



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOCITOQUÍMICA DO CÉREBRO DE
ABELHAS AFRICANIZADAS *Apis mellifera* APÓS EXPOSIÇÃO À DOSES
SUBLETAIS DO INSETICIDA TIAMETOXAM.**

DAIANA ANTONIA TAVARES



Rio Claro
Estado de São Paulo, Brasil

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOCITOQUÍMICA DO CÉREBRO DE
ABELHAS AFRICANIZADAS *Apis mellifera* APÓS EXPOSIÇÃO À DOSES
SUBLETAIS DO INSETICIDA TIAMETOXAM.**

DAIANA ANTONIA TAVARES

**Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina
Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elaine Cristina Mathias Silva Zacarin**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil**

595.799 Tavares, Daiana Antonia
T231a Análise morfológica e imunocitoquímica do cérebro de
abelhas *Apis mellifera* após a exposição à doses subletais do
inseticida tiametoxam / Daiana Antonia Tavares. - Rio Claro :
[s.n.], 2011
64 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina
Co-Orientador: Elaine Cristina Mathias Silva Zacarin

1. Abelha. 2. Morte celular. 3. Hsp90. I. Título.

*Dedico esta dissertação ao meu esposo
Paulo, e ao nosso filho Pedro, por serem
tão especiais para mim...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela credibilidade depositada neste trabalho além de todo apoio financeiro concedido, indispensáveis para realização deste.

Ao instituto de Biociências da Unesp e ao Ceis, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Campus Rjo Claro, por todo apoio concedido.

Ao Professor Dr. Osmar Malaspina, pela orientação, por toda a ajuda concedida para a realização deste trabalho, além da amizade, meu muito obrigado.

À Professora Dra. Elaine Cristina Mathias Zacarin, pela grande amizade, pelo apoio constante, pelos ensinamentos, e especialmente por sempre me motivar. Muito obrigado!

À Professora Dra. Thaisa Cristina Roat, por seus grandes ensinamentos, pela confiança no meu trabalho, pela amizade, pela paciência e dedicação, sou muito grata, Tá você é demais!

Ao Professor e amigo Dr. Stephan Malfitano Carvalho, por toda ajuda concedida, por não medir esforços em colaborar com este trabalho, pela paciência, dedicação e amizade, enfim por tudo.

À Professora Dra. Fernanda Fernandez, pela ajuda, pela troca de experiências, e pela amizade cultivada ao longo do tempo de convívio. Fer, muito obrigado por tudo!

À Professora Dra. Roberta Ferreira Nocelli por todo apoio concedido, além da amizade.

Aos técnicos de laboratório, Gerson Mello Souza e Antônio Sérgio Pascon, por toda ajuda concedida, sem as quais seria impossível a realização deste trabalho, além da amizade.

À amiga e colega de curso Caroline Almeida Rossi, Cá, obrigado pela amizade, por tudo que pudemos compartilhar, nunca esquecerei!

Aos colegas de pós-graduação, pelo companheirismo, amizade, ajuda e troca de experiências. Em especial, à amiga Danielle, sempre presente em todos os momentos, e a todos que direta ou indiretamente puderam estar comigo nesta jornada.

Aos todos os colegas do Ceis, Centro de Estudos de Insetos Sociais, pela amizade, pela ajuda e apoio. Muito Obrigado!

De um modo muito especial agradeço aos amigos do laboratório de microbiologia, Paixão, Dirce, Aline Cruz, Aline Castanho, Paula (Tim), Tati, Silvio, Virgínia, Ife, enfim, obrigado pela amizade, pelo carinho, pelas conversas e cafezinhos, por tudo... adorei conhecer cada um de vocês! Vocês estarão eternamente guardados em meu coração!

As amigas Aline Cruz, Weilan e Dirce, por sempre me apoiarem, me recepcionarem de maneira tão amiga e carinhosa... jamais esquecerei! Muito obrigado!

De maneira especial:

À Deus, pela minha existência, pelo caminho percorrido ao longo desses dois anos, por sempre me iluminar nas dificuldades, na alegrias e também nas tristezas, enfim, por proporcionar conhecer essas pessoas maravilhosas.

Aos meus pais José e Antonia, que com tanto amor me ensinaram as coisas mais belas da vida, me educaram, sempre me apoiaram e me incentivaram na realização deste trabalho e com o mesmo carinho sempre fizeram o possível e o impossível por mim, amo vocês!

Ao meu marido Paulo, amigo, companheiro, que tantas vezes cuidou para que esse sonho se concretizasse, por estar sempre ao meu lado me apoiando, me dando forças, serei eternamente grata. Amo você!

Ao meu filho Pedro, que com seu rostinho de criança, seu sorriso inocente, seu jeitinho carinhoso, me encorajou a nunca desistir, e sempre sonhar... filho, mamãe te ama, você é muito especial!

Aos meus queridos irmãos, Daniela, Eliana e Edson, pela convivência maravilhosa, pelo apoio, pelas orações, amo cada um de vocês! Muito obrigado por sempre estarem ao meu lado.

À minha sogra e amiga Sonia, que tantas vezes sonhou comigo, lutou comigo, e estendeu as mãos para ajudar nos momentos mais difíceis da caminhada.

Enfim... Meus sinceros agradecimentos a todos.

*“Nossa maior fraqueza é a desistência. O caminho mais certo para o sucesso é sempre tentar apenas uma vez mais.”
Autor: Thomas Alva Edison*

RESUMO

Com o objetivo de determinar a CL_{50} e analisar a morfologia do cérebro de larvas de abelhas africanizadas *Apis mellifera* tratadas com o inseticida tiametoxam, larvas de operárias de 1º instar foram coletadas de colméia saudável do apiário pertencente ao Departamento de Biologia da Unesp, Rio Claro/SP e transferidas para cúpulas de poliestireno esterilizadas, as quais continham dieta larval. Após a transferência, as cúpulas foram mantidas à temperatura de $34 \pm 2^\circ \text{C}$ e UR de $85 \pm 5\%$, sendo as larvas alimentadas diariamente do 1º ao 6º dia. Para a alimentação no 4º dia, preparou-se o alimento contendo diversas concentrações de tiametoxam obtendo-se uma gama de diluição, variando de 0,01 a 250ng de tiametoxam/ μl de dieta, e então fornecendo-o a 24 larvas/concentração. Após 24 e 48 horas de exposição *in vitro* ao inseticida, o número de indivíduos mortos foi contabilizado e os dados submetidos à análise estatística. Seguindo os mesmos procedimentos acima descritos, foram realizados bioensaios laboratoriais de intoxicação subletal aguda e crônica para a análise morfológica e imunocitoquímica do cérebro. Após o bioensaio, foram coletadas 5 larvas de 5º instar inicial (24h após a intoxicação), 5 larvas de 5º instar final (48h após a intoxicação) e 5 pré-pupas 72h (após a intoxicação) para as análises morfológica e imunocitoquímica, tanto para os grupos tratados como para o controle. Larvas foram dissecadas sob estereomicroscópio com luz fria, à temperatura ambiente, em uma placa de dissecação contendo fixador. Com auxílio de bisturi, foi removida a extremidade anterior de cada larva. As larvas foram processadas rotineiramente, fixadas e lavadas no tampão do respectivo fixador. Para a análise morfológica, as larvas foram desidratadas e incluídas em historesina. As secções histológicas do material incluído em resina foram coradas com Hematoxilina Eosina. Já para a análise imunocitoquímica, após a desidratação as larvas foram embebidas e incluídas em paraplast. Através da análise dos dados, foi possível determinar o valor da CL_{50} após 48 horas de intoxicação, sendo ela de ordem de 14,35ng de tiametoxam/ μl de dieta ($GL. = 25 / \chi^2 = 32,009$), esse valor foi adotado para os bioensaios laboratoriais subletais. Além da determinação da CL_{50} , os dados de toxicidade aguda sugerem que quando aplicado em altas concentrações (100ng/ μl ; 50ng/ μl), o inseticida causou uma alta mortalidade nas larvas. Já quando o inseticida foi aplicado em baixas concentrações (5ng/ μl ; 0,5ng/ μl ; 0,05ng/ μl), houve uma aceleração no desenvolvimento larval. Através da análise morfológica do cérebro, podemos sugerir que, tanto na exposição aguda como na exposição crônica, o tiametoxam acelerou o processo de morte celular na região dos lobos ópticos, e que as células apresentando núcleos picnóticos concentraram-se na medula dos lobos ópticos. Há evidências

também de que este inseticida esteja adiantando o processo de morte celular nos corpos pedunculados de pré-pupas de tratamento agudo. O mesmo resultado não pode ser visualizado na região dos lobos antenais, já que aparentemente esta estrutura não apresentou nem alterações morfológicas em evidências de morte celular. Conclui-se através da análise imunocitoquímica de HSP 90, que não houveram diferenças dos grupos tratados em relação ao grupo controle, evidenciando que as mesmas estão atuando no cérebro como chaperonas moleculares. Os resultados dos testes de morte celular puderam confirmar as mortes celulares localizadas na região dos lobos ópticos das larvas de *Apis mellifera*.

Palavras chave: *Apis mellifera*, Cérebro, tiametoxam, morte celular, HSP90.

ABSTRACT

Aiming to determine the LC₅₀ and analyze the brain morphology of larvae of honeybees *Apis mellifera* treated with the insecticide thiamethoxam, worker larvae of the 1st Istar were collected from the hive healthy apiary of the Department of Biology, UNESP, Rio Claro / SP and transferred to sterile plastic queen-starter cell, which contained the larval diet. After the transfer, the sterile plastic queen-starter cell were maintained at 34 ± 2 ° C and RH of $85 \pm 5\%$, the larvae fed daily from the 1st to 6th day. To power on the 4th day, prepared food containing various concentrations of thiamethoxam resulting in a dilution range, varying from 0.01 to 250ng of thiamethoxam/microl diet, and then providing it to 24 larvae / concentration. After 24 and 48 hours of in vitro exposure to the insecticide, the number of dead individuals was counted and data subjected to statistical analysis. Following the same procedures described above, experiments were conducted laboratory sublethal acute and chronic toxicity for morphological analysis and immunocytochemistry of the brain. After the bioassay, were collected five larvae of five instar stages (24 h after intoxication), 5 larvae of 5th instar period (48 h after intoxication) and 5 pre-pupae 72h (after intoxication) for morphological analysis and immunocytochemistry, both for the groups treated as for the control. Larvae were dissected under a stereomicroscope with cold light, at room temperature in a dissection plate containing fixative. With the aid of a scalpel, we removed the anterior end of each larva. Larvae were processed routinely, fixed and washed in the buffer of the respective fastener. For morphological analysis, larvae were dehydrated and embedded in historesin. The histological sections of material embedded in resin were stained with hematoxylin eosin. As for the immunohistochemistry, after the larvae were dehydrated and embedded in paraplast. By analyzing the data, we can determine the value of LC₅₀ after 48 hours of intoxication, she being the order of thiamethoxam 14.35 ng / microl diet ($G1 = 25 / \chi^2 = 32.009$), this value was adopted for sublethal laboratory bioassays. Besides the determination of the LC₅₀, the acute toxicity data suggest that when applied in high concentrations (100ng/μl; 50ng/μl), the insecticide caused a high mortality in the larvae. But when the insecticide was applied at low concentrations (5ng/μl; 0.5ng/μl, 0.05 ng/μl), there was an acceleration in larval development. By morphological analysis of the brain, we suggest that in both acute exposure and chronic exposure in the thiamethoxam accelerated the process of cell death in the region of the optical lobes, and that cells with pyknotic nuclei were concentrated in the medulla of the optic lobes. There is also evidence that this insecticide is advancing the process of cell death in the pedunculate bodies of pre-pupae of acute treatment. The same result can be seen in the

antennal lobes, since they apparently did not have this structure or morphological evidence of cell death. We conclude by immunocytochemical analysis of HSP 90, that there were no differences between the treated groups compared with the control group, showing that they are acting in the brain as molecular chaperones. The test results of cell death could confirm the deaths phones located in the region of optical lobes of the larvae of *Apis mellifera*.

Keywords: *Apis mellifera*, Brain, thiamethoxam, cell death, HSP90.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

	Página
Figura 1	p.17
Figura 2	p.26
Figura 3	p.31
Figura 4	p.32
Figura 5	p.33

Fotomicrografias

	Página
Figura 6	p.39
Figura 7	p.41
Figura 8	p.43
Figura 9	p.45
Figura 10	p.47
Figura 11	p.49
Figura 12	p.51
Figura 13	p.53
Figura 14	p.55
Figura 15	p.57
Figura 16	p.59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	p.13
2. OBJETIVOS	p.15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	p.16
3.1 Morfofisiologia do cérebro de <i>A.Mellifera</i>	p.16
3.2 HSPs (Heat Shock Proteins).....	p.19
3.3 Toxicidade do tiametoxam para <i>A. mellifera</i>	p.20
3.4 Avaliação da toxicidade dos inseticidas por meio de técnicas morfológicas.....	p.22
4.MATERIAL E MÉTODOS	p.24
4.1 Obtenção das larvas.....	p.24
4.2 Preparo da dieta larval.....	p.24
4.3 Ensaios de toxicidade aguda.....	p.25
4.4 Ensaios de intoxicação com dose subletal de tiametoxam.....	p.26
4.5 Análises morfológicas e imunocitoquímicas.....	p.27
4.5.1 Obtenção e preparo dos órgãos.....	p.27
4.5.2 Marcação da HSP90.....	p.28
4.5.3 Método Tunel (<i>TUNEL - In situ Cell Death Detection Kit</i>).....	p. 29
4.5.4 Análise dos órgãos por microscopia de luz.....	p.29
4.6 Análise Estatística.....	p.30
5. RESULTADOS	p.31
5.1 Ensaios de intoxicação aguda para determinação da CL ₅₀	p.31
5.2 Análises morfológicas.....	p.33
5.2.1 Lobos ópticos.....	p.33
5.2.2 Corpos pedunculados.....	p.34
5.2.3 Lobos antenais.....	p.34
5.3 Análises Imunocitoquímicas.....	p.35
5.3.1 HSP90.....	p.35
5.3.2 Morte Celular (Reação de TUNEL).....	p.36
6. DISCUSSÃO	p.60
7. CONCLUSÃO	p.67
8. REFERÊNCIAS	p.68

1. INTRODUÇÃO

Os polinizadores são imprescindíveis para a polinização de 84% das culturas agrícolas de importância econômica, dentre as quais, 70% são utilizadas para o consumo humano direto, além também de promover a polinização de áreas/florestas naturais (GALLAI et al., 2009; KREMEN et al., 2007). Dentre os polinizadores, destacam-se as abelhas sociais *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae), por serem altamente eficazes, apresentarem produtos de grande valor econômico, além de aumentarem a produção agrícola (MORSE e CALDERONE, 2000). Nesse contexto, o desaparecimento de várias espécies de abelhas vem preocupando pesquisadores no mundo todo. Recentemente, pesquisadores americanos identificaram o fenômeno denominado desordem do colapso das colônias (do inglês “Colony Collapse Disorder” - CCD), onde apicultores chegaram a perder até 75% de suas colônias de *Apis mellifera* (STOKSTAD, 2007; NEUMANN e CARRECK, 2010). Este fenômeno, ainda de origens não totalmente esclarecidas, é diagnosticado quando as abelhas campeiras, que são encarregadas de coletar néctar, pólen e resinas, não retornam às colméias. Contudo, uma das hipóteses deste fenômeno pode estar ligada a intoxicação das abelhas por inseticidas empregados na agricultura. Mesmo não sendo constatada no Brasil, o desaparecimento das abelhas principalmente nas regiões Sudeste e Centro Oeste começa a ser motivo de preocupação devido o intenso uso de produtos fitossanitários usados para o controle de pragas e doenças (MALASPINA e SOUSA, 2008).

As abelhas campeiras não são as únicas expostas aos pesticidas, mas sim todas aquelas que desenvolvem tarefas no interior da colméia como também as larvas, pois se alimentam de pólen e néctar que podem, eventualmente, estarem contaminados com defensivos agrícolas (RORTAIS et al., 2005). A concentração na qual as abelhas estão expostas sofre uma grande variação, sendo que a quantidade de xenobióticos, a persistência dos resíduos e a frequência de sua aplicação nas plantações, são fatores importantes para estipular os possíveis riscos, uma vez que esses compostos podem ser acumulados por um longo período no interior da colônia (CHAUZAT et al., 2006).

O pólen e o néctar contaminado com resíduos de pesticidas podem afetar o desenvolvimento das larvas, direta ou indiretamente. As larvas de *A. mellifera* são alimentadas várias vezes ao dia pelas operárias nutridoras. Segundo Babendreier et al. (2004), resta saber se as baixas quantias de inseticidas presentes no pólen pode afetar as abelhas através da exposição crônica. Recentemente Aupinel et al. (2005, 2007a, 2007b), sugeriram uma adaptação da metodologia proposta por Vandenberg e Shimanuki (1987) para avaliar a

toxicidade de inseticidas a larvas de abelhas *A. mellifera*. Esses autores pretendem incluir esse procedimento como padrão na avaliação de novos compostos a serem comercializados na Comunidade Européia, somando-se aos procedimentos já adotados que avaliam riscos letais e subletais (EPPO, 1993) como por exemplo alterações fisiológicas e comportamentais (PHAM-DELÉGUE et al., 2002; THOMPSON, 2003; JOHNSON et al., 2006 e DESNEUX et al. 2007).

As abelhas podem ser utilizadas como bioindicadores uma vez que elas são sensíveis aos efeitos de substâncias tóxicas. Pesquisas apontam a importância das abelhas *A. mellifera* como bioindicadores para a detecção de resíduos de defensivos agrícolas em plantas (MANSOUR, 1987; BADIOU et al., 2008) e também para a contaminação por metais pesados (TOPORCAK et al., 1992; CONTI e BOTRE, 2001). O uso das abelhas *A. mellifera* como uma ferramenta no monitoramento da poluição ambiental tem sido discutido em estudos prévios (PORRINI et al., 2002; BARISIC et al., 2002; TREMOLADA et al., 2004; TSIGOURI et al., 2004). Neste contexto, os estudos de órgãos das abelhas afetados por exposição a defensivos agrícolas são importantes ferramentas para avaliar o risco ecotoxicológico de determinada substância, bem como a análise das alterações morfológicas e detecção da taxa de morte celular tornam-se imprescindíveis.

2. OBJETIVOS

Sendo as abelhas *Apis mellifera* de grande importância econômica e sabendo-se da toxicidade do tiametoxam a organismos não alvos, o presente estudo teve como objetivos:

- Determinar em condições laboratoriais a concentração letal (CL₅₀) do inseticida tiametoxam para larvas de abelhas africanizadas;

- Avaliar através de análise morfológica, o efeito tóxico de doses subletais do tiametoxam no cérebro (lobos ópticos, corpos pedunculados e lobos antenais) de larvas de abelhas durante as fases do 5º instar inicial e final, bem como em de pré-pupas por meio de exposição aguda e crônica;

- Verificar por meio de análises imunocitoquímicas a ocorrência de morte celular e a expressão da HSP90 no cérebro de larvas abelhas africanizadas *Apis mellifera*, expostas à doses subletais de tiametoxam.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Morfofisiologia do cérebro de *A. Mellifera*

Muitas espécies para adquirirem a forma de um adulto, passam por duas formas de vida diferentes, a forma larval e adulta, que são unidas por uma fase chamada de metamorfose. Durante a metamorfose o inseto sofre várias mudanças e adaptações no seu corpo, de forma que uma larva com comportamento e hábito de vida diferentes, dê origem a um inseto adulto. As abelhas assim como todos os insetos holometábolos, tem seu ciclo vital composto pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. Durante o desenvolvimento larval, não ocorrem grandes mudanças na forma do corpo, embora algumas mudanças sejam mais acentuadas na última fase do estágio larval. Sendo assim, o sistema nervoso larval dá origem diretamente ao sistema nervoso central das abelhas, sendo que a estrutura desse sistema é essencialmente a mesma, porém sofre uma remodelação, ou seja, um novo sistema nervoso é formado a partir de um pré-existente. Essa remodelação ocorre especialmente durante a metamorfose (CHAPMAN, 1998; SNODGRASS, 1956).

