
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**EFEITOS COMBINADOS DE *Nosema ceranae* E DO INSETICIDA
IMIDACLOPRIDO SOBRE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADA**

HELLEN MARIA SOARES LIMA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro - SP
Junho/2017**

HELLEN MARIA SOARES LIMA

**EFEITOS COMBINADOS DE *Nosema ceranae* E DO INSETICIDA
IMIDACLOPRIDO SOBRE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADA**

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção
do título de doutor em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro - SP

Junho/2017

595.799 Lima, Hellen Maria Soares
L732e Efeitos combinados de *Nosema ceranae* e do inseticida
imidacloprido sobre abelhas *Apis mellifera* africanizada /
Hellen Maria Soares Lima. - Rio Claro, 2017
144 f. : il., figs., gráfs., tabs., quadros, fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina
Coorientador: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

1. Abelha. 2. Ecotoxicologia e doenças em abelhas. 3.
Concentração letal média. 4. Sinapsina. 5. HSP 70. 6. Morte
celular. 7. Sistema imune. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

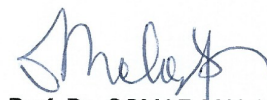
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: EFEITOS COMBINADOS DE *Nosema ceranae* E DO INSETICIDA
IMIDACLOPRIDO SOBRE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADA

AUTORA: HELLEN MARIA SOARES LIMA

ORIENTADOR: OSMAR MALASPINA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. OSMAR MALASPINA
CEIS / IB Rio Claro


Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro


Profa. Dra. ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN
Departamento de Biologia / Universidade Federal de São Carlos


Profa. Dra. MONICA JONES COSTA
Departamento de Biologia / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


Profa. Dra. THAISA CRISTINA ROAT FABRI
CEIS / Unesp de Rio Claro

Rio Claro, 21 de junho de 2017

*Àquele que me faz ser melhor a cada dia, meu
marido Rodrigo.*

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo nº 2013/09555-5) pelo suporte financeiro à pesquisa realizada.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina e à Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, pela amizade, orientação, atenção e paciência diante de minhas dúvidas.

À Profa. Dra. Elaine Cristina da Silva Zacarin pela amizade, apoio e momentos bombásticos de debates de ideias.

Aos amigos e colaboradores Tatiane Grella, Adna Dorigo, Jéssica Araújo, Isabela Camargo, Caio Domingues, Thaisa Roat, Stephan Carvalho, Aline Catae, Priscila Friol, Daiana Tavares, Pâmela Décio, Franco Pereira e Rodrigo Barbosa pela convivência, companheirismo, auxílio, discussões e apoio. Sem a ajuda de cada um de vocês, esse trabalho não seria possível.

Ao Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, ao Centro de Estudos de Insetos Sociais, ao Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de abelhas (LECA), ao Laboratório de Evolução Molecular (LEM) e ao Laboratório de Mutagênese Ambiental (LMA) pelo apoio técnico fornecido.

Aos técnicos Sérgio Pascon, Gerson Mello Souza, Priscila Socolowski e Flávia Rodrigues pela disponibilidade em ajudar e pela gentileza com que atenderam as minhas necessidades.

À toda a minha família, principalmente à minha mãe, Maria Aparecida Lopes, pela confiança e pelo amor incondicional.

Ao Rodrigo Lima, amigo e marido, por sua constante ajuda e paciência com que acompanhou todas as etapas deste trabalho, por não ter permitido que eu me dobrasse as dificuldades, por dividir comigo os fracassos e os sucessos e pelo amor que compartilhamos.

À todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho e me ajudaram a ter sucesso nessa etapa.

Agradeço à Deus.

RESUMO

As abelhas *Apis mellifera* são importantes polinizadores de plantas nativas ou cultivadas, porém o contato com os agroecossistemas pode expor esses insetos à substâncias tóxicas, como o inseticida imidacloprido. A sistemicidade desse composto pode levar a contaminação não só das abelhas forrageiras, mas também dos outros indivíduos da colônia, inclusive, das larvas por meio do consumo de pólen e néctar contendo resíduos de imidacloprido. Assim, a primeira etapa desse trabalho determinou a toxicidade do imidacloprido para larvas e abelhas adultas do híbrido *A. mellifera* africanizada. Os resultados mostraram que as larvas são mais tolerantes ao imidacloprido do que as abelhas recém-emergidas e que alterações no desenvolvimento larval só foram observadas em concentração oito vezes maior do que a concentração letal média estabelecida para as abelhas adultas. Visto que não só os inseticidas, como também as parasitoses, como a nosemose, podem enfraquecer as colônias e comprometer a viabilidade destas, este trabalho visou avaliar, ainda, os efeitos da exposição de operárias de *A. mellifera* africanizada ao inseticida imidacloprido e/ou da infecção das abelhas por *Nosema ceranae* e compreender como esses fatores atuam isolados e em conjunto sobre o organismo desses insetos. A sobrevivência das abelhas diminuiu quando estas foram expostas ao inseticida e/ou infectadas pelo parasita, sendo que a combinação destes dois estressores comprometeu ainda mais a longevidade delas. Tanto a *N. ceranae* quanto o imidacloprido, isolados ou em combinação levaram às células do intestino médio das abelhas ao estresse, evidenciado pela imunomarcção da chaperona HSP 70 e a morte celular, provavelmente por macroautofagia, indicada pela intensa vacuolização e pela diminuição na expressão gênica da caspase-3. No intestino, a atividade tecidual da glutathione-S-transferase não foi afetada, provavelmente, devido aos danos encontrados no epitélio que afetaram as funções de metabolização e biotransformação. Uma vez com o intestino comprometido, uma maior quantidade do inseticida poderia ter atingido a hemolinfa, levando as células dos túbulos de Malpighi, órgão responsável pela excreção de substâncias tóxicas do organismo, à morte celular. No cérebro, o inseticida alterou a atividade sináptica dos corpos pedunculados, conforme demonstrado pela imunomarcção da sinapsina, causou estresse celular e aumento de células gliais, que podem indicar injúria do tecido nervoso. A ação neurotóxica do inseticida provocou, ainda, aumento da atividade tecidual das enzimas acetilcolinesterase e carboxilesterase na cabeça das abelhas. A atividade sináptica alterada e o aumento do estresse celular nos corpos pedunculados foram observados também nas abelhas infectadas apenas por *N. ceranae*, indicando resposta ao parasitismo. Adicionalmente, a combinação patógeno-

