>. Acesso em: 21, junho, 2011.

JOHNSON, R.D.; JASIN, M. Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. **Biochemical Society**, 29:196-201. 2001.

JOJIMA, F.S.; GARCIA, J.L.; VIDOTTO, M.C.; BALARIN, M.R.S.; FABRETTI, A.K.; GASPARINI, M.R.; COELHO, A.L.M.; VIDOTTO, O. Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em cães de uma população hospitalar da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 17:277-283, 2008.

JULIANO, R.S.; MACHADO, R.Z.; FIORAVANTI, M.C.S.; ANDRADE, G.M.; JAYME, V.S. Soroepidemiologia da babesiose em rebanho de bovinos da raça Curraleiro. **Ciência Rural**, 37:1387-1392, 2007.

KÄFER, E. The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, 46:1581–1609, 1961.

KANESHIMA, E.N.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Benznidazole-induced genotoxicity in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100:325-329, 2005.

KEE, Y.; KIM, J.M.; D'ANDREA, A. Regulated degradation of FANCM in the fanconi anemia pathway during mitosis. **Genes & Development**, 23:555–560, 2011.

KIM, J.Y.; CHO, S.H.; JOO, H.N.; TSUJI, M.; CHO, S.R.; PARK, I.J.; CHUNG, G.T.; JU, J.W.; CHEUN, H.I.; LEE, H.W.; LEE, Y.H.; KIM, T.S. First case of human babesiosis in Korea: detection and characterization of a novel type of *Babesia* sp. (KO1) similar to ovine *Babesia*. **Clinical Microbiology**, 45:2084–2087, 2007.

KNUDSON, A.G. Antioncogenes and human cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 90:10914-10921, 1993.

KRAUSE P.J. Babesiosis diagnosis and treatment. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 3:45-53, 2003.

KRAUSE, P.J.; LEPORE, T.; SIKAND, V.K.; GADBAW JR, J.; BURKE, G.; TELFORD, S.R.; BRASSARD, P.; PEARL, D.; AZLANZADEH, J.; CHRISTIANSON, D.; MCGRATH, D.; SPIELMAN, A. Atovaquone and azithromycin for the treatment of babesiosis. **The New England Journal of Medicine**, 343:1454-1458, 2000.

KUNZ, B.A.; ECKARDT, F.; HAYNES, R.H. Analysis of non-linearities in frequency curves for UV-induced mitotic recombination in wild-type and excision-repair-deficient strains of yeast. **Mutation Research**, 151:235-242, 1985.

LAI, O.; BELLOL C.; CRESCENZO, G.; ORMAS, P. Depletion and bioavailability of imidocarb residues in sheep and goat tissues. **Veterinary & Human Toxicology**, 44:79-83, 2002.

LAMBROS, C.; BACCHI, C.J.; MARCUS, S.L.; HUTNER, S.H. Paradoxal activation of *Leptomonas* NAD-linked α -glycerophosphate dehydrogenase by ethidium and antrycide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 74:1227-1234, 1977.

LASKO, D.; CAVENEE, W.; NORDENSKJOLD, M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. **Annual Review of Genetics**, 25:281-314, 1991.

LOSOS, G.J. Babesiosis. Infections tropical diseases of domestic animals. **Longman Scientific & Technical**, 1-97, 1986.

LYNN, A.; ASHLEY, T.; HASSOLD, T. Variation in human meiotic recombination. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, 5:317-349, 2004.

MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, 135:15-23, 2004.

MEADOWS, K.L.; ANDREWS, D.M.; XU, Z.; CARSWELL, G.K.; LAUGHLIN, S.K.; BAIRD, D.D.; TAYLOR, J.A. Genome-wide analysis of loss of heterozygosity and copy number amplification in uterine leiomyomas using the 100K single nucleotide polymorphism array. **Experimental and Molecular Pathology**, 91:434-439, 2011.

MEDINA, M.A.; CORREA, F.; RODRÍGUEZ- CASO, F.C.; SÁNCHEZ – JIMÉNEZ, F. A comprehensive view of polyamine and histamine metabolism to the light of new technologies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 9:854-864, 2005.