O cérebro das abelhas está dividido em três regiões distintas, sendo elas o protocérebro, deutocérebro e tritocérebro. O protocérebro constitui a maior parte da massa cerebral, inclui os lobos ópticos, um par latero-dorsal de corpos pedunculados, a ponte cerebral e o corpo central. No deutocérebro, estão localizados os centros olfatórios antenais e também os corpos celulares dos nervos motores dos músculos das antenas. Nas antenas das abelhas, localizam-se os principais órgãos sensoriais olfatórios, os quais são de essencial importância nas interações sociais. E por último, o tritocérebro que é reduzido nos insetos. (SNODGRASS, 1956). As principais regiões do cérebro acima descritas podem ser visualizadas na figura 1.

No protocérebro existem duas estruturas importantes do ponto de vista fisiológico, morfológico e também funcional. Estas estruturas denominadas lobos ópticos e corpos pedunculados exercem funções importantes para a manutenção da vida das abelhas.

Os lobos ópticos são extensões laterais do protocérebro, cada um, no inseto adulto, consiste de camadas internas conhecidas como lâmina, medula e lóbulo. Essas regiões são de grande importância, pois nelas existem receptores específicos para os estímulos enviados pelos fotorreceptores da camada externa, a retina. A lâmina, a medula e o lóbulo estão intercaladas com regiões de neurópilas, que nada mais são do que regiões que concentram uma grande quantidade de prolongamentos nervosos. As regiões de neurópila são denominadas de quiasma interno e quiasma externo, e também são importantes, já que estão

relacionadas com o mapa neural da visão (CHAPMAN, 1998; CRUZ-LANDIM et al., 1979 ROAT e CRUZ-LANDIM, 2010).

Os corpos pedunculados, são estruturas conhecidas como centro de aprendizagem e memorização dos insetos, sendo os principais centros que guiam o comportamento do inseto adulto pela estimulação sensorial através de informações trazidas das antenas e dos olhos. Dessa forma, esta estrutura está relacionada com o sistema olfatório e com a aprendizagem visual, e tem chamado a atenção de pesquisadores, pois pode ser usada como um possível modelo para estudos da neurociência. Os elementos básicos dos corpos pedunculados são as células de Kenyon, os cálices e pedunculos. As células de Kenyon formam um conjunto de 170.000 células em cada corpo pedunculado, representando 40% do total de neurônios do cérebro (CHAPMAN, 1998; FAHRBACH, 2006).

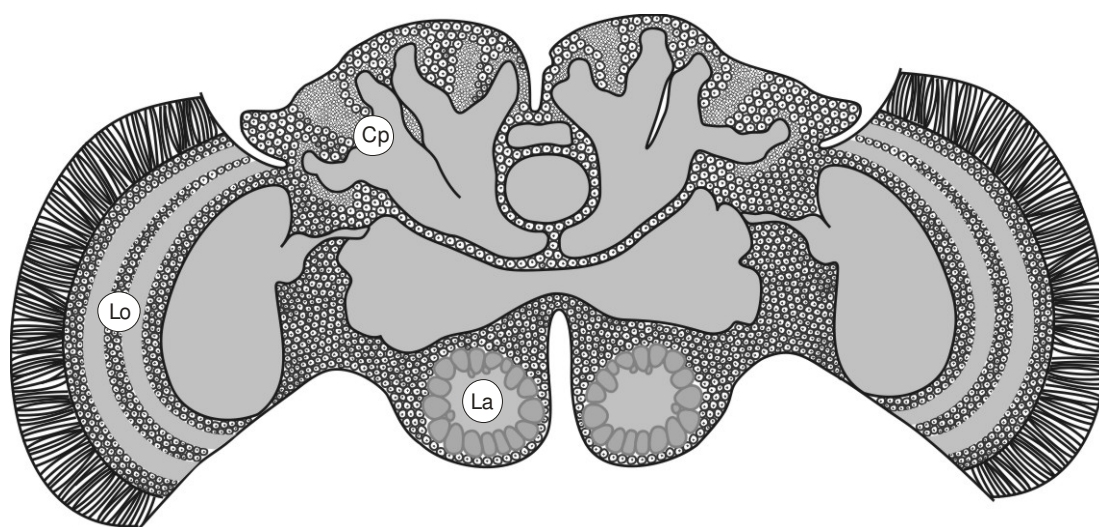


Figura 1. Esquema das diferentes estruturas do cérebro de abelha adulta: Cp- Corpos pedunculados; Lo- Lobos ópticos; La- Lobos antenais; Cp e Lo, fazem parte do protocérebro, enquanto que La faz parte do deutero cérebro (NOCELLI et al., 2010) adaptado.

O deutero cérebro das abelhas adultas, é constituído por dois lobos laterais ao esôfago, onde estão localizados os centros olfatórios, que contêm as arborizações terminais dos axônios dos neurônios sensoriais das antenas, e os corpos celulares dos nervos motores desses apêndices (CRUZ-LANDIM, 2009). Os lobos antenais são basicamente formados por neurópila, que contêm os prolongamentos das células sensoriais contidas na antena, e os prolongamentos dos neurônios motores, que por sua vez estão organizados no próprio lobo.

Essas estruturas são de suma importância, já que recebem estímulos provenientes das antenas.
Daiana Antonia Tavares

Roat e Cruz-Landim (2008), utilizando técnicas de histologia convencional, verificaram que em larvas de 5º instar de *Apis mellifera* já é visível a formação dos lobos ópticos, corpos pedunculados e lobos antenais, continuando o desenvolvimento e remodelação durante as fases de pré-pupa e pupa. A remodelação do cérebro é baseada em mecanismos essenciais para que este evento ocorra, sendo elas: morte, proliferação e diferenciação celular. O sistema nervoso larval que antes realizava funções menos complexas, como de alimentação e simples atividades locomotoras, é convertido para um sistema que desenvolverá atividades mais complexas como por exemplo o voo.

Segundo Truman (1984), a morte de neurônios acontece em diversos contextos da vida dos insetos. A morte pode ocorrer para regular o tamanho da população de neurônios, como também para eliminar neurônios cujas funções são desnecessárias.

Os tipos de morte celular mais conhecidos e que diferem entre si por suas características morfológicas são a apoptose, autofagia e necrose. A apoptose e a autofagia são consideradas como sendo um tipo de morte celular programada, e a necrose, morte celular patológica (KERR et al., 1972; PROSKURYAKOV et al., 2003). Pouco se sabe sobre a morte celular em tecidos e órgãos de insetos em resposta a agentes tóxicos. Gregorc et al. (2004 e 2007) avaliaram a taxa de morte celular, utilizando marcação imunocitoquímica da fragmentação do DNA, no intestino de abelhas tratadas com acaricidas naturais e sintéticos. Alguns trabalhos ressaltam as alterações ultra-estruturais ocasionadas pela exposição de cultura de células ao mercúrio orgânico e inorgânico (BRAECKMAN e RAES, 1999) e, também, o cádmio (BRAECKMAN et al., 1999). Os resultados dessas pesquisas revelam que doses subletais destes compostos causaram alterações ultraestruturais nas células do inseto. Os autores acreditam que essas alterações ultraestruturais não são características de necrose, mas da ativação da morte celular programada.

Embora existam alguns estudos sobre morte celular programada em insetos, (GANESHINA et al., 2000; ROAT e CRUZ LANDIM, 2010; eles relatam esse processo na reorganização tecidual que ocorre durante a metamorfose ou com a involução natural de algum órgão na fase adulta.

No cérebro, estudos demonstram que nos corpos pedunculados de operárias, as mortes celulares fisiológicas acontecem principalmente durante o estágio de pupa de olhos pretos. Já nos lobos ópticos, as mortes celulares podem ser detectadas em operárias de *A. mellifera* durante a fase de pupa de olhos brancos, e em rainha e zangões as mortes celulares podem ser observadas já em larvas de 5º instar. Nos lobos antenais, por haver uma grande quantidade de

neurópila não há indícios de quando eventos característicos de morte celular fisiológica acontecem (GANESHINA et al., 2000; ROAT e CRUZ-LANDIM, 2008; ROAT e CRUZ-LANDIM, 2010).

Sabendo o momento em que as mortes celulares fisiológicas começam a acontecer nas estruturas cerebrais de larvas de *A. mellifera*, e que os inseticidas neonicotinóides possuem ação neurotóxica, é de suma importância a investigação dos efeitos deletérios do tiametoxam no cérebro de larvas dessa abelha, já que essas informações poderão fornecer subsídios para futura utilização destas abelha como bioindicadora da qualidade ambiental.

3.2 HSPs (Heat Shock Proteins)

As HSPs são proteínas que receberam a denominação de Proteínas de Choque Térmico devido à descoberta destas nas células de *Drosophila*, expostas ao aumento da temperatura (tipo de estresse), mas elas também estão presentes em condições normais, embora em quantidades diferentes em relação às condições de estresse.

As HSPs são classificadas em quatro famílias, baseado em sua massa molecular, HSP 90 (90 kDa), HSP 70 (70 kDa), HSP 60 (60 kDa) e as pequenas HSPs (GARRIDO et al., 2001). Os membros das famílias de HSPs, quando expressos, desempenham um papel central na proteção e manutenção de várias funções celulares vitais. Essas proteínas também desempenham a função de chaperonas celulares (BECKER e CRAIG, 1994, YOKOYAMA et al., 2000) devido a sua ação no dobramento das proteínas recém-sintetizadas, propiciando sua conformação tridimensional adequada, além de atuar na sua translocação para as organelas, no reparo de proteínas mal dobradas e/ou instáveis, na dissolução de complexos protéicos e na prevenção da agregação de proteínas (LINDQUIST e CRAIG, 1988; MARIMOTO et al., 1994). Embora esses genes tenham sido descobertos pela ação do choque térmico, há vários fatores que foram descritos como indutores dos membros das famílias de HSPs, e devido a isso, atualmente a designação de genes/proteínas de estresse é a mais adequada para caracterizar as HSPs (SANDERS, 1993).

Não se sabe até o momento, o mecanismo exato de como as HSPs protegem a integridade celular dos organismos expostos aos pesticidas. Sabe-se que nos órgãos de animais submetidos a tratamentos com substâncias tóxicas, há indução das HSPs nas células, o que por sua vez, pode induzir ou impedir o processo de morte celular (SILVA-ZACARIN, et al., 2006).

As HSPs podem atuar em múltiplos pontos das vias de sinalização intracelular, envolvida na morte celular programada do tipo apoptótica (GARRIDO et al., 2001). Em mamíferos, HSP27 e HSP70 são proteínas anti-apoptóticas, enquanto que HSP60 e HSP10 são pró-apoptóticas. A função da HSP90 na apoptose ainda é controversa porque alguns membros dessa família atuam em vias sinalizadoras anti-apoptóticas, enquanto outros são pró-apoptóticos (Garrido et al., 2001). Bierkens (2000) ressaltou a importância da detecção de diversos membros de HSP, com a finalidade de detectar a possibilidade de haver várias respostas celulares a um mesmo estímulo de estresse.

Adicionalmente, as HSPs poderiam participar de uma rota alternativa para degradação autofágica, denominada autofagia mediada por chaperona (CUERVO e DICE, 1996), onde proteínas com uma seqüência-sinal específica, são transportadas para o lúmen lisossomal por um processo mediado por receptor associado às HSPs.

Roat (2008), por meio de análises de expressão protéica, relata a presença das HSPs na metamorfose do cérebro de *Apis mellifera*, e que esse fato, pode ser justificado levando-se em consideração a grande variedade de funções de chaperonas moleculares por elas exercidas (GARRIDO, 2001). Em pré-pupas de *Apis mellifera*, a expressão de HSP90 no cérebro (ROAT, 2008) pode estar relacionada com o processo de diferenciação, uma vez que é sabido que o controle da degradação dos tecidos larvais, e a diferenciação daqueles próprios dos adultos é em grande parte dependente de ecdisteróides. Sabendo-se da possível ativação das HSPs em condições de estresse celular, a investigação da função dessas proteínas perante o tratamento com pesticidas torna-se de suma importância.

3.3 Toxicidade do tiametoxam para *A. Mellifera*

Dentre os vários grupos de inseticidas, destacam-se os neonicotinóides, que representam uma das classes de inseticida mais utilizada para o controle de pragas. (TOMIZAWA e CASIDA, 2003; ELBERT et al., 2008). Essa nova geração de inseticidas, veio substituir os organofosforados e carbamatos, os quais têm diminuído a sua eficiência devido à resistência dos insetos, ou ainda, sendo menos utilizados considerando o aumento das restrições de seu uso, levando em consideração os aspectos toxicológicos no campo. No grupo dos neonicotinóides, estão entre os mais relevantes inseticidas o imidacloprido, acetamiprido, e o tiametoxam (TOMIZAWA e CASIDA, 2003; YAMAMOTO e CASIDA, 1999; NAUEN e BRETSCHNEIDER, 2002). Segundo Elbert, et al. (2008), o primeiro neonicotinoide produzido foi o imidacloprido pela Bayer, no ano de 1991, desde então, houve uma grande

expansão no desenvolvimento e uso desses compostos, já que apresentam uma ampla eficácia, efeito sistêmico e atividade residual.

O tiametoxam, um neonicotinóide de segunda geração é fabricado/comercializado pela Syngenta Proteção de Cultivos LTDA e é comercializado com os nomes comerciais de Actara[®], Adante[®], Eforia[®], Engeo[®], Cruiser[®], Alike[®], Verdadero[®], Platinum Neo[®], podendo ser aplicado tanto por via terrestre quanto aérea. Este produto é utilizado em diversas culturas, como: citros, café, cana-de-açúcar, arroz, abacaxi. (ANDREI, 2009; NAUEN e BRETSCHEIDER, 2002). Contudo, além de controlar os insetos-praga este composto pode também afetar as abelhas. Segundo Chapman, (1998) a acetilcolina é o neurotransmissor mais difundido nos insetos, e diante disto, estudos evidenciam que o tiametoxam compete diretamente com os receptores de nicotina e acetilcolina, podendo apresentar um longo efeito residual (MAIENFISCH et al., 2001). No cérebro das abelhas há uma grande quantidade de receptores de acetilcolina especialmente nas regiões de neurópila, que são encontradas em todo sistema nervoso central (BICKER, 1999; TOMIZAWA e CASIDA, 2003).

Hashimoto et al. (2003) observaram a inibição significativa de algumas carboxylesterases, enzimas envolvidas na metabolização de alguns inseticidas, de operárias de *Apis mellifera* africanizadas tratadas com tiametoxam. Neste trabalho, os autores relatam que a maior toxicidade ao tiametoxam foi observada em operárias recém-emergidas, e que o grau de toxicidade foi diminuindo com o aumento da idade das operárias. Hassani et al. (2008) realizaram testes comportamentais em *Apis mellifera* expostas a dosagens subletais do inseticida tiametoxam, sendo que as abelhas tratadas não apresentaram diferenças quando comparadas com o grupo controle.

Sendo o cérebro o grande responsável pelo controle das atividades desenvolvidas pelas abelhas, como por exemplo exploração do ambiente e busca de alimento, ele é alvo indireto da ação de inseticidas neonicotinóides. Iwasa, et al. (2004) estudaram a ação de alguns inseticidas neonicotinóides, expondo as abelhas a estes compostos em condições laboratoriais, e verificaram que o mais tóxico foi o imidacloprido, cuja DL₅₀ foi na ordem de 17,9 ng/abelha, seguido de outros inseticidas, dentre os quais o tiametoxam apresentou a DL₅₀ de 29,9 ng/abelha. Em estudos realizados em abelhas sem ferrão foi também possível observar a toxicidade desses compostos, sendo que dentre as classes de inseticidas avaliadas, os neonicotinóides foram os mais tóxicos (NÚNES et al., 2009).

Yang et al. 2008, através de testes comportamentais, verificaram que operárias expostas a doses subletais de imidacloprido, tiveram suas atividades de forrageamento afetadas.

Provavelmente os neonicotinóides afetam o comportamento das operárias, já que atuam diretamente nos receptores de nicotina e acetilcolina, podendo causar excitação, paralisia e até morte (ISHAAYA et al., 2007). Além da toxicidade e alterações comportamentais, esses inseticidas podem acumular-se no interior da colônia. Chauzat et al. (2009) realizaram estudos sobre os resíduos de pesticidas em colméias (mel, cera e pólen), verificando que o imidacloprido estava presentes em todas. Os autores relatam que neste estudo, não foi possível atribuir a mortalidade das colônias à presença dos resíduos de inseticidas, sendo necessário a realização de outros estudos para determinar o efeito desses resíduos no interior das colméias, e também a associação deles com outros fatores.

Segundo Smirle e Winston (1988), a susceptibilidade das abelhas frente a um inseticida ao longo de sua vida, está diretamente ligada em mecanismos de adaptação, onde o sistema enzimático responsável pela degradação de moléculas apresenta baixa eficiência logo após a emergência do adulto, tornando-se mais eficaz naquela idade onde as operárias realizam a atividade de explorar o ambiente por recursos.

3.4 Avaliação da toxicidade dos inseticidas por meio de técnicas morfológicas

Recentemente, estudos demonstram a importância da análise morfológica de órgãos dos insetos não alvos, como as abelhas, quando submetidas à exposição a inseticidas e outros xenobióticos. A morfologia pode ser utilizada como um parâmetro para avaliar a exposição dos compostos, já que, compostos químicos, como inseticidas podem acumular-se nos órgãos podendo causar alterações morfológicas e ultraestruturais (MALASPINA e SILVA-ZACARIN, 2006). Estudos neste sentido são ainda escassos, sendo que recentemente Cruz et al. (2010) investigaram a toxicidade do fipronil e do ácido bórico no ventrículo de larvas de abelhas africanizadas *A. mellifera*, verificando alterações no ventrículo, sendo essas mais expressivas no tratamento com o ácido bórico. Estudos similares foram realizados por Kakamand et al. (2008) com o objetivo de avaliar a possível alteração no ventrículo de larvas de operárias de *A. mellifera* submetidas ao tratamento com três tipos de inseticidas, dentre eles o tiametoxam. Constatou-se que, após a ingestão dessas substâncias, houve uma alteração significativa na histologia do ventrículo das abelhas tratadas quando comparadas com o grupo controle, como núcleos anormais e a presença de grandes vacúolos citoplasmáticos celulares. FERREIRA, et al. (2010) ao estudarem os túbulos de Malpighi e o corpo gorduroso de operárias de *Scaptotrigona Postica*, verificaram que após a exposição a doses subletais de ácido bórico e fipronil, ocorreram alterações morfológicas em ambos os órgãos. Além das

abelhas, outros invertebrados podem ser utilizados para estudos de contaminantes ambientais como metais pesados e hidrocarbonetos através de análises morfológicas. Souza e Fontanetti (2011) constataram os efeitos desses poluentes no intestino de diplópodos. Como pudemos observar, a maioria dos estudos morfológicos em abelhas são realizados principalmente na região do ventrículo, órgão responsável pela absorção dos compostos químicos presentes na alimentação, podendo usar os resultados obtidos para avaliar a toxicidade dos defensivos agrícolas as abelhas, uma vez que os serviços ambientais prestados por esses insetos é de suma importância.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das Larvas

As larvas foram coletadas no apiário pertencente ao departamento de biologia da UNESP- campus Rio Claro, onde foi selecionada uma colméia forte e saudável. Todos os experimentos foram realizados empregando a metodologia proposta por Aupinel et al. (2005 e 2007), porém com algumas adaptações. Um quadro com células limpas foi adicionado no interior da colméia para que a rainha pudesse realizar a ovoposição e assim obter quantidade suficiente de larvas de 1º instar (L1). Após o desenvolvimento embrionário, as larvas L1 com até 24 horas de idade, foram transferidas para cúpulas de poliestireno contendo alimento previamente preparado, sendo as cúpulas dispostas em placas de cultura celular de 48 poços, mantidas dentro de uma caixa de polietileno hermeticamente fechada à $34\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $90\pm 5\%$ e ausência de luz.