inseticida e os estressores, quando isolados, causaram imunossupressão, diminuindo o número de hemócitos circulantes na hemolinfa e transcrição de genes relacionados a resposta imune individual e social. A partir dos resultados deste trabalho, concluiu-se que a combinação entre *N. ceranae* e concentrações residuais do imidacloprido afetou a sobrevivência das abelhas não só pela ação do inseticida em seu órgão alvo, o cérebro, mas, também, pelo comprometimento das funções digestórias e excretoras e pela diminuição da imunidade das abelhas.

Palavras-chave: concentração letal média, sinapsina, HSP 70, morte celular, sistema imune.

**COMBINED EFFECTS OF *Nosema ceranae* AND IMIDACLOPRID INSECTICIDE
ON AFRICANIZED HONEYBEES *Apis mellifera***

ABSTRACT

The *Apis mellifera* honeybees are important pollinators both for native and cultivated plants. However, the contact with the agroecosystems may expose these insects to toxic substances, such as imidacloprid insecticide. Compound systemicity may lead to the contamination not only of forager honeybees, but also of other colony individuals, including larvae, through both pollen and nectar consumption containing imidacloprid residues. Thus, the first stage of this work evaluated the imidacloprid toxicity to both larvae and adult honeybees of hybrid Africanized *A. mellifera*. Results showed that larvae are more tolerant to imidacloprid than newly emerged honeybees, and alterations in larvae development were only observed at concentrations eight times higher than the average lethal concentration established for adult honeybees. Since not only insecticides, but also diseases such as nosemosis may weaken colonies and compromise its viability, the second stage of this work was the evaluation of the exposure effects of Africanized *A. mellifera* workers to imidacloprid insecticide and/or to honeybees infection by *Nosema ceranae* in order to understand how these factors act both isolated and together on organism of these insects. Honeybees survival decreased when they were exposed to insecticide and/or infected by parasite, and the combinations of these two stressors further compromised their longevity. Both *N. ceranae* as imidacloprid, either alone or in combination, led midgut cells of honeybees to stress, evidenced by HSP 70 chaperone immunostaining, and to cell death, probably by macroautophagy, as indicated by genic expression decrease of caspase-3. In the midgut, glutathione-S-transferase tissue activity was not altered, probably due to damage found on the epithelium that may affect both metabolization and biotransformation function. Once midgut was compromised, probably more quantity of insecticide reached hemolymph, leading cells from Malpighian tubules, organ responsible for toxic substances excretion from organism, to cell death. In the brain, the insecticide altered mushroom body synaptic activity, as verified by synapsin immunostaining, and it also caused cellular stress and increased of glial cells, which may indicate nerve tissue injury. Insecticide neurotoxic action also caused an increase in the activity of acetylcholinesterase and carboxylesterase enzymes in the heads of the honeybees. Altered synaptic activity and increased cellular stress in mushroom bodies were also observed for honeybees infected only by *N. ceranae*, indicating response to parasitism. Additionally, pathogen-insecticide combination and the stressors, when isolated, caused

immunosuppression, reducing both the hemocytes circulating number in hemolymph and transcription of genes related to individual and social immune response. Based on results from this work, we may conclude that combination between *N. ceranae* and residual concentrations of Imidacloprid affected honeybees survival, due to insecticide action on their target organ (brain), impairment on digestory and excretory functions and honeybees immunity decreased.

Keywords: lethal median concentration, synapsin, HSP 70, cell death, immune system.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.i.	Active ingredient
AChE	Acetilcolinesterase
AIF	Fator indutor da apoptose
AKH	Hormônio adipocinético
Apaf-1	Fator ativador da protease apoptótica 1
Atg2	Gene relacionado à autogafia 2
BOD	Estufa de demanda química de oxigênio
CaE-3	Carboxielesterase-3
CCD	Distúbio no colapso de colônias (colony collapse disorder)
CCE	Carboxil colinesterase
CL100	Grupo experimental exposto ao imidacloprido na concentração de 0,075 ng/μL
CL1000	Grupo experimental exposto ao imidacloprido na concentração de 0,0075 ng/μL
CL₅₀	Concentração letal média
CL₅₀/100	Valor da concentração letal média dividido por cem
CL₅₀/1000	Valor da concentração letal média dividido por mil

CT	Threshold cycle
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona-S-transferase
HSP	Proteína de choque térmico
i.a.	Ingrediente ativo
JNK	Kinase c-Jun N-terminal
LC₅₀	Lethal median concentration
N+CL100	Grupo experimental infectado com 60.000 esporos de <i>Nosema ceranae</i> e exposto ao imidacloprido na concentração de 0,075 ng/μL
N+CL1000	Grupo experimental infectado com 60.000 esporos de <i>Nosema ceranae</i> e exposto ao imidacloprido na concentração de 0,0075 ng/μL
nAChR	Receptores nicotínicos de acetilcolina
Nosema	Grupo experimental infectado com 60.000 esporos de <i>Nosema ceranae</i>
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
P450	Citocromo P450 monooxigenase
PBS	Tampão fosfato de sódio
TL₅₀	Tempo letal médio
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. OBJETIVOS GERAIS	21
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. CAPÍTULO 1	22
Larvae are more tolerant to imidacloprid than adult honeybees	
Abstract	23
Introduction	24
Materials and Methods	25
Results	27
Discussion	28
Conclusion.....	30
Additional files	31
Acknowledgments	32
References	32
Supplemental data	36
5. CAPÍTULO 2	40
<i>Nosema ceranae</i> e imidacloprido causam estresse e citotoxicidade para abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizada	
Resumo.....	41
Introdução.....	42
Materiais e Métodos	44
Resultados	49
Discussão.....	60
Agradecimentos.....	66
Referências	66
Informações suplementares	75
6. CAPÍTULO 3	77
Abelhas têm resposta neural alterada após infecção por <i>Nosema ceranae</i> e exposição ao imidacloprido	
Resumo.....	78
Introdução.....	79
Materiais e Métodos	82
Resultados	86
Discussão.....	94
Conclusões	98
Agradecimentos.....	98
Referências	98
7. CAPÍTULO 4	105
Expressão gênica e atividade enzimática em <i>Apis mellifera</i> africanizada após infecção por <i>Nosema ceranae</i> e exposição ao imidacloprido	