MEDINA, M.A.; URDIALES, J.L.; RODRÍGUEZ- CASO, F.C.; RAMÍREZ, F.J.; SÁNCHEZ – JIMÉNEZ, F. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 38:23–59, 2003.

MEHLHORN, H.; SHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, 23:37-103, 1984.

MENDONÇA, C.L.; VIEIRA, D.; KOHAYAGAWA, A.; SCHENK, M.A.M.; MADRUGA, C.R.; AFONSO, J.A. Avaliação clínica e hematológica em bezerros Nelore infectados experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regiões Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 23:52-60, 2003.

MIHALCA, A.D.; COZMA, V.; ŞUTEU, E.; MARINCULIC, A.; BOIREAU, P. The quest for piroplasms: from babeş and smith to molecules. **Scientica Parasitologica**, 11:14-19, 2010.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produtos veterinários: orientações para uso responsável**. Brasília: MAPA/DAS, 2008. 24p.

MIYAMOTO, C.T.; SANT'ANNA, J.R.; FRANCO, C.C.S.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Genotoxicity (mitotic recombination) of the cancer chemotherapeutic agents Cisplatin and Cytosine arabinoside in *Aspergillus nidulans*. **Food and Chemical Toxicology**, 45:1091-1095, 2007.

MOINARD, C.; CYNOBERA, L.; JEAN-PASCAL, B. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, 24:184–197, 2005.

MOORE, A.S.; COLDHAM, N.G.; SAUER, M.J. A cellular mechanism for imidocarb retention in edible bovine tissues. **Toxicology Letters**, 87:61-68, 1996.

MOYNAHAN, M.E.; JASIN, M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. **Molecular cell Biology**, 11:196-207, 2010.

MOYNAHAN, M.E.; JASIN, M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature* **Reviews Molecular Cell Biology**, 11:196-207, 2010.

- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Tradução Fabiana Horn. Porto Alegre: Artmed, 2011. 473p.
- NOTT, S.E.; O' SULLIVAN, W.J.; GERO, A.M.; BAGNARA, A.S. Routine screening for potential babesicides using cultures of *Babesia bovis*. **Journal of Parasitology**, 20:797-802, 1990.
- PASSOS, L.M.F.; GEIGERB, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTERB, K.; ZAHLER-RINDERB, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, 127:81–85, 2005.
- PATNAIK, M.M. Inclusion bodies in tick-borne diseases diagnosed in patients from northern Wisconsin. **Clinical Medicine & Research**, 7:45-47, 2009.
- PEREIRA, M.A.V.C.; MASSARD, C.L.; FACCINI, J.L.H.; SIQUEIRA, L.F.G. Ocorrência de *Babesia Equi* (Laveran, 1901) e *Babesia Caballi* (Nuttall & Strickland, 1912) em eqüinos da raça puro sangue inglês de pequenos estabelecimentos eqüestres. **Arquivos do Instituto Biológico**, 71:405-409, 2004.
- PFEIFFER, C.D.; KAZMIERCZAK, J.J.; DAVIS, J.P. Epidemiologic features of human Babesiosis in Wisconsin, 1996-2005. **Wisconsin Medical Journal**, 106:191-195, 2007.
- PIRES, L.T.A.; ZUCCHI, T.M.A.D. A new method to detect potential genotoxic agents using mitotic crossing over in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **Brazilian Journal of Genetics**, 17:371-376, 1994.
- PONTECORVO, G.; KAFER, E. Genetic analysis based on mitotic recombination. **Genetics**, 9:71-104, 1958.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MCDONALD, K.D.; BUFTON, A. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetic**, 5:141-238. 1953.
- QUICK, R.E.; HERWALDT, B.L.; THOMFORD, J.W.; GARNETT, M.E.; EBERHARD, M.L.; WILSON, M.; SPACH, D.H.; DICKERSON, J.W.; TELFORD, S.R.; STEINGART, K.R.; POLLOCK, R.; PERSING, D.H.; KOBAYASHI, J.M.; JURANEK, D.D.; CONRAD, P.A. Babesiosis in Washington State: a new species of *Babesia*? **Annals Internal Medicine**, 119:284–290, 1993.