4.2 Preparo da dieta larval

A dieta larval foi composta pelos açúcares D-glucose, D-frutose extrato de levedura e geléia real, sendo que a concentração variou conforme exigências do inseto em suas diversas fases de desenvolvimento (Tabela 1) (Aupinel et al., 2005 e 2007). Todos os alimentos foram preparados em solução aquosa autoclavada, e posteriormente filtrados usando filtro milipore. As larvas foram alimentadas com o auxílio de uma micropipeta, sendo a frequência, quantidade e tipo do alimento como descrito na Tabela 2.

Tabela 1. Composição nutricional e concentração dos alimentos empregados na criação *in vitro* de larvas de *Apis mellifera*.

Ingredientes da Dieta	Concentração dos Ingredientes		
	A	B	C
D-glucose	12 %	15 %	18 %
D-frutose	12 %	15 %	18 %
Extrato de levedura	2 %	3 %	4 %
Geléia real	50 %	50 %	50 %

Tabela 2. Tipos de alimento, quantidade e frequência de alimentação das larvas de *Apis mellifera* criadas *in vitro* (Aupinel et al., 2005).

	Dia					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Tipo	A	Período de aclimação		B	C	C
Alimento		sem fornecimento de				
Volume (μL)	20	alimento		20	30	40
				50		

4.3 Ensaio de toxicidade aguda

Para a determinação das doses subletais que foram empregadas nos ensaios subseqüentes, foi determinada a concentração letal (CL_{50}) do inseticida tiametoxam seguindo a metodologia proposta por Aupinel et al. (2007), porém com algumas adaptações. Para isto, foram utilizadas microplacas de cultivo celular de 48 poços, sendo que em cada poço foi colocado $\frac{1}{4}$ do comprimento de algodão dental esterilizado e em seguida embebido com 500 μL de uma solução aquosa contendo 15% de glicerol e 0,2% de dicloroisocianurato de sódio. Já as cúpulas foram previamente esterilizadas durante 30 minutos com a mesma solução dicloroisocianurato de sódio e secas em capela de fluxo laminar. Após secagem, elas foram acondicionadas em cada poço das microplacas e posteriormente foi distribuída a dieta artificial no interior das cúpulas (20 μL alimento por cúpula). Após este procedimento, as microplacas foram acondicionadas dentro de uma caixa plástica com travas laterais, contendo béqueres com solução de K_2SO_4 com o objetivo de manter a umidade (Figura 2). Para evitar o choque térmico no momento da transferência das larvas, as caixas contendo microplacas foram colocadas dentro da B.O.D. a temperatura de $34\pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $90\pm 5\%$. Para a manutenção da umidade dentro da B.O.D., uma bandeja contendo a mesma solução do interior da caixa plástica foi acondicionada (Figura 2). As larvas foram alimentadas desde o primeiro ao sexto dia, exceto no segundo dia, que segundo Aupinel et al. (2005) é um período de aclimação da larva às condições laboratoriais, sendo suas necessidades nutricionais supridas no ato da primeira alimentação. Com intuito de determinar a CL_{50} do tiametoxam para as larvas de *A. Mellifera*, preparou-se o alimento C (Tabela 1) contaminado com diversas concentrações (de 0,01 à 250 ng tiametoxam/ μL alimento) desse inseticida, sendo então fornecido as larvas no quarto dia, segundo cronograma proposto na Tabela 2. Nos dias subseqüentes, as larvas foram alimentadas somente com a dieta C não contaminada. Para cada

concentração bem como para o grupo controle, utilizou-se 24 larvas dispostas em três repetições de oito larvas (Figura 2). Após a intoxicação, foi contabilizada a mortalidade de larvas (24h e 48h) sendo os dados submetidos à análise estatística.

Vale ressaltar que para obter um valor confiável e reprodutível da CL_{50} do tiametoxam para larvas, foram realizadas replicatas.

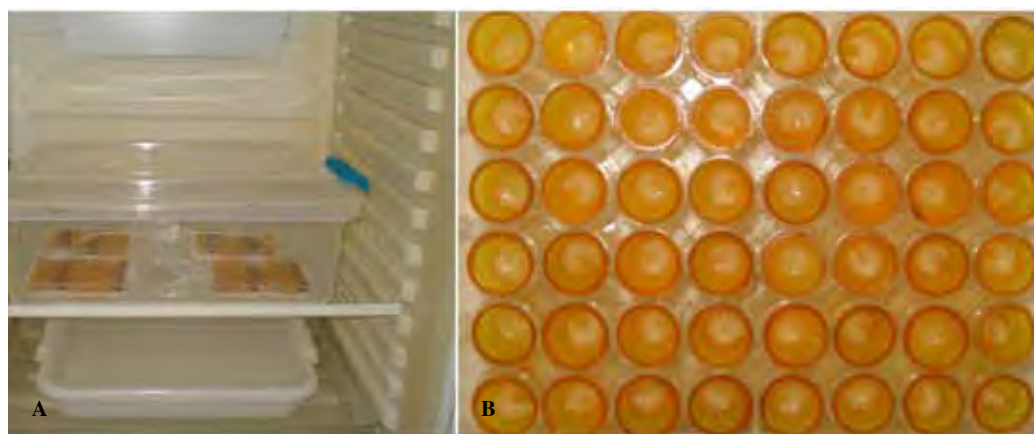


Figura 2. (A) Disposição da B.O.D. contendo a caixa de polietileno com as placas de cultura celular + as cúpulas com larvas, além da bandeja com solução K_2SO_4 ; (B) vista superior de uma placa de cultura celular + cúpulas com larvas de *Apis mellifera* em final de 5º instar larval e em fase de pré-pupa.

4.4 Ensaio de intoxicação das larvas com dose subletal de tiametoxam

Nos ensaios de intoxicação, larvas de 1º instar foram coletadas (como descrito item 4.3) para serem expostas a doses subletais ($CL_{50/10}$) do inseticida tiametoxam, sendo esse inseticida administrado através de dois tipos de exposição: aguda e crônica. No primeiro caso, a dose subletal $CL_{50/10}$ foi aplicada uma única vez via alimento contaminado no quarto dia, sendo que as larvas vivas foram coletadas 24h, 48h e 72h após intoxicação. Para cada tratamento e tempo, cinco larvas foram coletadas, pesadas e sua exata fase de desenvolvimento (sub-fase do 5º instar) determinada de acordo com as características morfológicas propostas por Michelette e Soares (1993) (Tabela 3). Larvas de 5º instar inicial (fase F) e final (fase S) foram coletadas no quinto e sexto dia respectivamente. O sétimo dia corresponde ao final do período de alimentação larval e início da fase de pré-pupa (fase PP), onde foram coletadas pré-pupas iniciais em ambos os tratamentos ($n=5$).

Para a exposição crônica a dose referente à $\frac{1}{3}$ da $CL_{50/10}$ do tiametoxam foi administrada via alimentação durante o 4º, 5º e 6º dia. As larvas de 5º instar ($n=5$) foram

coletadas 24h e 48 horas após o fornecimento da dieta contaminada. No sétimo dia também foram coletados exemplares de pré-pupas.

Tabela 3. Classificação das diferentes subfases do 5º instar larval de operárias africanizadas de *Apis mellifera* em desenvolvimento natural (colônia), segundo Michelette e Soares, (1993).

Fase	Descrição	Subfase	Peso médio de larvas (mg)
F (“feeding”)	Células não operculadas	F1	34,87 ±7,75
		F2	72,05 ±18,96
		F3	111,32±4,54
S (“spinning”)	Tecimento dos casulos; células operculadas no final da fase	S1	124,21±7,48
		S2	117,88±4,65
		S3	117,88±4,65
PP (“pré-pupae”)	-	PP1	113,64±6,346
		PP2	112,57±4,75
		PP3	107,55±5,90

4.5 Análises morfológicas e imunocitoquímicas

4.5.1 Obtenção e preparo dos órgãos

Para obtenção dos órgãos, as larvas coletadas nos diversos tratamentos foram dissecadas com ajuda de um estereomicroscópio com luz fria, à temperatura ambiente, em uma placa de dissecação contendo fixador.

Para as análises morfológica e imunocitoquímica, as extremidades anteriores (cabeça) das larvas foram imersas em uma solução de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4 + 4% de paraformaldeído. Posteriormente, todo material foi lavado em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4 e desidratados progressivamente por meio de soluções alcoólicas à 4°C (gradiente de 15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100% etanol), duas horas para cada troca com a finalidade de se obter uma desidratação lenta que preserve adequadamente os sítios antigênicos a serem detectados na análise imunocitoquímica e proporcionar um material de excelente qualidade para análise morfológica, segundo metodologia proposta por Silva-Zacarin (comunicação pessoal). Para análise morfológica, o material foi embebido e incluído em historesina, enquanto que para análise imunocitoquímica, o material foi diafanizado em xilol, após a troca do último álcool, embebido e incluído paraplax. Foram feitas secções histológicas de 5µm, e posteriormente o material foi incluído em historesina e coradas com

Hematoxilina-Eosina. Foram feitas secções histológicas de (7 μ m) dos órgãos incluídos em paraplast utilizados para a detecção imunocitoquímica de HSP 90, bem como para fragmentação do DNA, utilizando um kit específico (*in situ* Cell Death Detectetion kit) sendo que o procedimento foi de acordo com o manual do fabricante.

4.5.2 Marcação da HSP90

O princípio básico da imunocitoquímica para HSPs é simples: após bloquear a peroxidase endógena do tecido, anticorpos monoclonais primários (anti-HSP90) são adicionados ao tecido para que os mesmos reajam com os respectivos antígenos (HSP90). Após a incubação do anticorpo primário, os anticorpos primários livres são removidos por lavagem e, posteriormente, os anticorpos secundários conjugados com a enzima fosfatase alcalina são acrescentados. Após a incubação, os anticorpos secundários livres são removidos por lavagem e o substrato para fosfatase alcalina, é adicionado ao tecido, produzindo uma cor visível ao microscópio de luz nos locais onde as HSPs estão presentes.

Após desparafinizadas, as secções histológicas dos órgãos foram imersas em uma solução de metanol/hidróxido de hidrogênio para bloqueio de peroxidase endógena, durante 30 min, à temperatura ambiente. Em seguida, as secções histológicas foram lavadas em água corrente, por 5 min e 3 vezes em PBS (2 minutos cada troca) e recobertas com solução de proteinase K (20 μ g/ml em 10Mm Tris-HCl, pH 7,5), por 15 min, à temperatura ambiente e uma câmara úmida. Soro normal também foi utilizado como controle de marcação inespecífica.

Após esta permeabilização, as lâminas, contendo as secções histológicas, foram lavadas em 4 banhos de água destilada de 2 min cada, 2 vezes em PBS, por 5 min em cada banho, e incubadas em soluções de anticorpos primários anti-HSP 90 (Sigma), diluídos em PBS (1:300 para anti-HSP90). Na secção histológica, correspondente ao *controle negativo* da coloração, não foi adicionado o anticorpo. A incubação das secções foi feita a 4^o C, durante a noite, em câmara úmida.

Após esta etapa, as secções foram lavadas 3 vezes em PBS (2 minutos cada, com agitação) e incubadas com o anticorpo secundário, conjugado com a fosfatse alcalina, usando o kit Novostain Super ABC. A incubação com o anticorpo secundário foi feita em câmara úmida, por 30 min, à temperatura ambiente e, em seguida, as secções foram lavadas 2 vezes em PBS (5 min cada troca). Nova incubação, por 30 min, à temperatura ambiente e em câmara úmida foi feita em 1 gota da solução diluída do reagente Novostain Super. As secções

foram, posteriormente, lavadas 2 vezes em PBS (5 minutos cada troca) e, individualmente, coradas pela solução contendo substrato para fosfatase alcalina recém preparada, por aproximadamente 5 minutos, à temperatura ambiente. O material foi lavado em água corrente, por 5 minutos e em água destilada, e, por último, montado em gelatina para lâmina semi-permanente. As lâminas foram armazenadas na geladeira para endurecimento da gelatina e, em seguida, analisadas e fotodocumentadas ao microscópio de luz.

4.5.3 MÉTODO TUNEL (*TUNEL - In situ Cell Death Detection Kit*)

Depois de desparafinizadas, as secções histológicas do órgão foram recobertas com solução de proteinase K (20 µg/ml em 10Mm Tris-HCl, pH 7,5), por 15 min, à temperatura ambiente e câmara úmida. Após esta permeabilização, as lâminas, contendo as secções histológicas, foram lavadas em 4 banhos de água destilada de 2 min cada, 2 banhos em PBS, de 5 min cada, e processadas, segundo o protocolo descrito pelo fabricante (Roche Molecular Biochemicals), para detecção imunocitoquímica de quebras no DNA, utilizando o Kit ISCDDK (*In situ Cell Death Detection Kit*).

De acordo com esta metodologia, 50 µl da solução de Tunnel (enzima e nucleotídeos marcados), recém preparada, foram colocados sobre as secções histológicas, porém a secção controle recebeu 50 µl da solução sem a enzima. As secções foram incubadas por 60min em câmara úmida, à 37° C. Nesta etapa, às quebras na fita de DNA das células fixadas são adicionadas “caudas nucleotídicas”, a partir das extremidades 3'-OH livre, marcadas com fluoresceína.

Após a incubação, as secções foram lavadas 3 vezes em PBS (2 min cada troca) e incubadas com 50 µl do Conversor-AP (anticorpos anti-fluoresceína, conjugados com a enzima peroxidase), por 30 min, em câmara úmida, a 37° C. Nesta etapa, os anticorpos são acoplados às “caudas nucleotídicas” marcadas com fluoresceína.

Em seguida, as secções foram, novamente, lavadas 3 vezes em PBS (1 min cada troca) e 50 µl da solução de DAB (diaminobenzidina) foram colocados sobre cada secção histológica, procedendo-se a incubação por 3 minutos, à temperatura ambiente, tempo necessário para a visualização do depósito de cor castanha nos núcleos com fragmentação cromatínica por meio de microscopia de luz convencional. Após a incubação, as secções histológicas foram lavadas 3 vezes em PBS (1 min cada troca) e 4 vezes em água destilada (1 minuto cada troca), contra-coradas por 1 minuto com Hematoxilina de Mayer, lavadas em água corrente e água destilada e, por último, montadas em gelatina para lâmina semi-

permanente. As lâminas foram armazenadas na geladeira para endurecimento da gelatina e, em seguida, foram analisadas e fotodocumentadas ao microscópio de luz.

4.5.4 Análise dos órgãos por microscopia de luz

Após o processamento do material, os cortes corados com Hematoxilina Eosina assim como os cortes submetidos aos testes imunocitoquímicos, foram analisados sob microscopia de luz, onde os grupos tratados puderam ser comparados com os grupos controles tanto para o tratamento agudo quanto para o tratamento crônico. Adicionalmente, a confecção de 3 a 5 lâminas histológicas alternadas (com cortes seriados) para cada indivíduo possibilitou a eliminação do efeito de corte e trouxe informações confiáveis e elucidativas. Três indivíduos de cada grupo (controle e expostos ao tiametoxam) foram avaliados.

4.6 Análise estatística

Nos ensaios de intoxicação, as mortalidades foram contabilizadas 24h e 48h após a ingestão do inseticida tiametoxam. Além da mortalidade, as diversas fases larvais ao longo do desenvolvimento ontogenético foram observadas, comparando-se características morfológicas externas das larvas entre os grupos tratados e controle. Os dados obtidos no item 4.3, ensaio de toxicidade aguda foram submetidos a análise do tipo dose-resposta empregando-se um modelo log-logístico do pacote “drc” (Ritz e Streibig, 2005) compilado pelo software R® (2010). De posse do modelo matemático, calculou-se o valor da CL_{50} como também o intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

5.1 Ensaio de intoxicação aguda para determinação da CL₅₀

Com base nos experimentos de toxicidade aguda, foi estimada a CL₅₀ sendo da ordem de 14,35 ng tiametoxam/μl de dieta (Figura 3).

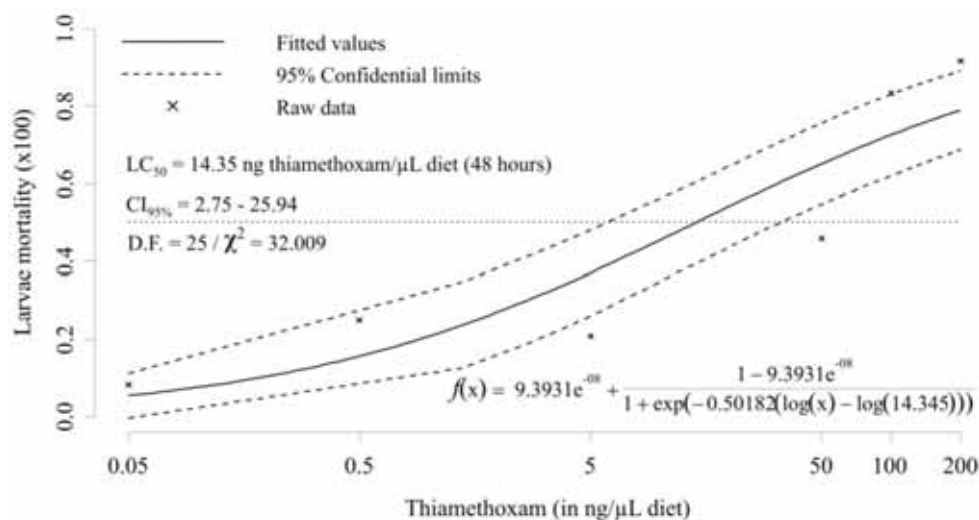


Figura 3. Mortalidade de larvas (48 horas) de *Apis mellifera* em função das diferentes concentrações de tiametoxam fornecido por meio de dieta contaminada.

Após a determinação do valor da CL₅₀, as doses subletais empregadas nos ensaios de intoxicação foram 1,43 ng tiametoxam/μl de dieta (tratamento agudo) e 0,48 ng tiametoxam/μl de dieta (tratamento crônico). Verificou-se que além de afetar a sobrevivência das larvas, o inseticida tiametoxam quando aplicado em baixas concentrações pode estar adiando o desenvolvimento larval quando comparado com o grupo controle (figura 5). Ao analisarmos esse dado associado à Figura 4, nota-se que nas concentrações 5, 0,5 e 0,05 ng i.a. /μl dieta, o desenvolvimento acelerou em relação ao grupo controle já que nessas três concentrações, havia mais larvas em fase de pré-pupa do que no grupo controle. Já nas concentrações mais elevadas, houve um atraso na entrada na fase de pré-pupa (especialmente nas concentrações de 50ng/μl e 100ng/μl), (figura 4) em relação aos grupos de concentrações menores e ao grupo controle. Além disso, nas larvas que apresentaram atraso em seu desenvolvimento, verificamos uma expressiva sobra de alimento no fundo da cúpula, o que indica que elas provavelmente cessam alimentação. Também é importante ressaltar que as larvas que apresentaram atraso em seu desenvolvimento, vieram a morrer nos dias subsequentes do bioensaio.