Resumo.....	106
Introdução.....	107
Materiais e Métodos.....	109
Resultados.....	113
Discussão.....	114
Conclusões.....	118
Apêndices.....	120
Agradecimentos.....	123
Referências.....	123
8. DISCUSSÃO GERAL.....	131
9. CONCLUSÕES.....	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

1. INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas *A. mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae), possuem capacidade de adaptação a diversos climas e por isso apresentam ampla distribuição geográfica. No Brasil, a maioria dos ninhos naturais encontrados correspondem às formas híbridas, denominadas *A. mellifera* africanizada, provenientes do cruzamento de diversas subespécies originárias da Europa e África (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 1993; FRANCOY et al., 2012).

Em uma colônia de *A. mellifera* existem diferenças anatômicas, fisiológicas e comportamentais entre os indivíduos que resultam numa divisão de trabalho. Enquanto a rainha e o zangão possuem função reprodutiva, as operárias são responsáveis pela realização de atividades para a manutenção do ninho. Elas exercem preferencialmente uma determinada tarefa, de acordo com a idade, desenvolvimento glandular e necessidade da colônia. A partir de 21 dias de idade, as operárias realizam atividades de forrageamento e coleta, podendo atuar, assim, como agentes polinizadores (FREE, 1980).

Devido ao hábito generalista na utilização dos recursos florais, as abelhas melíferas são consideradas polinizadores em potencial de plantas nativas e cultivadas. A interação entre abelhas e plantas garante às primeiras o desenvolvimento da colônia, pois o pólen e o néctar são as principais fontes de proteínas e carboidratos destes insetos, e aos vegetais sucesso na reprodução cruzada, aumento na variabilidade genética e, conseqüentemente, a otimização na produção de frutos e sementes (KEARNS; INOUE, 1997; BRITAIN; POTTS, 2011).

A agricultura é cada vez mais dependente do uso de produtos químicos para controlar pragas e assegurar a produtividade (DESNEUX et al., 2007). A aplicação dos agrotóxicos reduz a presença dos polinizadores, como as abelhas, nos agroecossistemas (ALLEN-WARDELL et al., 1998), pois os produtos utilizados para combater as pragas são também potencialmente prejudiciais para a fauna benéfica.

Ao forragearem em áreas agrícolas, as abelhas podem ser contaminadas pelo contato direto com os agrotóxicos, principalmente na época de florada das culturas, quando esses insetos intensificam suas visitas (FREITAS; PINHEIRO, 2010). Outro fato preocupante é a deriva, ocasionada pelas correntes de vento, que pode levar os agrotóxicos para apiários, meliponários ou colônias silvestres próximos aos locais de aplicação destes compostos (KERR et al., 2001).

Agrotóxicos, como o inseticida neonicotinoide imidacloprido, que são utilizados no combate de afídeos e outros insetos sugadores de seiva, possuem característica sistêmica, ou seja, têm capacidade de translocação, pela seiva, de uma parte da planta para outra

(MARICONI, 1983; GALLO et al., 2002) sendo detectados em todos os tecidos vegetais (SCHMUCK et al., 2001; BONMATIN et al., 2003; SUR; STORK, 2003). Assim, não só as abelhas que realizam o forrageamento entram em contato com as substâncias tóxicas presentes no ambiente, como também aquelas que fazem atividades intracoloniais e as larvas que podem se alimentar de pólen e néctar contaminados com inseticidas. Cresswell (2011) estimou, a partir de dados disponíveis na literatura, que a concentração realística encontrada em campo do imidacloprido seria de 0,7 a 10 ppb para o néctar floral.

Autores relataram a presença do imidacloprido, seus metabólitos (olefina e 5-hidroxiimidacloprido) e outros neonicotinoides (tiametoxam, clotianidina, acetamiprido, tiacloprido e dinotefuram) no pólen e néctar de culturas tratadas com formulações comerciais destes inseticidas por diferentes métodos de aplicação (solo, semente ou foliar) (SCHMUCK et al., 2001; DIVELY; KAMEL, 2012; POHORECKA et al., 2012; STONER; EITZER, 2012; BYRNE et al., 2014). No quadro 1 estão descritas as quantidades de imidacloprido encontradas no pólen e néctar, as culturas nas quais o inseticida foi detectado e a localização dessas.

Quadro 1 - Concentrações de imidacloprido encontradas no pólen e néctar.