RAMEL, C.; CEDERBERG, H.; MAGNUSSON, J, VOGEL, E.; NATARAJAN, A.T.; MULLENDER, L.H.; NIVARD, J.M.; PARRY, J.M.; LEYSON, A.; COMENDADOR, M.A.; SIERRA, L.M.; FERREIRO, J.A.; CONSUEGRA, S. Somatic recombination, gene amplification and cancer. **Mutation Research**, 353:85-107, 1998.

RODRIGUES, A.; RECH, R.R.; BARROS, R.R.; FIGHERA, R.A.; BARROS, C.S.L. Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos. **Ciência Rural**, 35:121-125, 2005.

RODRIGUES, F.H.; AFONSO-CARDOS, O.S.R.; GOMES, M.A.; BELETT, M.E.; ROCH, A.; GUIMARÃES, A.H.; CANDELORO, I.; DE SOUZA, M.A. Effect of imidocarb and levamisole on the experimental infection of BALB/c mice by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, 139:37–46, 2006.

ROPER, J.A. Production of heterozygous in filamentous fungi. **Experientia**, 8: 14-15, 1952.

ROUSSEAU-MERCK, M.F.; VERSTEEGE, I.; LEGRAND, I.; COUTURIER, J.; MAIRAL, A.; DELATTRE, O.; AURIAS, A. hSNF5/INI1 inactivation is mainly associated with homozygous deletions and mitotic recombinations in rhabdoid tumors. **Cancer Research**, 59:3152-3156, 1999.

SAKUMA, M.; SETOGUCHI, A.; ENDO, Y. Possible emergence of drug-resistant variants of Babesia Gibsoni in clinical cases treated with atovaquone and azithromycin. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 23:493–498, 2009.

SANTOS, S.J.; TAKAHASHI, C.S.; NATARAJAN, A.T. Cytogenetic effects of the antichagasic benznidazole on human cells *in vitro*. **Mutation Research**, 320:305-314, 1994.

SCHOUSTRA, S.E.; DEBETS, A.J.M.; SLAKHORST, M.; HOEKSTRA, R.F. Mitotic recombination accelerates adaptation in the fungus *Aspergillus nidulans*. **PLoS Genetics**, 3:648-653, 2007.

SERRA, E.; ROSENBAUM, T.; NADAL, M.; WINNE, R U.; ARS, E.; ESTIVILL, X.; LÁZARO, C. Mitotic recombination effects homozygosity for NF1 germline mutations in neurofibromas. **Nature Genetics**, 28:294-296, 2001.

SILVA, A.S.; TOCHETTO, C.; ZANETTE, R.A.; PIEREZAN, F.; RISSI, D.R.; SANTURIO, J.M.; MONTEIRO, S.G. Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. **Ciência Rural**, 38:1357-1362, 2008.

SMITH, T.; KILBOURNE, F.L. Investigation into the nature, causation, and prevention of southern cattle fever. **United States Department of Agriculture Bureau Animal Industry Bull**, 1:1–301, 1893.

SOARES, J.F.; GIROTTO, A.; BRANDÃO, P.E.; DA SILVA, A.S.; FRANÇA, R.T.; LOPES, S.T.A.; LABRUNA, M.B. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, 124:151-160, 2000.

SOUSA, G.D.; ZUCCHI, T.D.; ZUCCHI, F.D.; MILLER, R.G.; ANJOS, R.M.; POLI, P.; ZUCCHI, T.M. *Aspergillus nidulans* as a biological system to detect the genotoxic effects of mercury fumes on eukaryotes. **Genetics and Molecular Research**, 8:404-13, 2009.

SOUSA, M.G.; HIGA, A.C.; GERARDI, D.G.; TINUCCI-COSTA, M.; MACHADO, R. Z. Tratamento da Erliquiose canina de ocorrência natural com Doxiciclina, precedida ou não pelo Dipropionato de Imidocarb. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, 3:126-130, 2004.

SOUZA, J.C.P.; SOARES, C.O.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C.R.; CUNHA, N.C.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 20:26-30, 2000.