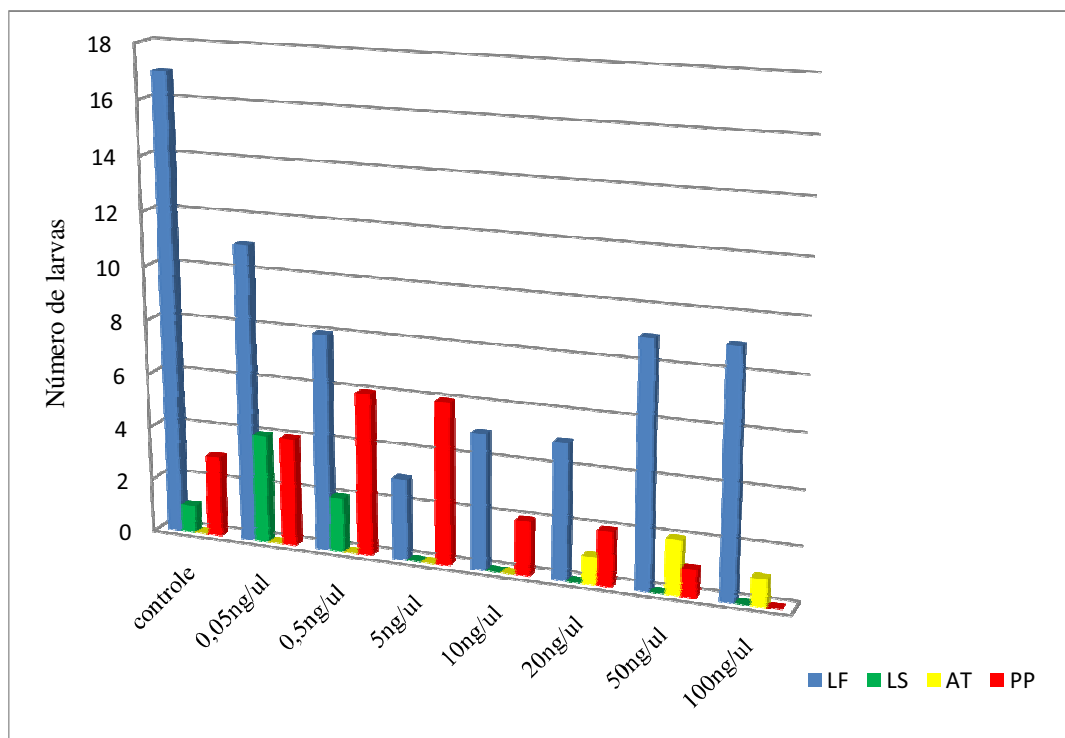


Figura 4. Diferentes subfases do 5º instar de larvas de *Apis mellifera* criadas *in vitro* e contaminadas com o tiametoxam (48 horas). LF: larvas em formato de C no fundo das cúpulas (5º instar inicial); LS: larvas entrando na posição vertical nas cúpulas (5º instar final); PP: Pré-pupa inicial, larvas na posição vertical; AT: Atraso de desenvolvimento, larvas com tamanho reduzido quando comparadas com o controle.

Além de nas concentrações de 0,5 e 0,05 ng/μl haver um aumento no número de pré-pupas, podemos visualizar através da figura 4 que houve também, um aumento de larvas que se encontravam na fase LS quando comparado com o grupo controle e com os grupos de concentrações mais elevadas. Nesta fase a larva está iniciando o posicionamento vertical interior da cúpula. Esse aumento de larvas em LS, inexistente a partir da concentração de 5 ng/μl. Esse dado é interessante, pois essas larvas em fase de LS viriam a se tornarem pré-pupas, o que confirma o aumento de pré-pupas nas baixas concentrações.

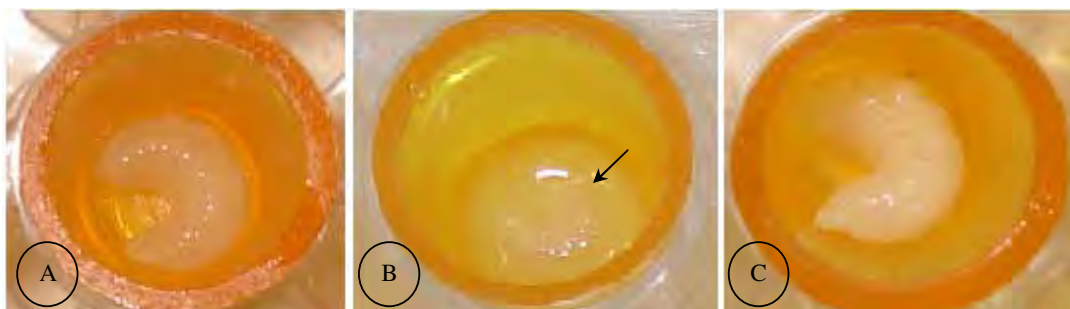


Figura 5. Larvas de *Apis mellifera* africanizada A controle, B tratamento agudo (100ng/ μ l) e C tratamento agudo (0,05ng/ μ l). Notar em A, larva em posição de C no fundo da cúpula 5^o instar final; em B, larva com tamanho reduzido (seta), com uma expressiva sobra de alimento no interior da cúpula; em C, larva em pré-pupa, na posição vertical na cúpula.

5.2 Análises morfológicas

5.2.1 Lobos ópticos

Através das análises morfológicas, é possível notar que durante as fases de 5^o instar e pré-pupa, os lobos ópticos já são evidentes, embora ainda estejam em fase de desenvolvimento e nem todas suas camadas estejam presentes. As camadas observadas tanto no 5^o instar quanto em pré-pupas foram a medula e o quiasma interno (Figuras 6, 7 e 8), que concentram prolongamentos de neurônios e a epiderme (Figuras 6A, 6B e 8E). Quando comparamos o grupo controle com aqueles tratados, nota-se que embora não existam alterações morfológicas nessas estruturas, verificam-se grandes áreas com núcleos apresentando morte celular, sendo esses picnóticos (Figuras 6C, 6D, 6E, 6F, 7C, 7D, 7E e 7F). No grupo controle, em todos os cortes analisados, não foi possível visualizar células evidenciando morte celular (Figuras 6A, 6B, 7A e 7B). Associando esses dados, aos dados do ensaio de toxicidade aguda para determinação da CL₅₀ (figura 4), verificamos que nos ensaios, as baixas dosagens tiveram uma aceleração no desenvolvimento larval, e nas análises morfológicas, células em processo de morte celular foram visualizadas em fases anteriores ao que naturalmente ocorreria em fases subsequentes ao desenvolvimento, sendo assim, podemos sugerir que os dados coincidem tanto para o desenvolvimento larval, como também nas análises morfológicas, já que ambos os processos estão sendo adiantados.

Em pré-pupas coletadas 72h após a intoxicação, tanto nos grupos tratados quanto no controle (Figuras 6, 7 e 8), verifica-se evidências de morte celular, entretanto, durante esta fase este mecanismo pode ocorrer devido as diversas alterações que precedem a metamorfose. Além disso, constata-se que essas mortes celulares se concentraram predominantemente na

região da medula dos lobos ópticos, tanto para os grupos tratados quanto o controle, e em ambas as fases de desenvolvimento (5º instar inicial, final e pré-pupas) de *A. mellifera* africanizada.

5.2.2 Corpos pedunculados

Os corpos pedunculados são bastante evidentes em larvas de 5º instar inicial (Figura 9), 5º instar final (Figura 10) e também em pré-pupas (Figura 11). Durante o 5º instar inicial já é possível notar divisões celulares nos neuroblastos (Figura 9C e 9D) em larvas submetidas à exposição crônica ao tiametoxam, além de uma grande quantidade de neuroblastos, também podemos observar o início da formação do pedúnculo figuras 9C e 9D e figuras 10A, 10D e 10E e também a presença de células de Kenyon envolto da região ocupada pelos neuroblastos (Figuras 10A, 10C e 10E) e (Figuras 11A e 11C). É possível verificar que tanto em larvas de 5º instar inicial, (Figura 9), 5º instar final (Figura 10) e também em pré-pupas (Figura 11), quando comparamos os grupos tratados com o grupo controle, notamos que não houve alteração na morfologia dos corpos pedunculados. Em larvas de 5º instar inicial (Figura 9) e 5º instar final (Figura 10), não há evidências de morte celular nessa região do cérebro, no entanto, em pré-pupas submetidas à exposição aguda, (Figuras 11E e 11F) notamos a presença de núcleos bem corados, o que pode sugerir um estágio final de morte celular. Esses dados sugerem que o tiametoxam além de estar acelerando o processo de morte celular nos lobos ópticos, pode também estar atuando de modo que o processo de morte celular que aconteceria posteriormente ocorra antes nos corpos pedunculados, quando as larvas foram expostas ao tratamento agudo. No tratamento crônico (Figuras 11C e 11D) e no grupo controle (Figuras 11A e 11B), não há presença de núcleos indicativos de morte

5.2.3 Lobos Antenais

No 5º instar inicial, não foi possível a identificação dos lobos antenais através das análises microscópicas dos cortes histológicos, sendo que, o início da formação dessas estruturas foram evidenciadas a partir do 5º instar final e em fase de pré-pupa. Vemos que no 5º instar final e em pré-pupas esta estrutura é bem evidente, onde é possível notar a presença de uma região de neurópila central, que ocupa grande área desta estrutura e que concentra os prolongamentos de células nervosas. Ao redor dessas regiões de prolongamentos existe a presença de células bem coradas, denominadas células neurogliais. Estas células aparentemente estão delimitando toda a região da neurópila dos lobos antenais (Figuras 12 e

13). Não foi possível a identificação do início da formação dos glomérulos, que provavelmente iniciaria durante o desenvolvimento da pupa. Em larvas de 5º instar final, (Figura 12) e em pré-pupas (Figura 13), não foi possível observar alterações na morfologia quando comparamos os grupos tratados com o controle, além disso, nenhum indício de morte celular foi encontrado em ambos os tratamentos.

5.3 Análises imunocitoquímicas: HSP90 e morte celular

5.3.1 HSP90

Através da análise dos cortes do cérebro de larvas de abelhas *A. mellifera* (5º instar inicial, 5º instar final e pré-pupas), verificamos que este órgão foi evidente apenas na fase de pupa, uma vez que para a realização tanto da marcação da HSP90, quanto do teste de morte celular, poucas lâminas podem ser submetidas aos testes, devido ao alto custo dos marcadores. Sendo assim, nos cortes submetidos a ambos os testes, apenas as pré-pupas evidenciaram de maneira clara as regiões a serem analisadas. Nas pré-pupas de abelhas *A. mellifera*, expostas a doses subletais do inseticida tiametoxam, verificamos que não houve diferença quando comparamos os grupos tratados (tratamento agudo e crônico) com o grupo controle nas regiões analisadas (lobos ópticos e lobos antenais). As células apresentaram uma marcação mais intensa nas regiões citoplasmáticas (figura 14, B e C). O resumo do resultado da marcação da HSP90 pode ser observado na tabela 4.

Analisando a tabela, notamos que, não há diferenças entre os grupos tratados e o controle nas regiões dos lobos ópticos e lobos antenais. Embora não existam diferenças, através das análises, pudemos observar que, nos lobos ópticos, há uma região entre o quiasma e a medula, onde a marcação foi mais intensa que as demais regiões (figura 14, B). Observamos também a presença de células com uma intensidade de marcação maior em volta dos prolongamentos celulares dos lobos antenais, células estas denominadas de células neurogliais (figura 14, D). Essas marcações mais intensas foram observadas tanto nos grupos tratados como no grupo controle, não podendo atribuir esta característica ao tratamento com o inseticida.

Tabela 4 – Resultados da marcação das proteínas de choque térmico HSP90 nos lobos ópticos e lobos antenais de pré-pupas de operárias de *Apis mellifera*.

	Inseticida	Tempo de exposição	Marcação	Localização da Marcação
Controle	Tiametoxam	72h	Hsp 90	Citoplasma dos lobos ópticos e lobos antenais
Tratamento Agudo	Tiametoxam	72h	Hsp 90	Citoplasma dos lobos ópticos e lobos antenais
Tratamento Crônico	Tiametoxam	72h	Hsp 90	Citoplasma dos lobos ópticos e lobos antenais

5.3.2 Morte Celular (Reação de TUNEL)

Os resultados do teste imunocitoquímico de morte celular (Reação de TUNEL), foram importantes para confirmar os resultados obtidos através das análises morfológicas realizadas.

Pudemos verificar através da análise das secções histológicas do cérebro de pré-pupas de abelhas *A. mellifera*, que, quando comparamos o grupo controle (figura 15, A e C) com o tratamento agudo (figura 15, D e E) e com o tratamento crônico (figura 15, F e G), houve uma marcação mais intensa na região do cérebro de pré-pupas, em ambos os tratamentos, quando comparados com o grupo controle. Os lobos ópticos das pré-pupas do tratamento agudo submetidas ao teste foram as estruturas mais evidentes e de fácil identificação. Através da análise, podemos sugerir que, nos lobos ópticos de larvas do tratamento agudo (figura 16, C e E) e do tratamento crônico (figura 16, D) quando comparados com o grupo controle, a marcação foi positiva para morte celular. Esse dado confirma o que anteriormente havia sido analisado nos cortes histológicos de pré-pupas. Ao compararmos o grupo controle, com o tratamento agudo e crônico, (figura 16) verificamos que aparentemente embora haja núcleos marcados no grupo controle, a intensidade da marcação foi mais acentuada nos grupos tratados. Sendo assim, pode-se sugerir que, o tiametoxam está agindo de modo que exista um aumento no processo de mortes celulares que em condições naturais em pré-pupas aconteceria de maneira menos acentuada.

Os testes de marcação da proteína de choque térmico HSP90 e o teste de morte celular foram importantes ferramentas que associadas à histologia puderam trazer um maior entendimento da ação do inseticida no cérebro de larvas de abelhas africanizadas *A. mellifera*.

Figura 6. Fotomicrografias dos lobos ópticos em larvas de 5º instar inicial de *Apis mellifera* africanizada após 24h de exposição ao inseticida tiametoxam. A e B grupo controle, C e D tratamento crônico e E e F tratamento agudo. É possível notar em A e B a presença das regiões de prolongamentos celulares provenientes das células nervosas, o quiasma interno (qi), e também a região denominada medula (me). Além disso, também é possível observar uma camada externa espessa, a epiderme (e). Em C e D, notar presença de núcleos fragmentados (setas) na região da medula (me). Em E e F, também presença de regiões na medula (me) com a presença de núcleos compactados (setas).

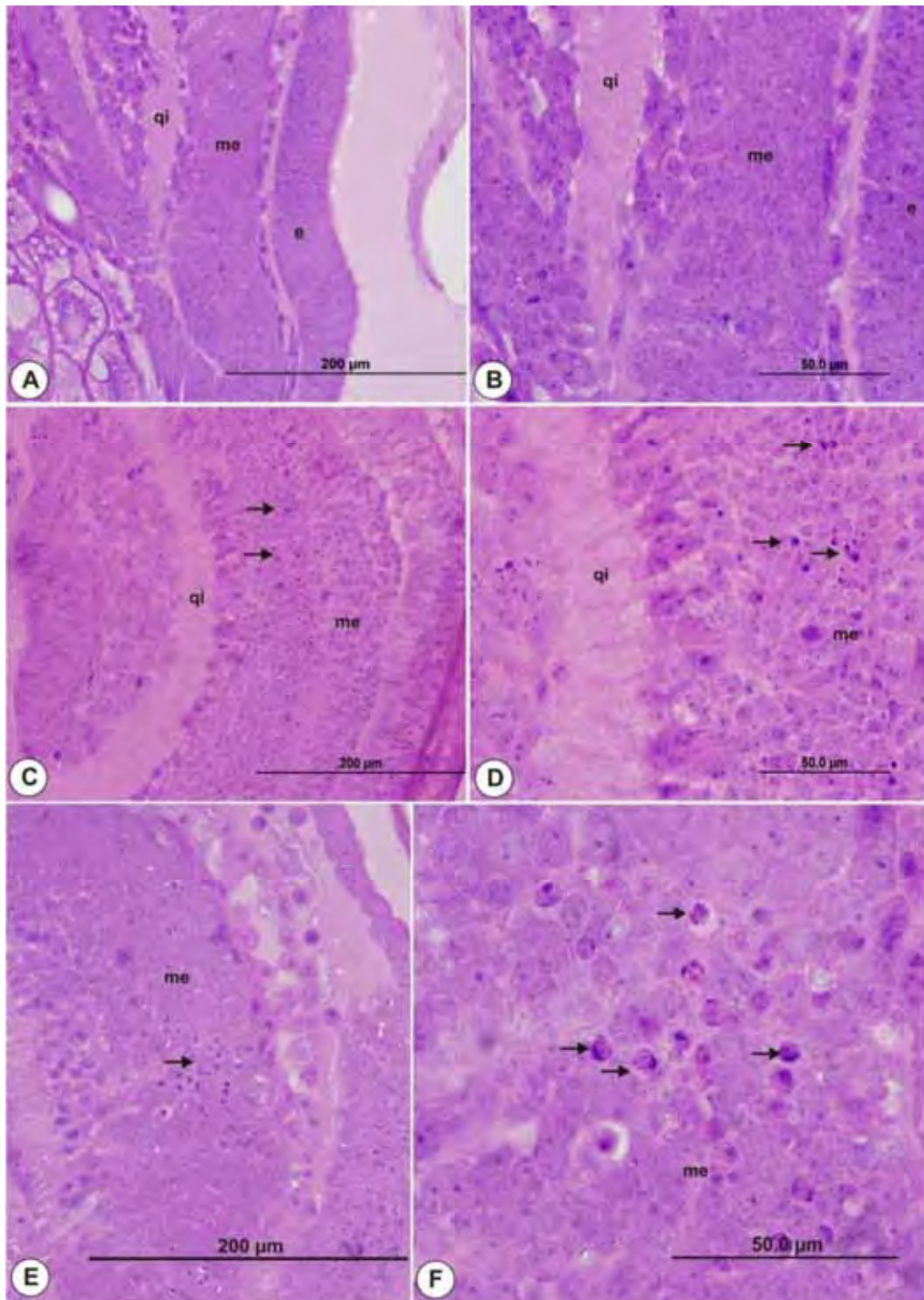


Figura 7. Fotomicrografias dos lobos ópticos em larvas de 5º instar final de *Apis mellifera* africanizada após 48h de exposição ao inseticida tiametoxam. A e B grupo controle, C e D tratamento crônico e E e F tratamento agudo. Notar em A e B a presença da região que concentra os prolongamentos das células nervosas, o quiasma interno (qi) e também a região da medula (me). Em C e D, notar presença de núcleos indicativos de morte celular (setas) predominantemente na região da medula (me). Em E e F, também presença de regiões na medula (me) com a presença de núcleos compactados (setas).