Imidacloprido (ng/g ou ppb)		Culturas/ Região	Fontes
Pólen	Néctar		
3,3 (± 1)	1,9 (± 1)	Girassol (<i>Helianthus annuus</i>), Alemanha	Schmuck et al. (2001)
4,9 a 80,2	0,4 a 11,2	Abóbora (<i>Curcubita pepo</i>), Maryland – EUA	Dively e Kamel (2012)
0	0,6	Canola (<i>Brassica napus</i>), Polônia	Pohorecka et al. (2012)
14 (± 8)	10 (± 3)	Abóbora (<i>Curcubita pepo</i>), EUA	Stoner e Eitzer (2012)
5,15	2,9 a 39,4	<i>Citrus</i> , California –EUA	Byrne et al. (2014)

Desenvolvidos nos anos 90, os neonicotinoides são uma forma sintética derivada da estrutura da nicotina e atualmente estão registrados para a utilização em uma grande variedade de culturas (FAIRBROTHER et al., 2014). Esses inseticidas são neurotóxicos e atuam como agonistas da acetilcolina nos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos (nAChRs), localizados nos neurônios pós-sinápticos (BUCKINGHAM et al., 1997; SUCHAIL et al., 2004). Ao contrário da acetilcolina, que é hidrolisada pela acetilcolinesterase, esses compostos não são degradados imediatamente. Portanto, os impulsos nervosos são

transmitidos de forma contínua e levam à hiperexcitação do sistema nervoso do inseto (GALLO et al., 2002).

As abelhas possuem um menor número de genes (11000) que codificam proteínas quando comparadas a outros insetos como, por exemplo, *Drosophila melanogaster* (13500) e *Anopheles gambiae* (14000). As diferenças mais marcantes ocorrem em genes que codificam três superfamílias de enzimas de detoxificação a xenobióticos. As abelhas possuem uma deficiência de genes da glutationa-S-transferases (GST), citocromo P450 monooxigenase (P450) e carboxil colinesterases (CCE), associados à aquisição de resistência à inseticidas. Assim sendo, a sensibilidade das abelhas aos inseticidas poderia estar diretamente ligada ao déficit de enzimas de detoxificação (CLAUDIANOS et al., 2006). Se as abelhas não podem adquirir resistência aos produtos aplicados nas áreas de cultivo como as pragas, o aumento no uso dos inseticidas ou a combinação entre produtos químicos com a finalidade de eliminar pragas mais resistentes poderia ter grande impacto para as populações de abelhas.

O fenômeno do sumiço das abelhas *A. mellifera*, denominado de distúrbio no colapso de colônias (CCD), tem sido relatado na Europa (ELLIS et al., 2010) e nos Estados Unidos (STOKSTAD, 2007; NEUMANN; CARRECK, 2010) e caracteriza-se pela diminuição no número de indivíduos nas colônias, sem que sejam notadas abelhas mortas nas proximidades (VANENGELSDORP et al., 2009). Entre as possíveis causas da CCD estão o uso de inseticidas neonicotinoides, as doenças, como a nosemose, a redução das fontes de alimento, as mudanças climáticas, a urbanização, os desmatamentos e a ocupação intensiva das terras (CHAUZAT et al., 2006; HO; CUMMINS, 2007; OLDROYD, 2007; YANG et al., 2008; HIGES et al., 2008; HIGES et al., 2009; VANENGELSDORP et al., 2009; BROMENSHENK et al., 2010). Apesar de casos específicos de CCD serem raros no Brasil, o impacto dos agentes causadores são amplamente conhecidos sobre as populações de abelhas (PIRES et al., 2016).

Duas espécies descritas do gênero *Nosema*, *N. apis* e *N. ceranae*, causam a nosemose em abelhas *A. mellifera* (CHEN et al., 2008; WATANABE, 2008). Os microsporídios *N. apis* e *N. ceranae* são endoparasitas de abelhas adultas, cuja principal via de transmissão é oral-fecal. Milhões de esporos desses microsporídios são encontrados no epitélio do ventrículo das abelhas infectadas, podendo danificar o aparelho digestório e deixar as abelhas mais susceptíveis à infecção por bactérias e vírus (WATANABE, 2008).

A nosemose leva o hospedeiro a um estresse energético ou nutricional, uma vez que os microsporídios não possuem mitocôndrias e são dependentes do ATP produzido pelo

hospedeiro, principalmente na fase de germinação dos esporos, que tem elevada demanda energética (CORNAMAM et al., 2009).

Devido a degeneração do epitélio ventricular e a diminuição da secreção de enzimas digestórias, a infecção por *Nosema* sp. resulta em hiperfagia, que pode ter implicações na epidemiologia da doença. O aumento da fome pode levar à uma maior incidência do comportamento de trofalaxis elevando, assim, a disseminação via oral-oral do patógeno dentro da colônia (MAYACK; NAUG, 2009; MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2011). A transmissão horizontal da nosemose pelas flores também seria potencializada, pois a fome leva ao aumento do forrageamento (COLLA et al., 2006).

Diferente do que foi relatado para a *N. apis*, abelhas infectadas por esporos de *N. ceranae* podem ser encontradas em qualquer época do ano (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2007). Juntamente com a ausência de sazonalidade, a reprodução possível dentro de uma maior amplitude térmica faz com a *N. ceranae* seja um agente patogênico com uma maior capacidade de propagação do que a *N. apis* (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2009).

O ciclo biológico dos microsporídios causadores da nosemose é dependente da temperatura. A temperatura ótima para a reprodução dos esporos tanto de *N. apis* quanto de *N. ceranae* é de 33 °C, a qual representa também a temperatura interna das colônias de abelhas. Em 25 °C e 37 °C, a *N. ceranae* foi capaz de parasitar um maior número de células do que a *N. apis*, sendo a temperatura de 37 °C a menos favorável para ambas (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2009).

O processo de africanização das abelhas no Brasil fez com que a doença causada pela *N. apis* desaparecesse e, dessa forma, o microsporídio causador da nosemose há 34 anos no país tem sido *N. ceranae* (TEIXEIRA et al., 2013).

Pettis et al. (2013) identificaram maior probabilidade de infecção por *Nosema* sp. em abelhas que consumiam pólen com resíduos de fungicidas e inseticidas. A interação entre a infecção por *N. ceranae* e a exposição a agrotóxicos, como imidacloprido, tiacloprido e fipronil, aumentaram a mortalidade, comprometeram a longevidade, enfraqueceram as colônias e alteraram a carga de esporos no intestino, quando comparada a exposição das abelhas a estes estressores de forma isolada (ALAUX et al., 2010; VIDAU et al., 2011; AUFAUVRE et al., 2012; PETTIS et al., 2012).