SOUZA-JÚNIOR, S.A.; BECKER, T.C.A.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Asexual recombination in a *uvrH* mutant of *Aspergillus nidulans*. **Biological Research**, 40:65-71, 2007.

STOLL, L.B.; CREMONESI, F.C.A.; PIRES, L.T.A.; ZUCCHI, T.D.; ZUCCHI, T.M.A.D. Induction of mitotic *crossing-over* in diploid strains of *Aspergillus nidulans* using low-dose X-rays. **Genetics and Molecular Research**, 7:467-475, 2008.

SZEWCZUK, W.; SKOMRA, D.; CYBULSKI, M.; PRZADKA-RABANIUK, D.; FILIP, A.; JÓŹWIK, M.; OLCZA, P.; ROESSNER, A.; SEMCZUK, A. Allelic loss at TP53 in

metastatic human endometrial carcinomas. **Clinical and Experimental Metastasis**, 26:789-796, 2009.

THYAGARAJAN, B.; CAMPBELL, C. Elevated homologous recombination activity in fanconi anemia fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, 272:23328–23333, 1997.

UILENBERG, G. *Babesia* — A historical overview. **Veterinary Parasitology**, 138:3–10, 2006.

VANNIER, E.; GEWURZ, B.E.; KRAUSE, P.J. Human Babesiosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, 22:469–488, 2008.

VELASCO, A.; PALLARES, J.; SANTACANA, M.; YERAMIAN, A.; DOLCET, X.; ERITJA, N.; PUENTE, S.; SOROLLA, A.; LLECHA, N.; MATIAS-GUIU, X. Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma. **International Journal of Gynecological Pathology**, 27:305-317, 2008.

VIAL, H.J.; GORENFLOT, A. Chemotherapy against babesiosis. **Veterinary Parasitology**, 138:147–160, 2006.

VIEIRA, M.I.B.; LEITE, R.C.; SACCO, A.M.S.; SILVA, J.G.C. Estratégias de controle do carrapato *Boophilus Microplus* (Canestrini, 1887) E Influência na estabilidade enzoótica da Babesiose bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 12:139-144, 2003.

VIJAYANATHAN, V.; THOMAS, T.; SHIRAHATA, A.; THOMAS, T.J. “DNA condensation by polyamines: a laser light scattering study of structural effects” **Biochemistry**, 40:13644-13651, 2001.

VRIELING, H. Mitotic maneuvers in the light. **Nature Genetics**, 28:101-102, 2001.

WANG, Z.; LI, X.; SU, D.; LI, Y.; WU, L.; WANG, Y.; WU, W. Residue depletion of imidocarb in Swine tissue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57:2324-2328, 2009.

WEINBERG, R.A. Tumor suppressor genes. **Science**, 254:1138-1146, 1991.

WEISS, L. M.; MURRAY, W.; TANOWITZ, H.B. The treatment of Babesiosis. **The New England Journal of Medicine**, 344:774, 2001.

WILLERS, H.; MCCARTHY, E.E.; ALBERTI, W.; DAHM-DAPHI, J.; POWELL, S.N. Loss of wild-type p53 function is responsible for upregulated homologous recombination in immortal rodent fibroblasts. **International Journal of Radiation Biology**, 76:1055-1062, 2000.

WRIGHT, I.G. Towards a synthetic *Babesia* vaccine. **International Journal for Parasitology**, 21:156-159, 1991.

YANG, Q.; YOSHIMURA, G.; SAKURAI, I.M.T.; KAKUDO, K. Chromosome 3p and breast cancer, **American journal of human genetics**, 47:453-459, 2002.

ZAHLE, M.; SCHEIN, E.; GOTHE H.R.R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitology Research**, 84:544-548, 1998.

ZIMMERMANN, F.K. Genetics aspects of carcinogenesis. **Biochemical Pharmacology**, 20:985-995, 1971.

ZINTL, A.; MULCAHY, G.; SKERRETT, H.E.; TAYLOR, S.M.; GRAY, J.S. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. **Clinical Microbiology Reviews**, 16:622–636, 2003.