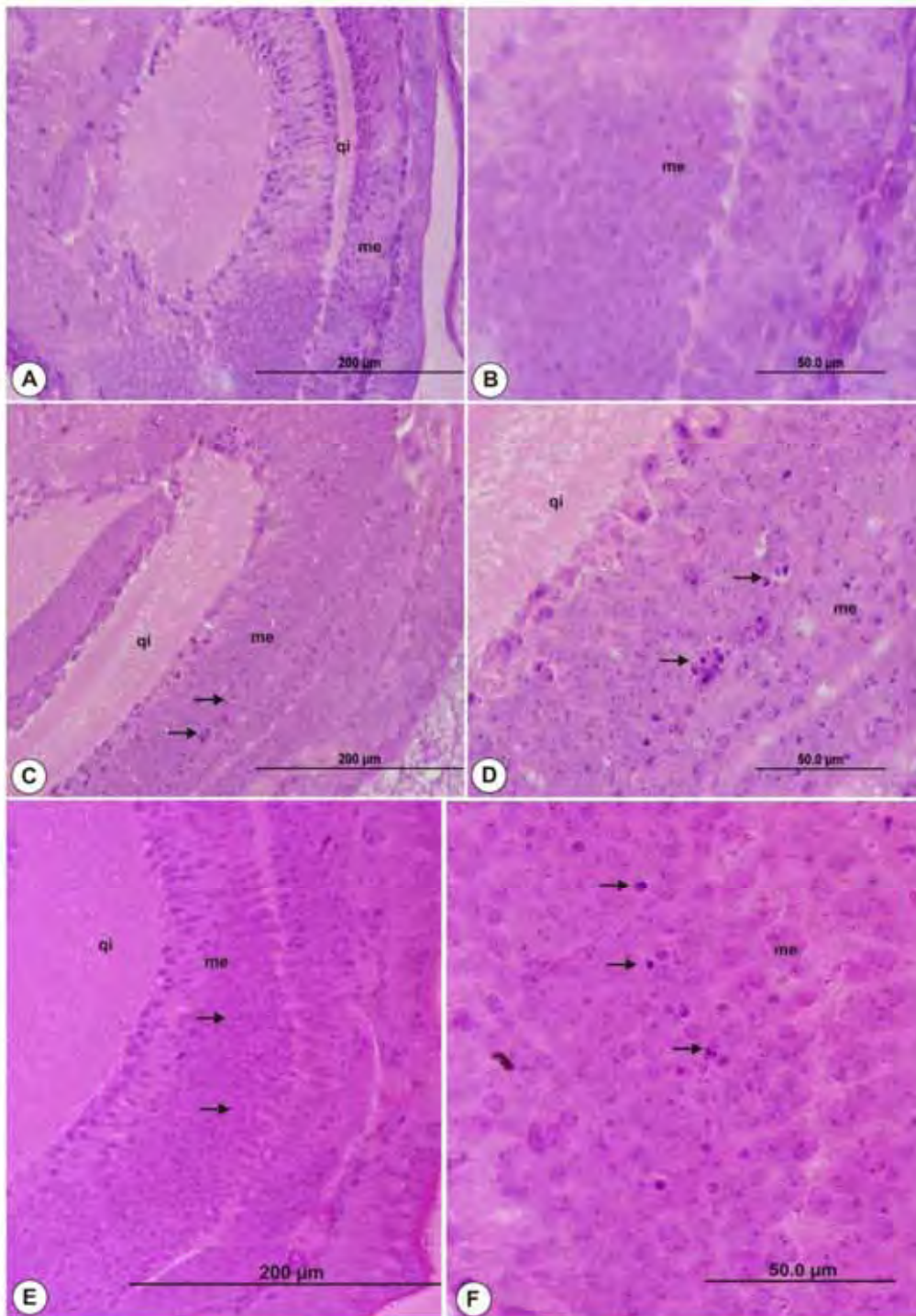


Figura 8: Fotomicrografias dos lobos ópticos em pré-pupas de *Apis mellifera* africanizada após 72h de exposição ao inseticida tiametoxam. A e B grupo controle, C e D tratamento crônico e E e F tratamento agudo. Observar em A e B a presença de células indicativas de morte celular (setas) concentradas na região da medula (me). Em C e D, notar presença de núcleos indicativos de morte celular (setas) também na região da medula (me). Em E e F, também presença de regiões na medula (me) com a presença de núcleos compactados (setas).

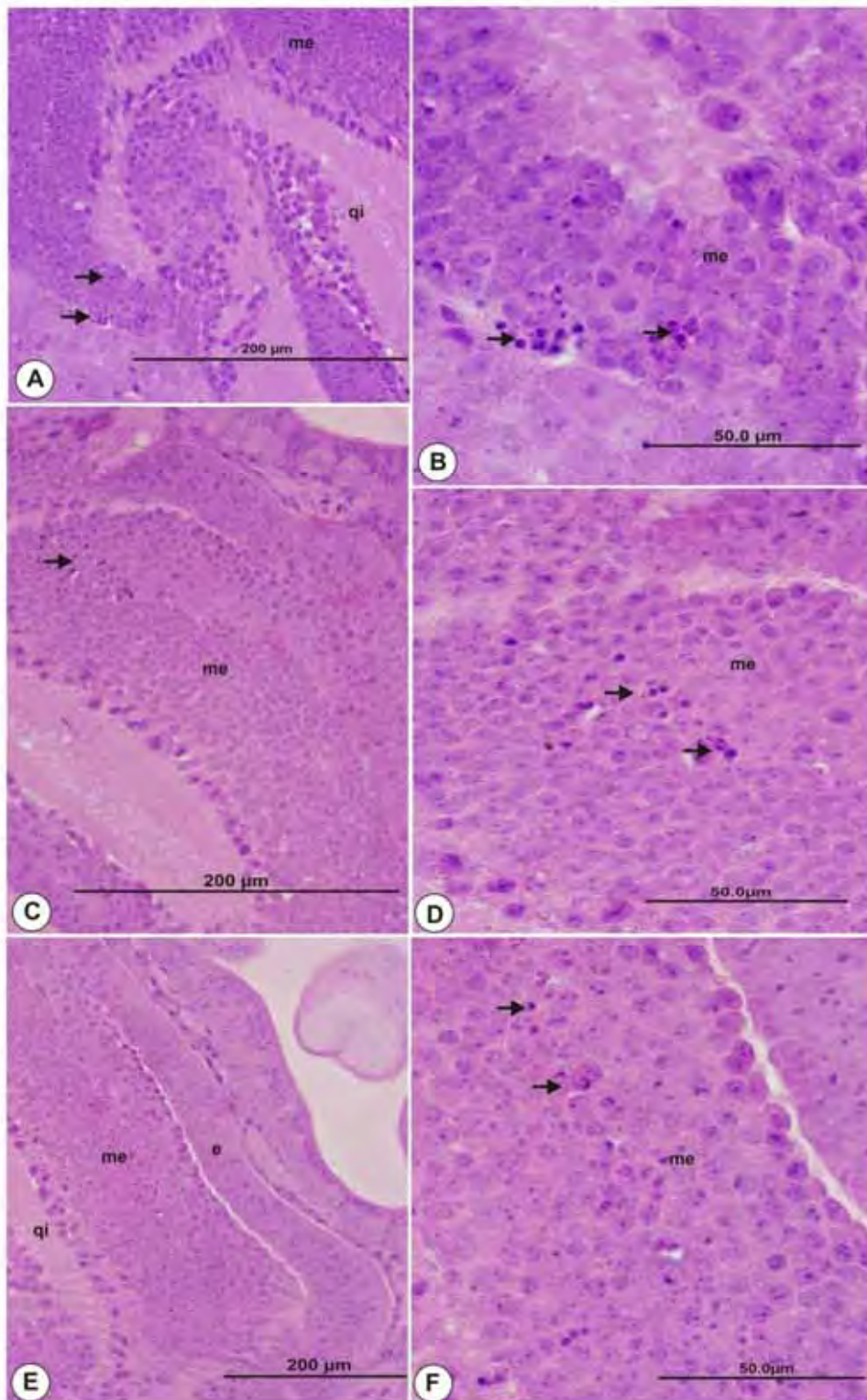


Figura 9: Fotomicrografias dos precursores dos corpos pedunculados em larvas de 5º instar inicial de *Apis mellifera*. A e B controle, C e D tratamento crônico e E e F tratamento agudo. Observar as regiões com grande quantidade de neuroblastos (N), e também neuroblastos em divisão em C e D (setas). É possível observar também o início da formação do pedúnculo (P) em C e D.

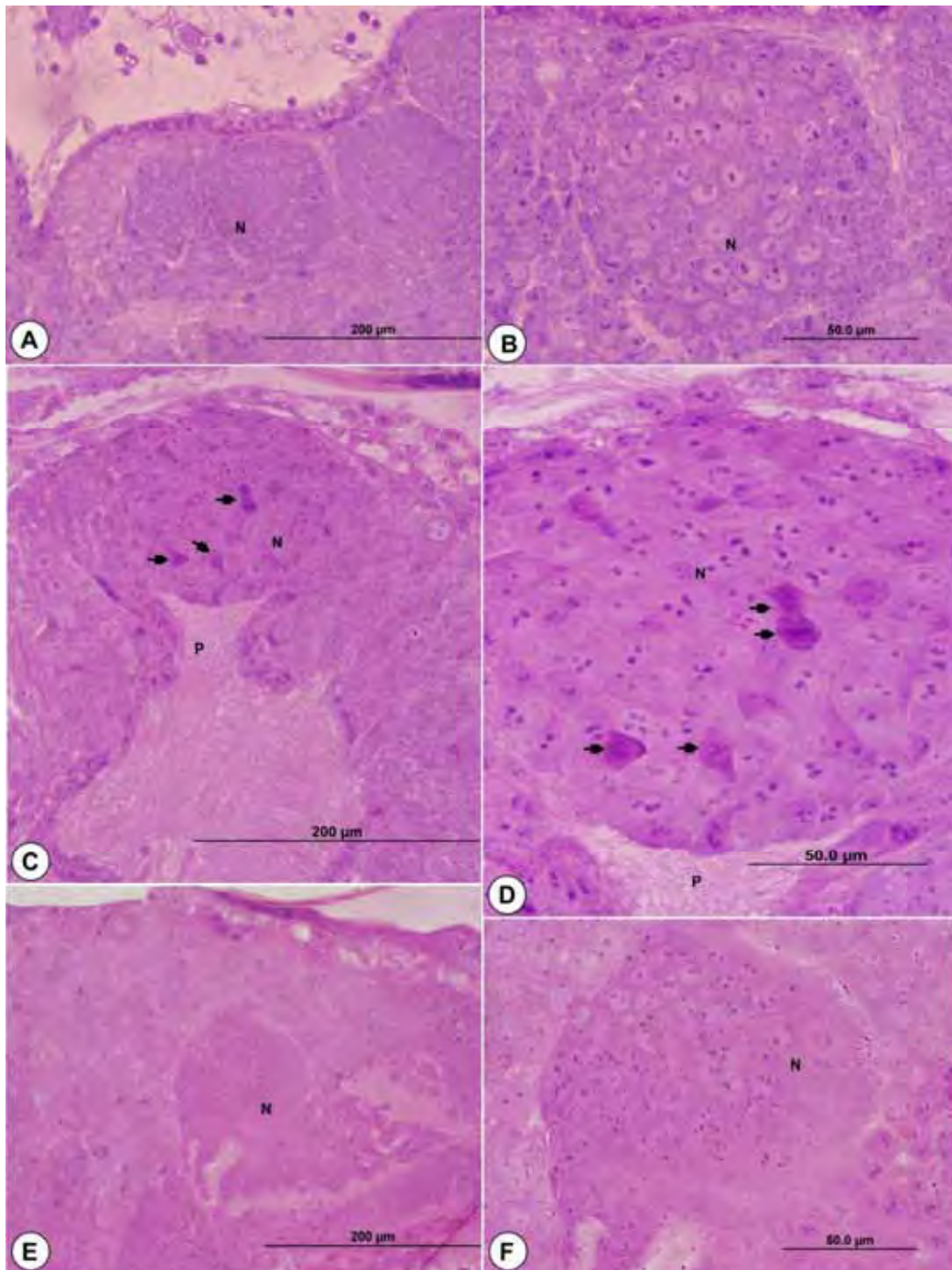


Figura 10: Fotomicrografias dos precursores dos corpos pedunculados em larvas de 5º instar final de *Apis mellifera*. A e B controle, C e D tratamento crônico e E e F tratamento agudo. Observar a presença de grande quantidade de neuroblastos (N), e também é possível observar o pedúnculo (P) em A, B, C, D e E. Em todos os grupos há a presença de grande quantidade de Células de Kenyon, (Ck), localizando-se principalmente nas laterais da região ocupada pelos neuroblastos.

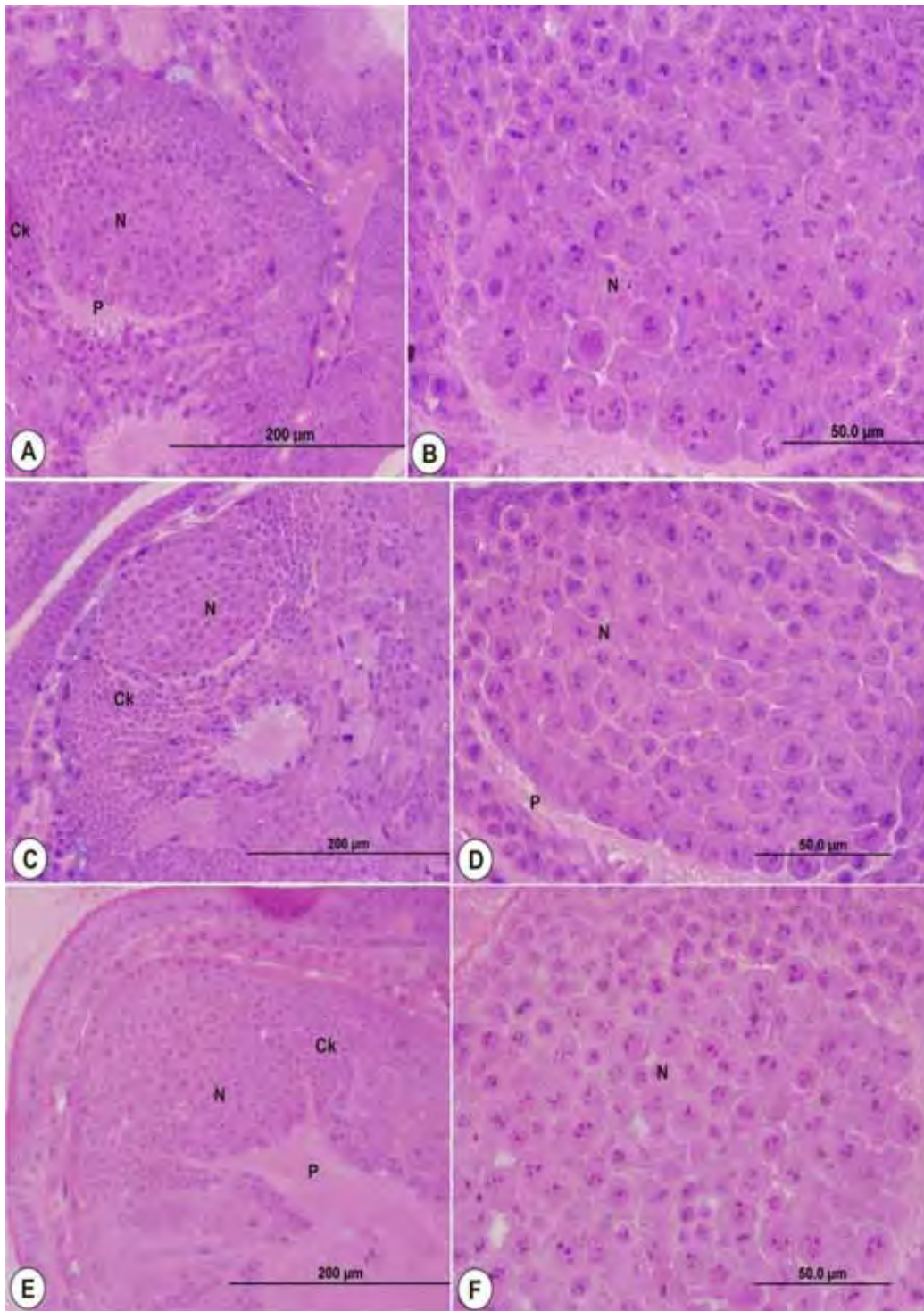


Figura 11: Fotomicrografias dos precursores dos corpos pedunculados em larvas de pré-pupas de *Apis mellifera*. A e B controle, C e D tratamento crônico e E e F tratamento agudo. Há grande quantidade de neuroblastos (N) e também a presença do pedunculo (P). Em E e F, notar a presença de núcleos indicativos de morte celular (setas), podendo os mesmos estarem apresentando fragmentação nuclear. Além disso, há também uma grande quantidade de células de Kenyon, (Ck) especialmente nas laterais da região ocupada pelos neuroblastos.

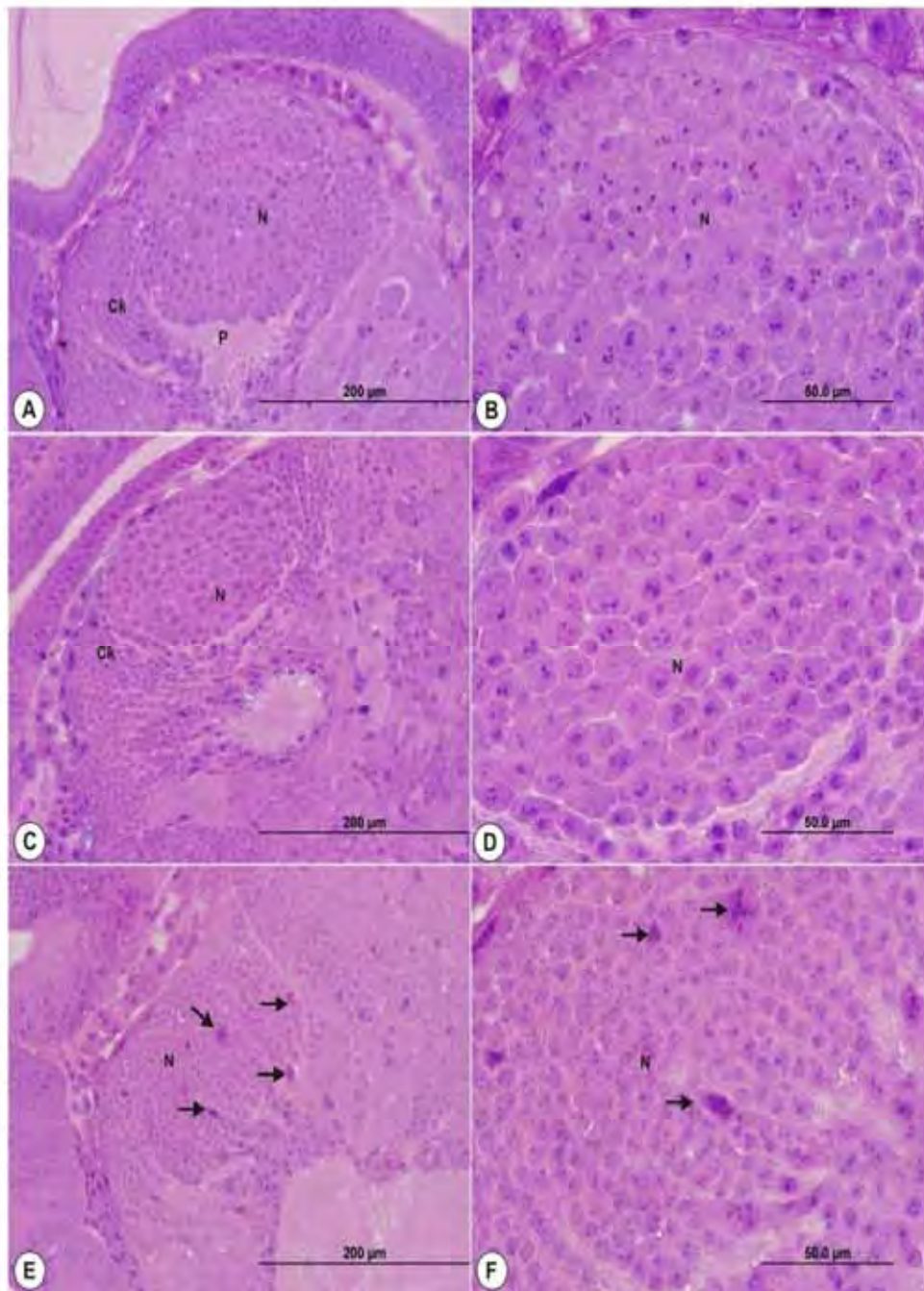


Figura 12: Fotomicrografias dos precursores dos lobos antenais em larvas de 5o instar final de *Apis mellifera*. A e B controle, C e D tratamento crônico e E e F tratamento agudo. Notar a formação da massa central de neurópila (np), que ocupa a maior parte desta região do cérebro, e apresenta-se rodeada por células neurogliais (cn) que aparentemente delimitam esta região. É possível notar também a presença de neurônios periféricos (ne).