Aufauvre et al. (2014) avaliaram as respostas moleculares da interação patógeno-inseticida e mostraram que, em linhas gerais, os estressores acometeram o sistema imunológico e afetaram a expressão de proteínas que compõem a cutícula, barreira física de defesa do organismo.

Abelhas que tiveram o sistema imunológico comprometido mostraram diminuição de suas funções cognitivas, evidenciada pela redução na capacidade de associar um odor à recompensa alimentar (MALLON et al., 2003). Além disso, a expressão de genes no cérebro, principalmente daqueles relacionados com a resposta imune ou antioxidante, como defensina-1, peroxidase, esterase e glucose-oxidase, foi alterada por parasitas, como *Varroa destructor* ou *N. ceranae*, como também por inseticidas (MCDONNELL et al., 2013; ROAT et al., 2014).

Uma vez que o inseticida imidacloprido é neurotóxico e que o parasitismo por *N. ceranae* pode alterar as funções do sistema nervoso, um dos órgãos utilizados neste trabalho para a avaliação dos efeitos isolados ou combinados desses estressores foi o cérebro, especialmente a região dos corpos pedunculados.

A estrutura geral do sistema nervoso da abelha adulta é essencialmente a mesma do sistema nervoso larval, sendo que, algumas modificações ocorrem durante a pupação, como o cérebro que, devido ao desenvolvimento dos lobos antenais e ópticos, aumenta de tamanho (CRUZ-LANDIM, 2009).

O cérebro das abelhas é dividido em protocérebro, deutocérebro e tritocérebro e constituído por regiões contendo os corpos celulares de neurônios, denominadas de somata, e as regiões que contêm os prolongamentos celulares, chamadas de neurólipas (CHAPMAN, 1998; BRANDT et al., 2005).

No protocérebro estão localizados os corpos pedunculados, que são centros de integração multimodal e recebem informações olfativas, visuais, gustatórias e mecanossensoriais e, por isso, estão relacionados com a plasticidade comportamental das abelhas (KOMISCHKE et al., 2005; KIYA et al., 2007).

Os corpos pedunculados, também conhecidos como corpos de cogumelo, são estruturas pares constituídas de neurópilas em forma de cálice, dos quais partem pedúnculos em direção ao lobo alfa (região que processa toda a informação proveniente das outras regiões do cérebro) (RYBAK; MENZEL, 1993; FARRIS et al., 1999). Os cálices são preenchidos com os corpos celulares de neurônios, chamados de células de Kenyon. As células de Kenyon são diferenciadas em compactas internas, não compactas e compactas externas, de acordo com a sua localização e quantidade de citoplasma em relação ao núcleo (FARRIS; SINAKEVITCH, 2003; FAHRBACH, 2006).

O cálice dos corpos pedunculados pode ser subdividido em lábio, colar e anel basal. O lábio recebe aferências dos lobos antenais e o colar dos lobos ópticos, enquanto que o anel basal possui fibras de entrada de ambos e, assim, recebe os estímulos olfativos e visuais. Os

estímulos visuais são bilaterais no cérebro dos himenópteros, em contraste, os olfativos são sempre unilaterais (GRONENBERG, 2001).

Em trabalho com os corpos pedunculados de abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona postica* expostas ao imidacloprido, Soares (2012) identificou compactação cromatínica, comprometimento da estrutura tecidual e da adesão célula-célula e perda de eletrondensidade e rompimento mitocondriais, mostrando que este inseticida causa alterações celulares que culminam na morte das células de Kenyon. A morte dos neurônios dos corpos pedunculados, estruturas relacionadas com a formação de memória e aprendizagem, compromete o comportamento das abelhas e, dependendo do número de indivíduos afetados, toda a colônia pode ser inviabilizada.

Estudos toxicológicos têm analisado também a ação dos inseticidas no sistema digestório, principalmente na região do ventrículo, por ser importante rota de entrada destes compostos no organismo das abelhas (KAKAMAND et al., 2008; CRUZ et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, esse órgão constitui modelo interessante para avaliações patógeno-hospedeiro, principalmente quando se trata de patógenos que utilizam as células intestinais para completar seu ciclo de vida, como *Nosema* sp. (DUSSAUBAT et al., 2012).

Nas larvas, os órgãos envolvidos na ingestão, digestão e armazenamento de nutrientes estão entre os mais desenvolvidos, sendo que, durante a pupação, o trato digestório é reorganizado em função da conformação adquirida pelo corpo do inseto adulto e das atividades que as operárias terão que executar para manutenção da colônia, como a alimentação das crias e a trofalaxia (CRUZ-LANDIM, 2009).

O sistema digestório dos insetos é dividido em três regiões: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. No intestino médio, também designado de mesentério ou ventrículo, ocorre a maior parte da digestão e absorção das substâncias ingeridas (ZERBO, 2003).

A parede do ventrículo é formada pelo epitélio e por fibras musculares viscerais. Dois tipos celulares constituem a parte básica e funcional do epitélio: as células principais, digestórias ou enterócitos, responsáveis pela secreção de enzimas digestórias e absorção de nutrientes, e as células regenerativas, destinadas a produzir novas células para substituir as células principais que são eliminadas por desgaste (CRUZ-LANDIM et al., 1996). Na porção apical das células principais, recobrando as microvilosidades, encontra-se a membrana peritrófica que consiste em uma camada acelular que protege o epitélio contra o atrito com o alimento (SNODGRASS, 1935; TERRA; FERREIRA, 1981; CHAPMAN, 1998; TERRA,

2001). Segundo Jimenez e Gilliam (1990) são as células da região anterior do ventrículo que secretam a maior parte da membrana peritrófica.

Estudos sobre os efeitos do ácido bórico e do fipronil no organismo de larvas de *A. mellifera* (CRUZ et al., 2010) e sobre os efeitos da deltametrina, malation e tiametoxam para operárias adultas desta mesma espécie (KAKAMAND et al., 2008), mostraram que os compostos avaliados provocaram alterações morfológicas no epitélio do ventrículo que poderiam comprometer a alimentação e hidratação das abelhas.

Catae et al. (2014) avaliaram os efeitos do tiametoxam no intestino e nos túbulos de Malpighi de abelhas recém-emergidas expostas a uma concentração considerada subletal. No intestino, o inseticida levou a desorganização no retículo endoplasmático liso, alterações nucleares e mitocondriais e aumento de vacúolos citoplasmáticos, porém, após oito dias, houve uma recuperação do órgão. Os autores discutem que a recuperação do intestino pode ter relação direta com uma provável tentativa de desintoxicação e excreção do composto pelos túbulos de Malpighi, evidenciada pelo aumento do retículo endoplasmático liso e alterações no labirinto basal e nas microvilosidades.

Na região de transição entre os intestinos médios e posterior, o piloro, desembocam os túbulos de Malpighi, estruturas que compõem o sistema excretor das abelhas e são os responsáveis pela manutenção da homeostase hídrica e eliminação de produtos potencialmente tóxicos do organismo (BERRIDGE, 1969; CHAPMAN, 1998; CRUZ-LANDIM, 2009).

A passagem dos túbulos de Malpighi para o intestino encontra-se fechada nas larvas e, assim, os produtos de excreção acumulam-se na luz dos túbulos durante toda fase larval. Quando a passagem se abre, no final do 5º ínstar, os túbulos colapsam, após liberação de seu conteúdo, e são destruídos para que novos túbulos possam ser formados durante a metamorfose (CRUZ-LANDIM, 2009).

Nas abelhas adultas, os túbulos são formados por uma camada de células epiteliais e ao longo de seu comprimento a forma das células e o conteúdo da luz mudam mas, de uma maneira geral, a região apical das células é constituída por microvilosidades, enquanto a região basal apresenta numerosas invaginações (BRADLEY, 1985; CRUZ-LANDIM, 1998).

As substâncias a serem excretadas acumulam-se inicialmente na porção basal das células dos túbulos de Malpighi formando vesículas que, posteriormente, serão exocitadas na porção apical e eliminadas na luz do túbulo (SNODGRASS, 1935). O produto de excreção produzido pelo túbulo de Malpighi flui para o intestino e fica acumulado no reto. Esse produto de excreção é constituído de resíduos, como uratos, compostos orgânicos, água e

íons. Parte dessas substâncias, principalmente a água, é reabsorvida no percurso até o reto e nas papilas retais (DOW, 1981; CRUZ- LANDIM, 2009).

Uma vez que tanto os neonicotinoides quanto a nosebose podem afetar a sobrevivência das abelhas e comprometer a viabilidade das colônias sendo, assim, apontados como possíveis causadores da CCD, este trabalho visou avaliar se a exposição de operárias de *A. mellifera* africanizada ao inseticida imidacloprido interfere na infecção das abelhas por *N. ceranae* e compreender como esses fatores atuam no organismo desses insetos.

2. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo determinar a toxicidade do imidacloprido para as abelhas *A. mellifera* africanizada e avaliar os efeitos isolados e combinados da *N. ceranae* e/ou do imidacloprido sobre as mesmas.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1) Determinar a concentração letal média (CL_{50}) do neonicotinoide imidacloprido para larvas e recém-emergidas de abelhas *Apis mellifera* africanizada;
- 2) Avaliar os efeitos isolados e combinados da infecção por *N. ceranae* e de concentrações compatíveis com as encontradas no pólen e no néctar do imidacloprido no organismo das abelhas, por meio:
 - da determinação do tempo letal médio (TL_{50});
 - da quantidade de esporos do microsporídio no intestino das abelhas infectadas;
 - das possíveis alterações na morfologia e da imunomarcção da HSP 70 nos corpos pedunculados, no intestino médio e nos túbulos de Malpighi;
 - da marcação de morte celular pela técnica de TUNEL no intestino médio e nos túbulos de Malpighi;
 - da imunomarcção da sinapsina nos corpos pedunculados;
 - da expressão dos genes da abaecina, apidaecina, defensina-1, defensina-2, himenoptaecina, lisozima, glucose desidrogenase, caspase-1 e caspase-3;
 - da contagem de hemócitos circulantes na hemolinfa e;
 - da atividade das enzimas glutathiona-S-transferase, acetilcolinesterase e carboxilesterase.

4. CAPÍTULO 1

O artigo referente a este capítulo foi submetido para publicação na **Environmental Toxicology and Chemistry** e, portanto, está editado conforme as regras da revista.

Larvae are more tolerant to imidacloprid than adult honeybees

Hellen Maria Soares Lima^a; Stephan Malfitano Carvalho^b; Adna Suelen Dorigo^a; Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin^c; Roberta Cornélio Ferreira Nocelli^d; Osmar Malaspina^a.

^a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

^b Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Agrárias, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

^c Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Humanas e Biológicas, Departamento de Biologia, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

^d Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Araras, São Paulo, Brasil.