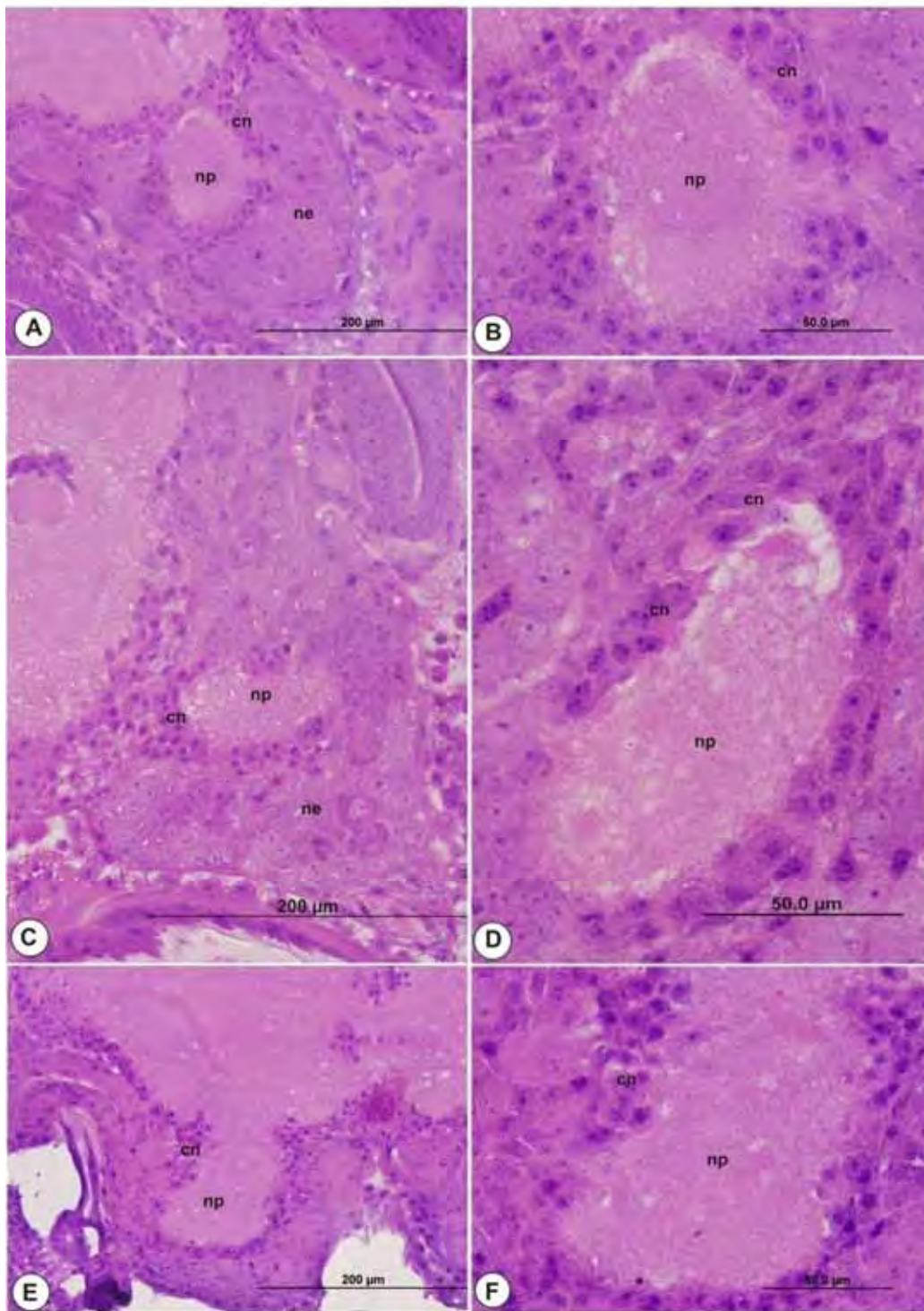


Figura 13: Fotomicrografias dos precursores dos lobos antenais em pré-pupas de *Apis mellifera*. A e B controle, C e D tratamento crônico e E e F tratamento agudo. Notar a formação da massa central de neurópila (np) rodeada por células neurogliais (cn) delimitando esta região e também a presença de neurônios periféricos (ne). Como é possível notar, não há ainda a formação dos glomérulos nesta estrutura.

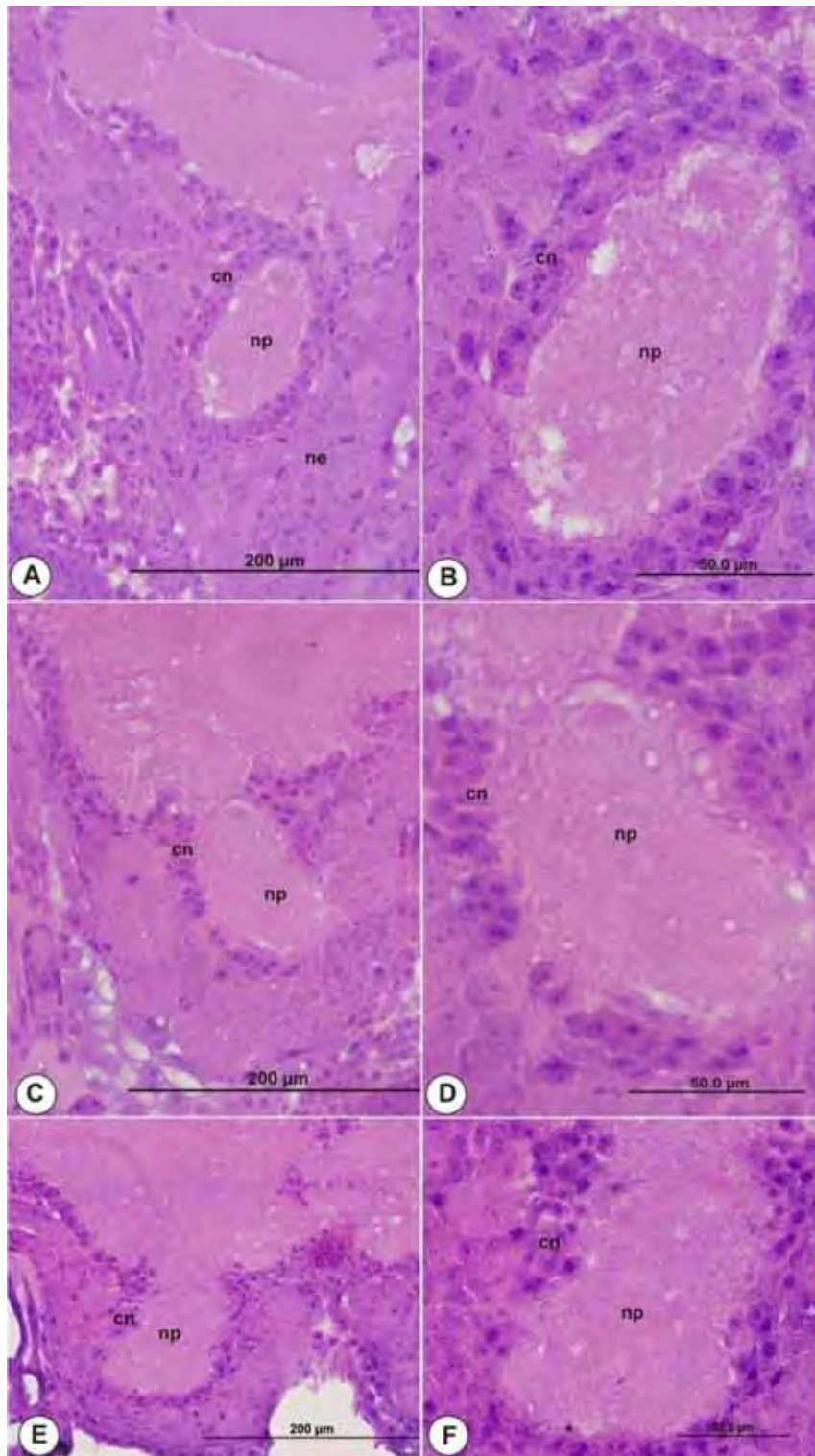


Figura 14: Fotomicrografias dos precursores dos lobos ópticos e lobos antenais de pré-pupas de *Apis mellifera* submetidas à exposição ao inseticida tiametoxam e ao teste imunocitoquímico de marcação da proteína de choque térmico HSP90. A, B e D, grupo controle; C e F, tratamento agudo e E tratamento crônico (controle negativo da reação). Em A, visão geral do cérebro, (RCP) região dos corpos pedunculados, (LO) lobos ópticos, (P) prolongamentos celulares, (LA) lobos antenais; Em B e C, lobos ópticos, evidenciando marcação da HSP90 na região citoplasmática das células (asterisco); e em B, na região da medula (setas). Em D e F, lobos antenais, evidenciando a marcação da HSP90 (setas) ao redor da neurópila (N), além disso notamos também células neurogliais (cn) e neurópila central (np). Em E, lobos antenais (controle negativo da reação), com as regiões do cérebro, lobos ópticos (LO), lobos antenais (LA), e prolongamentos centrais (PR).

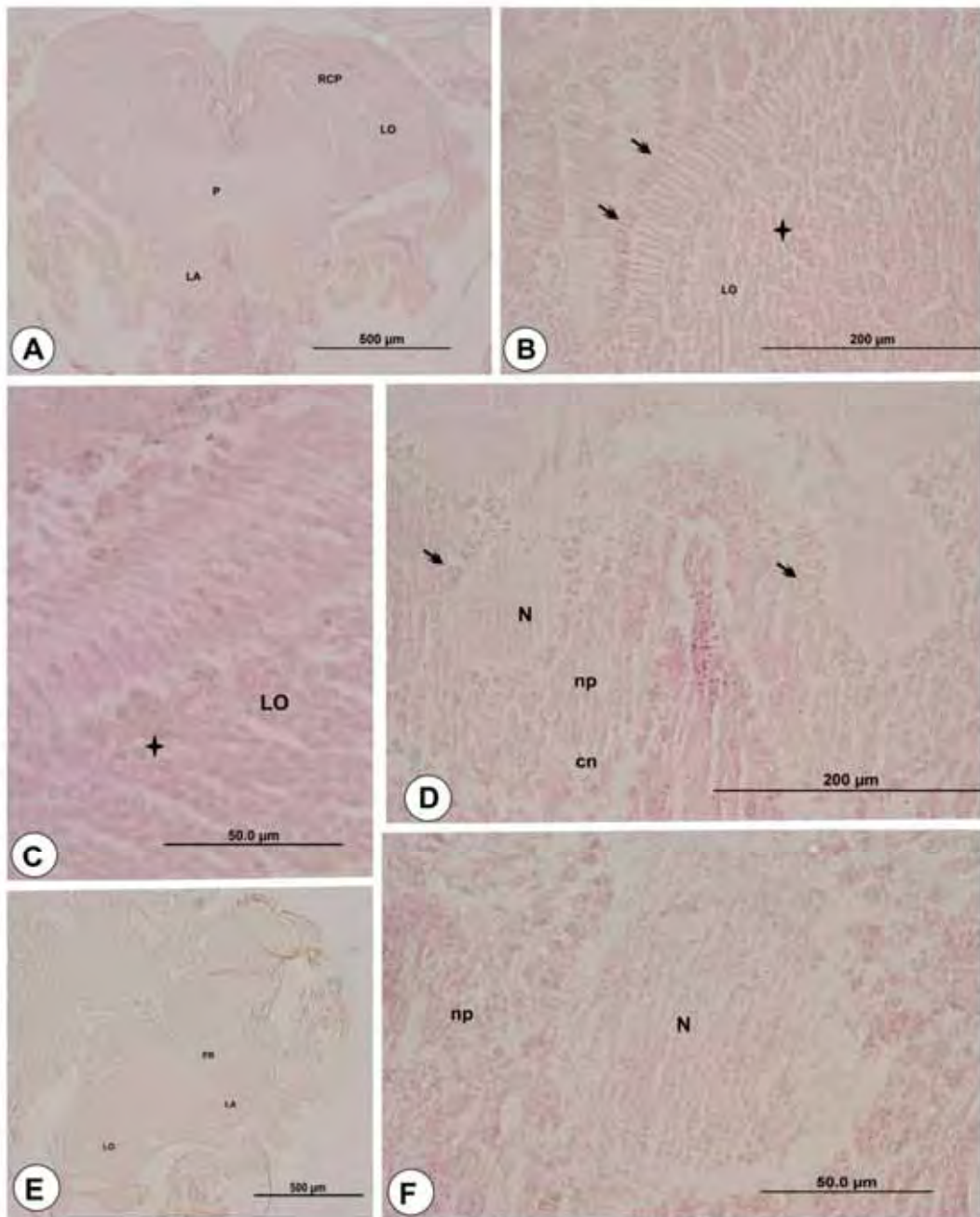


Figura 15: Fotomicrografias do cérebro de pré-pupas de *Apis mellifera*, submetidas ao tratamento com o inseticida tiametoxam e posteriormente ao teste imunocitoquímico de morte celular (TUNEL). A e C, grupo controle; D e E, tratamento Agudo; e B, F e G tratamento crônico. Em A notamos a presença das regiões cerebrais dos corpos pedunculados (Rcp), lobos ópticos (Rlo), lobos antenais (Rla) e prolongamentos centrais (P), além das regiões cerebrais, é possível notar a suave marcação para morte celular. As mesmas regiões cerebrais de A podem ser visualizadas em B (histologia). Em C, outro corte evidenciando a visão geral do cérebro do grupo controle. Em D e E, visão geral do cérebro de pré-pupas do tratamento agudo, onde pode-se observar a marcação para morte celular mais intensa quando compara com o grupo controle (A e C). Em F e G, cérebros de pré-pupas do tratamento crônico, onde é possível notar uma marcação mais acentuada que no grupo controle (A e C).

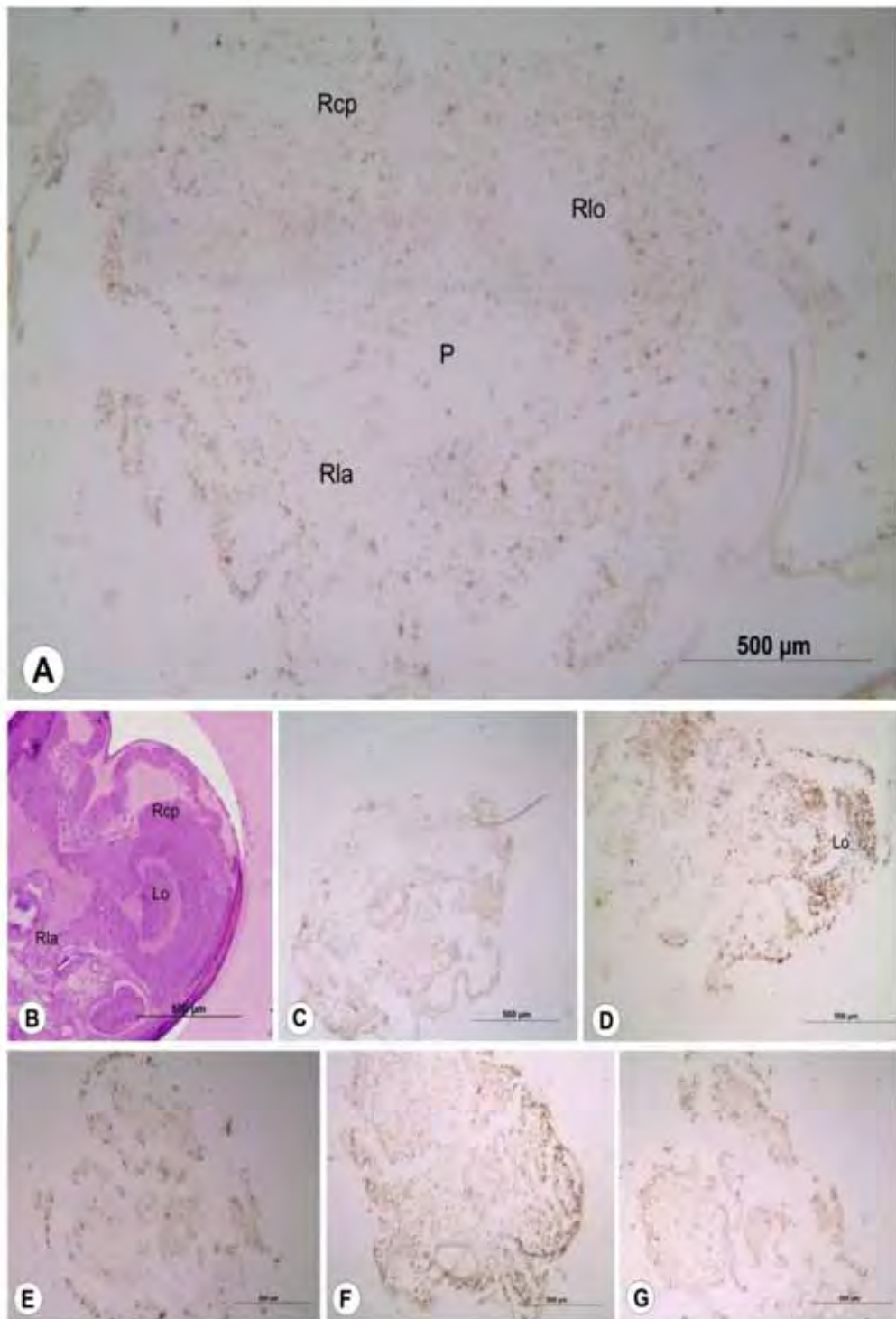
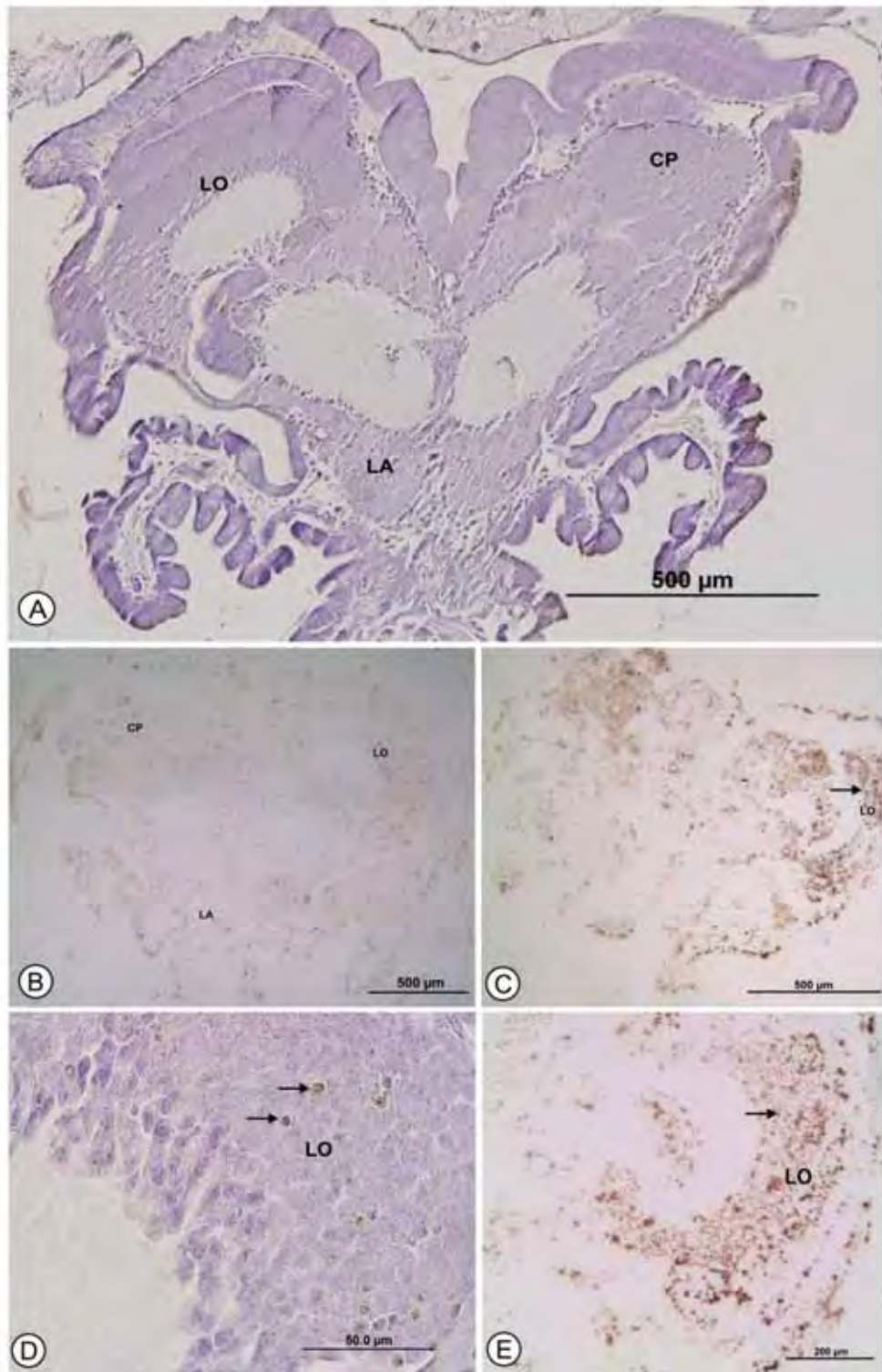


Figura 16: Lobos ópticos de pré-pupas de *Apis mellifera* submetidas ao tratamento com o inseticida tiametoxam e posteriormente ao teste imunocitoquímico de morte celular (TUNEL). A e B controle; C e E tratamento agudo; e D tratamento crônico. Em A notamos a visão geral do cérebro contra corado com hematoxilina de Mayer, com as estruturas cerebrais lobos ópticos (LO), lobos antenais (LA) e corpos pedunculados (CP). Notamos as mesmas estruturas em B, sem a contra coloração. Em C, e E, notamos nos lobos ópticos (LO) núcleos bem corados pela marcação do TUNEL (setas). Em D, no tratamento crônico, vemos células acastanhadas evidenciando a marcação para morte celular (setas).



6. DISCUSSÃO

O presente estudo verificou que a CL_{50} para larvas de abelhas africanizadas *Apis mellifera* é de 14,35 ng/ μ l de dieta. Até o presente momento, não há dados na literatura acerca da CL_{50} para larvas de abelhas africanizadas *A. mellifera* tratadas com o inseticida tiametoxam, sendo que, testes de toxicidade aguda para determinar os valores da DL/CL_{50} são com frequência realizados em adultos (IWASA, et al. 2004; SUCHAIL, 2000). Iwasa, et al., (2004), verificou que, em abelhas adultas tratadas com o tiametoxam a DL_{50} foi na ordem de 30ng/abelha. Estudos similares foram realizados por Carvalho, (2010), e revelaram que, a DL_{50} para *A. mellifera* submetidas à exposição do tiametoxam foi de 51,16ng/abelha.

Embora menos frequentes, alguns estudos foram realizados com o objetivo de avaliar efeitos de diversos tipos de xenobióticos sobre larvas de abelhas *A. mellifera*. Aupinel et al. (2007) avaliaram a toxicidade do dimetoato sobre larvas de abelhas *A. mellifera*, e verificaram que a DL_{50} do dimetoato foi de 1,93 μ g/larva. Além disso, observaram também uma mortalidade significativa nos indivíduos tratados, durante a fase pupal. Estudos de Peng et al. (1991) revelam que, larvas de abelhas tratadas com o antibiótico clortetraciclina apresentaram peso e crescimento diminuídos, quando comparadas com o grupo controle.

Embora os testes de toxicidade aguda tenham sido realizado com mais frequência, Desneux et al.(2007), ressaltam que, além da realização dos testes de toxicidade aguda, é necessário testar os efeitos dos pesticidas, levando consideração os efeitos subletais, que irão complementar e melhor avaliar a ação desses produtos em insetos não alvos. Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos neste sentido, mas avaliando somente efeitos comportamentais. El Hassani et al. (2008) verificaram o comportamento de abelhas intoxicadas com o tiametoxam e acetamipride em doses subletais, sendo que, somente o acetamiprid afetou as abelhas, deixando-as mais vulneráveis. Decourtye et al. (2005) avaliaram a toxicidade subletal de nove pesticidas de diferentes classes sobre abelhas e verificaram que, mesmo em dosagens subletais, 4 pesticidas (fipronil, deltametrina, endosulfan e procloraz) afetaram o aprendizado das abelhas submetidas ao teste de extensão de probóscide.

Como observado nos resultados deste trabalho, quando larvas de abelhas africanizadas *A. mellifera* foram expostas ao tiametoxam de forma aguda, verificou-se que, em baixas concentrações não obtivemos uma resposta linear, ou seja, crescente em função do aumento da concentração. Comportamento similar foram reportados por Suchail, et al. (2000) estudando o efeito de doses subletais do imidacloprido, verificando que, em baixas concentrações os efeitos do imidacloprido não foram lineares, ou seja, a mortalidade e os

efeitos subletais podem não ser simples função da dose, apresentando resultados bifásicos. Segundo Calabrese (2008), Hugo Schuls foi o primeiro pesquisador a publicar relatos sobre o efeito de diversos agentes tóxicos sobre leveduras, onde ocorre a liberação de dióxido de carbono em baixas concentrações e a inibição em altas concentrações, sendo esse fenômeno denominado de hormesis, que é uma resposta adaptativa caracterizada por efeito bifásico, onde geralmente as características quantitativas, a amplitude, e o alcance das respostas estimulatórias são todas diretamente induzidas como um resultado do processo de compensação biológica, seguido de uma interrupção pela homeostase. Para a confirmação desses resultados, novos testes devem ser realizados, já que segundo Calabrese (2008) a hormesis é de difícil detecção e caracterização (CALABRESE e BALDWIN, 1997).

Também verificamos no presente estudo, que durante os bioensaios de toxicidade aguda, nas baixas concentrações, as larvas estavam mais adiantadas em relação ao desenvolvimento quando comparadas com o grupo controle. Em um recente estudo realizado por Wu et al. (2011), os autores detectaram resíduos de diversos tipos de inseticidas presentes em várias colméias analisadas, dentre eles o tiametoxam. Após a detecção dos resíduos, esses autores estudaram os efeitos dos mesmos sobre o desenvolvimento de larvas de abelhas *Apis mellifera*, onde puderam observar que houve um atraso no desenvolvimento larval, quando comparou-se as colméias não tratadas com as colméias que tinham resíduos de inseticidas em seu interior. Como podemos observar, no trabalho realizado por Wu et al. (2011) ocorreu um atraso no desenvolvimento larval, enquanto que no presente estudo, nas baixas concentrações houve um adiantamento. Levando em consideração a presença de vários inseticidas, não podemos deixar de levar em conta que este atraso no desenvolvimento observado pelos autores, pode ser um efeito da ação múltipla de todos esses compostos, que isoladamente, podem apresentar outros efeitos.

Novas investigações são necessárias, para esclarecer o real motivo desse adiantamento no desenvolvimento larval. Além disso, também é necessário, estudar quais seriam e se existem conseqüências nesta alteração durante a fase de desenvolvimento, ou quando as larvas virem a tornarem-se abelhas adultas.

Peng et al. (1991) ao estudarem o efeito da clortetraciclina sobre o desenvolvimento larval de *A. mellifera*, testaram esta substância em diversas concentrações, e curiosamente, foi observado que, na dose de 0,05µg/mg de dieta, houve uma aceleração no desenvolvimento, onde puderam constatar pequenas pigmentações distribuídas no corpo das larvas. Acima desta dose, o antibiótico testado diminuiu o peso e o crescimento das mesmas.

Uma possível causa desses diferentes padrões de desenvolvimento nas larvas de abelhas *A. mellifera* quando expostas à xenobióticos, pode ser a ativação ou inibição do sistema enzimático. Nielsen et al. (2000) ao estudarem a atividade da enzima de detoxificação glutationa S-transferase em larvas, pupas e adultos de *A. mellifera*, tratadas com flumetrina, verificaram que, houve um aumento no nível de atividade enzimática quando os indivíduos foram expostos a esta substância, e que este aumento em particular, foi mais intenso durante o último instar larval e durante o período pupal. Ruvolo-Takasusuki et al. (2009) ao investigarem a atividade de esterases após a aplicação do inseticida tiametoxam em larvas de abelhas *A. mellifera*, verificaram que, após a aplicação, houve uma inibição parcial dessas enzimas, embora neste estudo, as doses utilizadas para a intoxicação das abelhas, não foram subletais, sendo necessário avaliar o padrão enzimático em dosagens subletais. Os autores sugerem que, as larvas podem ser futuramente utilizadas para detectar a presença de resíduos. Já em estudos realizados por Carvalho, (2010) ao investigar o padrão de atividade enzimática após a aplicação de doses subletais de tiametoxam em abelhas *A. mellifera*, foi possível verificar que, enzimas de detoxificação como Carboxylesterases e glutationa S-transferase foram estimuladas quando as abelhas foram expostas a doses subletais do pesticida. Comparando os dados da literatura, podemos verificar que, a ativação ou inibição do sistema enzimático é dependente da dose do inseticida aplicado.

Há indícios de que as enzimas Carboxylesterases além de atuarem como enzimas de detoxificação, estejam envolvidas na hidrólise do hormônio juvenil. Neste caso, se houver a ativação dessas enzimas, e conseqüente atuação na hidrólise do hormônio juvenil, o ciclo de desenvolvimento da larva poderá ser alterado, já que o início da metamorfose se dá quando há altos níveis dos hormônios ecdisteróides sob baixos títulos de hormônio juvenil (CRUZ-LANDIM, 2009; TRUMAN, 2009). Sendo assim, fica clara a importância de investigar o padrão do sistema enzimático, quando as larvas de abelhas são submetidas aos inseticidas, em particular o tiametoxam. É necessário investigar se, quando os padrões de atividades enzimáticas são alterados, teremos outro tipo de resposta, que poderá influenciar na mortalidade ou até mesmo no desenvolvimento das larvas, bem como das abelhas.

Além dos resultados dos testes de toxicidade aguda, e da determinação da CL₅₀ para larvas de abelhas africanizadas *A. mellifera*, foi realizado também, a análise morfológica do cérebro de larvas de 5º instar inicial, 5º instar final, bem como de pré-pupas. Os resultados revelaram que, a administração do tiametoxam a larvas de 5º instar inicial e final de *A. mellifera*, induz a presença de núcleos picnóticos e morte celular na região da medula dos

lobos ópticos, independente do modo de exposição e concentração. Os lobos ópticos localizam-se no protocérebro e apresentam-se como uma estrutura com aspecto de camadas, devido os arranjos de suas células e prolongamentos celulares. Essa região é de grande importância para o inseto, já que está diretamente relacionada com o processamento da visão (RIBI et al., 2008). O sistema visual de um inseto adulto consiste em retina (o olho propriamente dito), contendo células fotorreceptoras, e os lóbulos ópticos que compreendem três gânglios: a lâmina, a medula e a lóbula. A retina forma um arranjo de células ordenada de omatídeos (READY et al., 1976) e cada unidade retinal (com oito a nove células fotossensoriais), dentro do omatídeo projeta feixes axonais em direção aos lóbulos ópticos formando sinapses na lâmina e, eventualmente, na medula. Neurônios da lâmina por sua vez projetam os axônios para dentro da medula e esta projeta para a lóbula (HORRIDGE, 1965). Assim, mortes celulares nos lobos ópticos podem causar diminuição de neurônios e, conseqüentemente diminuição do número de sinapses entre esta estrutura e os olhos compostos. Todas as evidências de mortes celulares encontradas nos lobos ópticos das larvas de 5º instar inicial, final e pré-pupas, se concentraram de uma maneira bem evidente na região da medula, a qual recebe uma grande quantidade de axônios provenientes das células reticulares do olho, juntamente com outros componentes (Chapman, 1998). Investigações mais profundas acerca da toxicidade do inseticida tiametoxam nos lobos ópticos são necessárias, com o objetivo de verificar se esse possível adiantamento do processo de morte celular nesta região poderá ou não afetar futuramente a acuidade visual das abelhas operárias adultas.

Portanto, o tiametoxam administrado em doses subletais provoca alterações estruturais nos lobos ópticos que podem levar ao surgimento de problemas na acuidade visual dos indivíduos, prejudicando diversas atividades desenvolvidas pelas operárias, como a aquela de forrageamento. Roat e Cruz-Landim, (2010) ao pesquisarem a diferenciação do cérebro de larvas de *A. mellifera*, constataram que, em larvas de 5º instar de operárias não foi possível identificar morte celular nos lobos ópticos através das técnicas utilizadas, embora este evento tenha sido observado em larvas de 5º instar de rainhas. Esses resultados confirmam que há grande evidências que o tiametoxam adiante o processo que em condições naturais aconteceria somente na fase de pré-pupa e pupa de olhos pretos.

Se associarmos esse adiantamento no processo de morte celular que está ocorrendo nos lobos ópticos com os dados da figura 4, podemos sugerir que, tanto no desenvolvimento larval quanto no desenvolvimento desta estrutura cerebral está ocorrendo o adiantamento de

processos que só aconteceriam posteriormente. Sabendo-se da importância das células nervosas, são necessários novos estudos para avaliar se a perda precoce desses neurônios, pode prejudicar o inseto quando o mesmo se tornar adulto, ou se no decorrer do desenvolvimento, essa perda neural será reparada sem causar prejuízos para as abelhas.

Já os corpos pedunculados, foram estruturas evidentes a partir do 5º instar inicial. Roat e Cruz-Landim, (2010) observaram a presença dos corpos pedunculados, no 5º instar larval. A região dos corpos pedunculados também merece atenção, já que nessa estrutura, em pré-pupas tratadas com o tiametoxam (tratamento agudo), foram observados núcleos em processo de morte celular. Estudos realizados por Ganeshina et al. (2000) onde os pesquisadores realizaram uma investigação sobre a morte e a proliferação celular nos corpos pedunculados, revelaram que, as mortes celulares nesta região do cérebro acontecem na fase de pupa. Os corpos pedunculados são um centro de integração sensorial e são estruturas envolvidas no processo de aprendizado e memória (FARRIS, et al., 1999). Devido à importância que esta estrutura cerebral exerce no cérebro de abelhas, a ação do inseticida tiametoxam nesta região pode trazer grandes consequências, afetando futuramente o comportamento das abelhas adultas. Estudos de comportamento com abelhas adultas demonstram que os neonicotinóides podem afetar as mesmas (YANG et al. 2008; EL HASSANI et al. 2008). Sendo os corpos pedunculados estruturas responsáveis pelo comportamento das abelhas, é necessário avaliar se futuramente as alterações causadas pelo tiametoxam às larvas, poderão estar relacionadas a alterações comportamentais em abelhas adultas. No entanto, estudos neste sentido são ainda escassos na literatura especialmente em larvas, e alguns estudos que foram realizados abordam principalmente órgãos como o intestino e túbulos de Malpighi de insetos submetidos a inseticidas (CRUZ et al., 2010; MALASPINA e ZILVA-ZACARIN, 2006). Sendo assim, o presente estudo contribui para um maior entendimento da toxicidade dos inseticidas em órgãos de larvas de abelhas africanizadas *A. mellifera* e confirmando o potencial das mesmas para serem utilizadas como bioindicadores ambientais, além de, contribuir no sentido de proteção desta espécie a baixas doses, que segundo resultados do presente trabalho, podem afetá-las. As mortes celulares visualizadas em pré-pupas na região dos lobos ópticos, puderam ser confirmadas através da análise dos testes imunocitoquímicos de morte celular, sendo que, a região que mais ficou visível foi a dos lobos ópticos. Embora em pré-pupas haja marcação para morte celular tanto para os grupos tratados quanto para o controle, a marcação nos tratamentos foi mais intensa. O kit evidencia extremidades 3'-OH livres no DNA, detectando a fragmentação do DNA por nucleases durante a morte celular. Dessa forma, núcleos

fortemente corados (castanho escuro) foram considerados apoptóticos, enquanto que núcleos com coloração bem clara (levemente castanho) não foram considerados apoptóticos, uma vez que pode tratar-se de células que estão na fase S do ciclo celular, onde extremidades 3'-OH livres estão presentes no processo de replicação do DNA.

Silva-Zacarin et al. (2006), ao investigarem o nível de morte celular em glândulas salivares larvais de *A. mellifera*, expostas ao ácido oxálico, verificaram que, após o tratamento houve um aumento na taxa de morte celular. Embora essas investigações não foram realizadas no mesmo órgão do presentes estudo, provavelmente há um aumento no nível de morte celular quando as larvas de abelhas são expostas aos inseticidas ou outros xenobióticos.

Através da investigação da marcação das proteínas de choque térmico HSP90 em pré-pupas submetidas à exposição aguda e crônica ao inseticida tiametoxam, pudemos verificar que, essas proteínas tiveram expressão durante a fase de pré-pupa em ambos os grupos, tratados e controle. Podemos sugerir que, a HSP90 provavelmente está exercendo sua função como chaperona celular, além de possuir também em condições de estresse e também em condições naturais, um efeito citoprotetor na célula.

Resultados similares foram observados por Roat, (2008) que verificou através do estudo de expressão protéica durante a diferenciação do cérebro em pré-pupas de *A. mellifera* africanizada, que houve durante esta fase de desenvolvimento, a expressão da HSP90 em condições naturais, a autora sugere que, essa expressão pode ser justificada levando-se em consideração a grande variedade de funções de chaperona celulares que elas exercem (GARRIDO, 2001). Essa função de chaperona no processo de diferenciação também tem embasamento nos dados na análise proteômica dos embriões de *A. mellifera*, realizado por Li et al. (2009), que indicou a presença de 6 proteínas da família HSP.