Abstract

Not only are foraging bees exposed to toxic substances in the environment, but those bees performing activities inside the colonies and the larvae are also exposed. The adult bees and larvae can ingest nectar and pollen contaminated with insecticides, particularly those with systemic effects, such as imidacloprid. Imidacloprid is an acetylcholine agonist and acts on the nicotinic receptors of the nervous system, causing continuous nerve impulse, hyperexcitation, and insect death. This study investigated the effects of imidacloprid on the mortality of larvae and adults of the Africanized honeybee *Apis mellifera*, which is a nontarget insect of insecticides applied to crops. In addition, larval development following exposure to imidacloprid was also monitored. The lethal medium concentration (LC₅₀) for larvae was 541.89 ng of active ingredient (a.i.)/μL of diet (72 hours), 304.68 ng a.i./μL (96 hours), and 179.98 ng a.i./μL (120 hours), whereas the LC₅₀ for adult honeybees was 7.48 ng/μL (24 hours) and 4.13 ng/μL (48 hours). Statistical analyses revealed that larval development parameters were affected beginning with 64 ng/μL. Thus, the results suggest that larvae were more tolerant than the adult honeybees to the insecticide. This tolerance can be explained, at least in part, by the large body area occupied by the fat body of the larvae, which captures and stores potentially toxic substances circulating in the hemolymph. The process of brain structure formation in larvae can also decrease the neurotoxicity of the imidacloprid.

Keywords: lethal median concentration, neonicotinoids, dimethoate, metamorphosis

Introduction

The phenomenon known as colony collapse disorder (CCD) contributes to the decline of *A. mellifera* colonies and has been attributed to multiple stressors, including the indiscriminate use of pesticides in cultivated areas (1).

Systemic pesticides, such as the insecticide imidacloprid, are used in the control of aphids and other sucking insects because these pesticides can be translocated through sap and are detected in all plant tissues (2). Authors have reported the presence of imidacloprid, its metabolites (olefin and 5-hydroxyimidacloprid) and other neonicotinoids (thiamethoxam, clothianidin, acetamiprid, thiacloprid, and dinotefuran) in the pollen and nectar from crops treated with commercial formulations of these insecticides in different application methods (soil, seed, or leaf) (2-4)

Thus, one form of contamination with pesticides in bees is the presence of their active ingredients or their metabolites in pollen and nectar, which can be used as food for all individuals of the colony, including larvae (5-6). Worker larvae are estimated to consume 0.3 ng imidacloprid from contaminated pollen and nectar during the first 5 days of development, while nurse workers can ingest as much as 1.9 ng in 8 days (6).

Residues of several pesticides have been identified in colonies of *A. mellifera*, among them neonicotinoids, which compromise the larval development and adult emergence, in addition to reducing the longevity of the bees (7).

Neonicotinoids are neurotoxic and act as acetylcholine agonists, causing a continuous passage of nerve impulses, hyperexcitation, and the death of the insect (8). In sublethal concentrations, the neonicotinoid thiamethoxam sped up the physiological process of cell death in the brain of the Africanized *A. mellifera* larvae, mainly in the region of the optic lobes, a process that should occur only during metamorphosis. The changes in brain remodeling caused by this insecticide could interfere with activities performed during the adult stage (9).

Adult bees exposed to sublethal concentrations of imidacloprid exhibit impaired foraging activity (10-11), probably due to impaired learning and olfactory memory formation, evidenced by the proboscis extension response (12-13), and due to a lack of motor coordination caused by this neonicotinoid (14).

Changes in behavior at the individual level can compromise the dynamics of an entire colony. The exposure of *Bombus terrestris* bees to imidacloprid at the field concentration (10 ppb) leads to poorer performance of the workers in pollen collection, in addition to causing an

increase in the mortality rate and the number of forager bees that do not return to the colonies (15). Decreased foraging can cause colonies to produce more workers in the brood to meet the feeding requirements. However, the brood can also be compromised, since insecticides affect the larvae physiologically (9-16) and indirectly impair their development by limiting food availability (15, 17).

Protocols establishing guidelines for toxicity testing on adult bees of *A. mellifera* have existed since 1998 (18-19), but the protocols for larval toxicity testing are more recent, one of which was published in 2013 (20) and another which is in the standardization phase (21).

Because little is known about the toxicity of pesticides to larvae, especially for the Africanized *A. mellifera* polyhybrid found in Brazil (22), this study aimed to compare the median lethal concentrations of imidacloprid obtained for newly emerged bees and larvae and to evaluate the effects of this insecticide on metamorphosis.

Materials and Methods

Obtaining newly emerged bees and larvae

Workers in the larval stages and newly emerged adults of the Africanized *A. mellifera* were collected from three different colonies in the apiary of the Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da UNESP, *Campus* Rio Claro. Induced and controlled egg laying by the queen was undertaken in the three colonies to generate sufficient quantities of 1st instar larvae for the laboratory tests

Median lethal concentration (LC₅₀) of imidacloprid for adult bees

The procedures for determining the oral LC₅₀ were based on the protocol of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 213 (18).

The insecticide imidacloprid (Sigma-Aldrich) was solubilized in acetone (15%) and water, and subsequently, successive dilutions were performed in the food (inverted sugar and water at a ratio of 1:1) to reach the concentrations offered to the bees (64, 32, 16, 8, 4, 2, and 1 ng active ingredient (a.i.)/μL diet).

Newly emerged 1-day-old bees were housed in 250-mL, disposable, plastic pots lined with filter paper; these were kept in a biochemical oxygen demand (BOD) incubator at a temperature of 32 ± 1 °C and relative humidity of 70%. The food contaminated with imidacloprid was offered *ad libitum* during the whole experimental period and was not replaced by uncontaminated food. Three replicates were used for each concentration tested, with 20 bees in each replicate. The bees of the control group underwent the same procedures

as described above, but these bees received food without insecticide. A solvent control group was also established, in which the proportion of acetone (0.9%) in the highest concentration of imidacloprid tested was added to the food.

The mortality of individuals was recorded at 24 and 48 hours after they were offered the contaminated food.

Median lethal concentration (LC₅₀) of imidacloprid for worker larvae

The 1st instar larvae were transferred to cell cups containing artificial diet and kept in a BOD incubator in the dark at 34 ± 2 °C and relative humidity of $90 \pm 5\%$. The cell cups were arranged in 48-well cell culture plates, which were pre-lined with dental cotton soaked in 500 µL aqueous solution containing 15% glycerol and 0.2% sodium dichloroisocyanurate. The culture plates with the cell cups were placed in a plastic box containing beakers with anhydrous potassium sulfate solution (K₂SO₄) to maintain the relative humidity at the preset value.