O envolvimento de HSP90 atuando como chaperona também foi descrito no músculo de vôo dos adultos de *A. mellifera*, onde o gene *hsp90* mostrou diferentes padrões de expressão gênica dependente da casta e da idade, sugerindo um mecanismo regulatório dependente de splicing alternativo (Aamodt, 2008). Resultados similares foram reportados por Silva-Zacarin et al. (2006), ao investigarem a expressão da HSP90 e HSP70 após o tratamento com o ácido oxálico e rotenona, onde foi possível verificar que, em ambos os tratamentos, a HSP90 agiu como chaperona celular, e sua marcação não exibiu diferenças em relação ao grupo controle, podendo-se verificar também que, as HSP90 estavam em ambos os tratamentos localizadas apenas na região citoplasmática das células. Sendo assim, este dado que é correspondente ao que pode ser visualizado no presente trabalho, em que as proteínas

HSP90 também ficaram restritas a região citoplasmáticas das células, que elas estão atuando como chaperonas.

Provavelmente, outras proteínas, podem estar relacionadas com a morte celular que foi visualizada tanto na análise histológica quanto no TUNEL, já que a função da HSP90 ainda é controversa. Outro aspecto a ser levantado, é o fato da dose do inseticida que foi utilizada no presente trabalho, provavelmente possa não estar atuando de modo que a HSP90 atue nas vias anti-apoptóticas ou pró-apoptóticas, podendo futuramente ser testadas novas dosagens, para que o modo de atuação dessas proteínas fique mais claro.

7. CONCLUSÃO

Através das análises morfológicas e imunocitoquímicas do cérebro de larvas de abelhas africanizadas *A. mellifera* e dos testes de toxicidade para determinação da CL_{50} , pudemos concluir que, as larvas expostas a altas concentrações do inseticida tiametoxam são diretamente afetadas, obtendo um alto índice de mortalidade. No entanto, em ensaios de intoxicação subletais onde não ocorre a morte do indivíduo, com as análises morfológicas do cérebro das larvas, foi possível verificar que o tiametoxam afeta o desenvolvimento do cérebro, ocasionando mortes celulares atemporais na região dos lobos ópticos em todas as fases de desenvolvimento estudadas, como também nos corpos pedunculados de pré-pupas. Além de afetar o desenvolvimento cerebral, o desenvolvimento larval em condições laboratoriais também foi afetado pelo inseticida. O teste imunocitoquímico de morte celular confirmou as mortes celulares visualizadas na análise morfológica, e o teste de marcação da HSP90 evidenciou que não houve diferenças entre os grupos tratados e controles, sugerindo que em doses subletais de tiametoxam, a HSP90 atua como chaperona celular no cérebro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMODT, R.M. The caste- and age-specific expression signature of honeybee heat shock genes shows as alternative splicing-dependent regulation of HSP90. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.129, n.11, p.632-637, 2008.

ANDREI. Compêndio de defensivos agrícolas. 8a edição. Editora Andrei: São Paulo, 2009. 1380p.

AUPINEL, P.; FORTINI, D.; DUFOUR, H.; TASEI, J.-N.; MICHAUD, B.; ODOUX, J.-F.; PHAM-DELEÈGUE, M. Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v.58, n.2, p.107-111, 2005.

AUPINEL, P. et al. Une nouvelle méthode in vitro pour évaluer les effets à court et moyen terme des pesticides sur les larves d'abeilles. **Bulletin Technique Apicole**, v.34, n.2, p.42-48, 2007a.

AUPINEL, P.; FORTINI, D.; MICHAUD, B.; MAROLLEAU, F.; TASEI, J.-N.; ODOUX, J.-N. Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honeybee brood (*Apis mellifera*) using a new in vitro standardized feeding method. **Pest Management Science**, v.63, n.11, p.1090-1094, 2007b.

BABENDREIER, D.; KALBERER, N.; ROMEIS, A.; FLURI, P.; BIGLER, F. Pollen consumption in honeybee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. **Apidologie**, v.35, n.3, p.293-300, 2004.

BADIOU, A.; MELED, M.; BELZUNCES, L. P. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase. A biomarker to detect deltamethrin exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, n.2, p.246-253, 2008.

BECKER, J.; CRAIG, E.A. Heat-shock proteins as molecular chaperones. **European Journal Biochemistry**, v.219, p.11-23, 1994.

BICKER, G. (Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. **Microscopy Research Technique**, v. 45, n.3, p. 174–183, 1999.

BIERKENS, J.G.E.A. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. **Toxicology**, v. 153, p. 61-72, 2000.

BRAECKMAN, B.; RAES, H. The ultrastructural effect and subcellular localization of mercuric chloride and methylmercuric chloride in insect cells (*Aedes albopictus* C6/36). **Tissue & Cell**, v. 31, n.2, p.223-232, 1999.

BRAECKMAN, B.; BRYNS, K.; RZEZNIK, U.; RAES, H. Cadmium pathology in an insect cell line: ultrastructural and biochemical effects. **Tissue & Cell**, v. 31, n. 1, p. 45-53, 1999.

CALABRESE, E.J. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n.7, p. 1451-1474, 2008.

CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. The dose determines the stimulation (and poison): development of a chemical hormesis database. **Journal of Toxicology**, v.16, n.6, p.545-559, 1997.

CARVALHO, S.M. **Honeybee *Apis mellifera* L., 1758 (hymenoptera: apidae) Enzymes as Possible Biomarkers for the Assessment of Environmental Contamination With Pesticides**. Tese, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 105p. 2010.

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. New York, Cambridge University Press, 1998.

CHAUZAT, M.-P.; FAUCON, J.P.; MARTEL, A.C.; LACHAIZE, J.; COUGOULE, N.; AUBERT, M. A survey of Pesticide Residues in Pollen Loads by Honeybees in France. **Journal of Economic Entomology**, v.99, n.2, p.253-262, 2006.

CHAUZAT, M.-P.; CARPENTIER, P.; MARTEL, A.-C.; BOUGEARD, S.; COUGOULE, N.; PORTA, P.; LACHAIZE, J.; MADEC, F.; AUBERT, M.; FAUCON, J.-P.. Influence of pesticide residues on honey bee (hymenoptera: apidae) colony health in France. **Environmental Entomology**, v. 38, n.3, p.514-523, 2009.

CONTI, M.E.; BOTRE F. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. **Environmental Monitoring Assessment**, v.69, n.3, p.267-82, 2001.

CRUZ-LANDIM, C.; CHAUD-NETTO, J. ; GONÇALVES, L.S. Morphological alterations in the compound eyes of eye-color mutants of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Revista Brasileira de Genética**.II, v.3, n.1, p.223-231, 1979.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo, Editora Unesp, 2009.

CRUZ, A.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; BUENO, O.C.; MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell biology and toxicology**, v.26, n.2, p.165-176, 2010.

CUERVO, A.M.M; DICE, J.F. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. **Science**, v.273, p.5101-5103, 1996.

DECOURTYE A. ARMENGAUD, C.; RENOUC, M.; DEVILLERS, J.; CLUZEAUE, S.; GAUTHIER, M.; MINH-HÀ PHAM-DELÈGUEF et al. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.) **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.78, n.2, p.83-92, 2005.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.-L. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.52, p. 81-106, 2007.

ELBERT, A.; HAAS, M.; SPRINGER, B.; THIELERT, W.; NAUEN, R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest management science**, Sussex, v.64, n.11, p.1099-1105, 2008.

EL HASSANI, A.K.; DACHER, M.; GARY, V.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v.54, n.4, p.653-661, 2008.

EPPO. Decision-making schemes for the environmental risk assessment of plant protection products honey bees. **OEPP-EPPO Bull**, v.23, p. 151-165, 1993.

FARRIS, S.M.; ROBINSON, G.E.; DAVIS, R.L.; FAHRBACH, S.E. Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. **The Journal of Comparative Neurology**, v.414, n.1, p.97-113, 1999.

FAHRBACH, S. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Review of Entomology**, v.51, p.209-232, 2006.

FERREIRA, R.A.C. **Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de Malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807), (hymenoptera, apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico**. Dissertação, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2010.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Third edition, Cambridge: Cambridge University Press, 1980. 333p.

GALLAI, N.; SALLES, J.-M.; SATTELE, J.; VAISSIERE, B.E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v.68, n.3, p.810-821, 2009.

GANESHINA, O.; SCHAFER, S.; MALUN, D. Proliferation and programmed cell death of neuronal precursors in the mushroom bodies of the honeybee. **The Journal of Comparative Neurology**, v.417, n.3, p.349-365, 2000.

GARRIDO, C.; GURBUXANI, S.; RAVAGNAN, L.; KROEMER, G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.286, n.3, p. 433-442, 2001.

GREGORC, A.; POGACNIK, A.; BOWEN, I.D. Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. **Apidologie**, v.35, n.35, p.453-460, 2004.

GREGORC, S.; SMODIS SKERL, M. I. Toxicological and immunohistochemical testing of honeybees after oxalica acid and rotenone treatments. **Apidologie**, v.38, p. 296-305, 2007.

HASHIMOTO, J.H.; RUVOLLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; TOLEDO, E.A.A. Evaluation of the use of the inhibition esterase activity on *Apis mellifera* as bioindicators of insecticide Thiamethoxam Pesticide Residues. **Sociobiology**, v.42, n.3, p.693-699, 2003.

HORRIDGE, G. A. Arthropoda: receptors for light, and optic lobes. In: BULLOCK, T.H.; HORRIDGE, G.A. Structure and function of the nervous system of invertebrates. v.2 . San Francisco: Freeman W H, 1965. p. 1063–1113.

- IWASA, T.; MOTOYAMA, N.; AMBROSE, J.T.; ROE, M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, Guildford, v.23, n.5, p.371-378, 2004.
- ISHAAYA, I.; BARAZANI, A.; KONTSEDALOV, S.; HOROWITZ, A.R. Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance. **Entomological Research**, v.37, n.3, p.148-152, 2007.
- JOHNSON, R.M.; WENZ, Z.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Mediation of Pyrethroid Insecticide Toxicity to Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) by Cytochrome P450 Monooxygenases. **Journal of Economic Entomology**, v.99, n.4, p. 1046-1050, 2006.
- KAKAMAND, F.A.K.; MAHMOUD, T.T.; AMIN, A.B. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. Workers. **Journal of Dohuk University**, v.11, n.1, p.144-151, 2008.
- KERR, J.F.R.; WILLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v.24, p.239-57, 1972.
- KREMEN, C.; WILLIAMS, N. M.; AIZEN, M. A.; GEMMILL-HERREN, B.; LEBUHN, G.; MINCKLEY, R.; PACKER, L.; POTTS, S. G.; ROULSTON, T.; STEFFAN-DEWENTER, I.; VAZQUEZ, D. P.; WINFREE, R.; ADAMS, L.; CRONE, E. E.; GREENLEAF, S. S.; T. H. KEITT; KLEIN, A.-M.; REGETZ, J.; RICKETTS, T. H. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organism: a conceptual framework for the effects of land-use change. **Ecology Letters**, v.10, n.4, p.299-314, 2007.
- LI, J.; ZHANG, L.; FENG, M.; ZHANG, Z.; PAN, Y. Identification of the proteome composition occurring during the course of embryonic development of bees (*Apis mellifera*). **Insect Molecular Biology**, v.18, n.1, 2009.
- LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat shock proteins. **Annual Reviews Genetic**, v.22, p.631-677, 1988.
- MAIENFISCH,P.; ANGST, M.; BRANDL, F.; FISCHER, W.; HOFER, D.; KAYSER,H.; KOBEL,W.; RINDLISBACHER, A.; SENN, R.; STEINEMANN, R.; WIDMER, S.CHEMISTRY and biology of thiametoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest Management Science, Sussex*, v.77, n.10, p.906-13, 2001.
- MALASPINA, O.; SOUZA, T.F. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a agricultura brasileira. In: **Congresso Brasileiro de Apicultura**, Belo Horizonte, MG, Anais, 2008 CD-ROM.
- MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E.C.M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Journal of Morphological Sciences**, v.23, n.3, p.129-136, 2006.
- MANSOUR, S.A. Is it possible to use the honey bee adult as a bioindicator for the detection of pesticide residues in plants? **Acta Biologica Hungarica**, v.38, n.1, p. 69-76, 1987.

- MARIMOTO, R.I.; TISSIÉRES, A.; GEORGOPOULOUS, C. **The biology of heat shock proteins and molecular chaperones**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994.
- MICHELETTE, ER.F.; SOARES, A.E.E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera L.*). **Apidologie**, Versailles, v.24, p.431-440.
- MORSE, R. A; CALDERONE, N. W. The value of honeybees as pollinators of U.S. crops in 2000. **Bee Culture**. Medina, v. 128, p. 1-15, 2000.
- NAUEN, R.; BRETSCHNEIDER, T. New modes of action of insecticides. **Pesticide Outlook**, v.10, n.6, p.241-245 2002
- NIELSEN, S.A.; BRODSGAARD, C.J.; HANSEN, H. Effects on Detoxification Enzymes in Different Life Stages of Honey Bees (*Apis mellifera L.*, Hymenoptera:Apidae) Treated with a Synthetic Pyrethroid (Flumethrin). **Seventeenth Scandinavian Cell Toxicology Congress**, v.28, p.437-443, 2000.
- NEUMANN, P.; CARRECK, N. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, London, v.49, p.1-6, 2010.
- NOCELLI, R. C. F. ; ROAT, T. C. ; SILVA ZACARIN, E. C. M. ; PALMA, M. S. ; MALASPINA, O. . Social Insects: morphophysiology of the nervous system. In: E. M. Stewart. (Org.). Social Insects: Structure, Function, and Behavior. Hauppauge, NY: Nova Publishers, 2010.
- NÚNES, G.R.V.; JAVIER, J.; EUÁN, QUEZADA.; ANCONAXIU, P.; MOO.-VALE, H.; CARMONA, A.; SÁNCHEZ, E.R. Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Apiculture and Social Insects**, v.102, n.5, p.1737-1742, 2009.
- PENG, Y.-S.; C.; MUSSEN, E.; FONG, A.; MONTAGUE, M.A.; TYLER, T. Effects of Chlortetracycline of Honey Bee Worker Larvae Reared *in Vitro*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.127-133, 1991.
- PHAM-DELÈGUE, M.-H.F.; DECOURTYE, A.; KAISER, L.; DEVILLERS, J. Behavioral methods to assess the effects of pesticides on honey bee. **Apidologie**, Versailles, v.33, n.5, p.425-432, 2002.
- PROSKURYAKOV, S.Y.; KONOPLYANNIKOV, A.G.; GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**. New York, v. 283, n.1, p.1-16, 2003.
- PORRINI, C.; GHINI, S.; GIROTTI, S.; SABATINI, A. G.; GATTACECCHIA, E.; CELLI, G. Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M.-H. (Ed.). Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. London: Taylor and Francis, 2002. p. 186-247.

READY, D. F.; HANSON, T. E.; BENZER, S. Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. **Developmental Biology**, v. 53, n.2, p. 217-240, 1976.

RIBI, W.; SENDEN, T.J.; SAKELLARIOU, A.; LIMAYE, A.; ZHANG, S. Imaging honey bee brain anatomy with micro-x-ray-computed tomography. **Journal of Neuroscience Methods**, v.171, n.1, p.93-97, 2008.

READY, D. F.; HANSON, T. E.; BENZER, S. Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. **Developmental Biology**, v. 53, n. 2, p. 217-240, 1976.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v. 12, n. 5, p. 1-22, Jan. 2005.

ROAT, T.C. **Diferenciação do cérebro de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose: estudo comparativo entre castas e sexos**. Tese, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 184p. 2008.

ROAT, T.C.; CRUZ-LANDIM, C. Differences in mushroom bodies morphogenesis in workers, queens and drones of *Apis mellifera*: Neuroblasts proliferation and death. **Micron**, v.41, n.4, p.382-389, 2010.

ROAT, T.C.; CRUZ-LANDIM, C. Mitosis and cell death in the optic lobes of workers, queens and drones of the honey bee (*Apis mellifera*) during metamorphosis. **J.Biosci**, v.35, n.3, p.415-425, 2010.

RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M.-P.; TOUFFET-BRIENS, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v.36, n.1, p.71-83, 2005.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; LOPES, D.A.; ALENCAR, V.; TOLEDO, A.; HASHIMOTO, J.H. **Avaliação da utilização de larvas de abelhas Africanizadas (*Apis mellifera*) como bioindicadores da presença de resíduos de Thiamethoxam**. Disponível em: <http://www.clickciencia.ufscar.br/portal/edicao17/artigo1_detalhe.php>. Acesso em: 10 fev. 2011.

SANDERS, B.M. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. **Critical Reviews in Toxicology**, v.23, n.1, p.49-75, 1993.

SILVA-ZACARIN, E.C.M.; GREGORC, A.; MORAES, R.L.M.S. In situ localization of heat shock proteins and cell death labelling in the salivary gland of acaricide-treated honeybee larvae. **Apidologie**, v.37, p.507-516, 2006.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.74, n.1, p.10-18, 2011.

STOKSTAD, E. The case of the empty hives. **Science**, v.316, n.5827, p.970-972, 2007.

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L.P. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.19, n.7, p.1901-1905, 2000.

SMIRLE, J.S.; WINSTON, M.L. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v.66, n.9, p.138-142, 1988.

SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the honey bee**. Ithaca, New York, Comstock Publishing Associates, p.334, 1956.

THOMPSON, H.M. Behavioural effects of pesticides in bees- their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, London, v.12, p.317-300, 2003.

TOMIZAWA, M., CASIDA, J.E. Selective Toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annual Review of Entomology** v.48, p.339-64, 2003.

TOPORCAK J, LEGATH J, KULKOVA J. Levels of mercury in samples of bees and honey from areas with and without industrial contamination. **Veterinary Medicine (Prague)**, v.37, n.7, p.405-412, 1992.

TREMOLADA, P.; BERNARDINELLI, I.; COLOMBO, M.; SPREAFICO, M.; VIGHI, M. Coumaphos distribution in the hive ecosystem: case study for modeling applications. **Ecotoxicology**, London, v.13, n.6, p.589-6601, 2004.

TRUMAN, J.W. Hormonal Control of the Form and Function of the Nervous System. In: GILBET, L.I. *Insect Development*. 1ª ed. London, 2009.

TRUMAN, J.W. Cell death in the nervous system of an adult insect. **Annual Reviews in Neuroscience**, v.7, p.171-188, 1984.

TSIGOURI, A.D.; MENKISSOGLU-SPIROUD, U.; THRASYVOU, A.; DIAMANTIDIS, Gr. Fluvinate residues in honey and bees wax after different colony treatments. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, v.72, n.5, p.975-982, 2004.

WU, J.J.; ANELLI, C.A.; SHEPPARD, W.S.; Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity. **Plos One**, v.6, n.2, p.1-11, 2011.

VANDENBERG, J. D.; SHIMANUKI, H. Technique for rearing worker honeybees in the laboratory. **Journal of Apicultural Research**, v.26, p.90-97, 1987.

YANG, E.C.; CHUANG, Y.G.; CHEN, Y.L.; CHANG, L.H. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (hymenoptera: apidae). **Apiculture and social insects**, v.101, n.6, p.1743-1748, 2008.

YAMAMOTO, I.; CASIDA, J.E. (Eds.), *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Springer, Tokyo. 1999.

YOKOYAMA, N.; HIRATA, M.; OHTSUKA, K.; NISHIYAMA, Y.; FUJII, K.; FUJITA, M.; KUZUSHIMA, K.; KIYONO, T.; TSURUMI, T. Co-expression of human chaperone hsp70 and Hsc or HSP40 co-factor increases solubility of overexpressed target proteins in insect cells. **Biochemica Biophysica Acta**, v.1493, p.119-124, 2000.