The artificial diet of the larvae consisted of a mixture of D-glucose, D-fructose, yeast extract, and royal jelly. The diet was prepared in an aqueous solution, and the larvae were fed daily until the 6th day (Table 1) (23-24).

Four days after the transfer of the larvae to the artificial cell cups, they were exposed to the insecticide. The procedures for the determination of the oral median lethal concentration (LC₅₀) were based on the OECD 237 protocol (20).

The insecticide imidacloprid (Sigma-Aldrich) was solubilized in acetone (50%) and water, and subsequently, successive dilutions were performed in the diet to reach the concentrations offered to the larvae (1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, and 8 ng a.i./µL diet).

Considering that the insecticide was diluted in acetone, two control groups were used: one group received a diet with acetone (5%) in the proportion found in the highest concentration tested, and the other group only received the diet.

For each concentration and for the controls, a minimum of 36 larvae were used, from three different colonies (12 larvae from each colony). The mortality of the individuals was recorded at 24, 48, 72, 96, and 120 hours after the bees were offered the diet contaminated with the imidacloprid.

Larvae from the three different colonies were orally exposed to dimethoate at a dose of 8.8 µg/larvae, and mortality data were adjusted according to the OECD 237 guidelines.

In addition to mortality, other parameters were observed and expressed in terms of occurrence after the exposure of the larvae to the imidacloprid insecticide at concentrations of

1024, 512, 256, 128, 64, and 8 ng a.i./ μ L diet: progression of the sub-phases of the last larval instar (positioning in the cell cups and defecation) (Figure 1A and 1B) (25), pupation rate (Figure 1C), pupae anatomical characters, and emergence rate (23-24).

Statistical analyses

Mortality data obtained from the assays were subjected to statistical analysis using the software R[@] (R Core Team 2016) and the package drc (26). With the log-logistic model fitted, the LC₅₀ values were determined, as well as their respective 95% confidence intervals and chi-square values.

For each of the larval development parameters, the R[@] (R Core Team 2016) software was used to perform statistical tests of association among the imidacloprid concentrations tested. The probability of association (p-value) was obtained by Pearson's chi-square or Fisher's exact test, according to the composition of the analyzed data (sample size and expected frequency), with a p-value <0.05 being considered significant. Because multiple comparisons were performed, the p-values were adjusted by the Benjamini-Hochberg's false discovery rate (FDR) method.

Results

The median lethal concentrations found for Africanized *A. mellifera* workers orally exposed to imidacloprid were 541.89 ng a.i./ μ L of diet in 72 hours, 304.68 ng a.i./ μ L in 96 hours, and 179.98 ng a.i./ μ L in 120 hours (Table 2 and Supplementary data 1). For newly emerged bees, the LC₅₀ for imidacloprid was 7.48 ng a.i./ μ L in 24 hours and 4.13 ng a.i./ μ L in 48 hours (Table 2 and Supplementary data 2).

In the first 48 hours of analysis, larval mortality was low, making it impossible to determine the LC₅₀.

In addition, testing with the standard insecticide dimethoate in our laboratory, as recommended by the OECD protocols, ensured the reproducibility of the tests. For newly emerged Africanized *A. mellifera* bees, the LC₅₀ of the dimethoate was 7.96 ± 0.45 ng a.i./ μ L of diet (27) or 0.15 μ g a.i./bee, considering that each bee consumes 20 μ L of food per day (2,5,18). At 72 hours after exposure of the larvae to the insecticide, larval mortality for dimethoate at a dose of 8.8 μ g a.i./larva was 50.51%.

The results of the developmental progression parameters showed that the larvae exposed to concentrations of 64, 128, 256, 512, and 1024 ng a.i./ μ L of diet showed a delay in positioning themselves vertically in the cell cups in comparison to the larvae of the control

group, as observed on the 6th experimental day. On day 7, a delayed vertical orientation of the larvae was still observed at concentrations of 64, 256, 512, and 1024 ng a.i./ μL (Supplementary data 3). However, 4 days after being fed with imidacloprid (8th experimental day), larvae exhibited vertical orientation dependent on the concentration of the imidacloprid only for the 256 and 512 ng a.i./ μL groups. At a concentration of 1024 ng a.i./ μL , one live larvae remained on the 8th day, which was observed beginning its vertical orientation.

On the 7th day of the experiment, in comparison with the control, larvae exposed to concentrations of 512 and 1024 ng a.i./ μL exhibited a difference in the rate of defecation. On the 8th day, this effect on the larval defecation rate was only observed at a concentration of 1024 ng a.i./ μL imidacloprid (Supplementary data 4). None of the larvae in the 1024 ng a.i./ μL treatment survived after the 9th day; thus, they died without defecation and without reaching the prepupal stage.

The pupation rate showed no relation with the imidacloprid concentration to which the larvae were exposed (Supplementary data 5), but the number of pupae with anomalies (absence of eversion of the appendages) (Figure 1D), compared to the control, was dependent on the imidacloprid concentration in the 256 and 512 ng/ μL groups (Supplementary data 6).

On the 21st day of the experiment, concentrations of 128, 256, 512, and 1024 ng a.i./ μL were found to decrease the bee emergence rate in comparison to the control (Supplemental data 7).

Discussion

Data from the present study show that the toxicity of imidacloprid differs between Africanized *A. mellifera* larvae and newly emerged workers. The determined median lethal concentrations indicate that the larvae are more tolerant to the imidacloprid than newly emerged bees of the same species.

The results corroborate data obtained for European *A. mellifera* subspecies where the median lethal dose (LD_{50}) of imidacloprid was 1400 ng/larva (28) and ranged from 3.7 to 40.9 ng/bee (2).

The tolerance of larvae to toxicity of insecticides can be explained in part by the abundance of the fat body, representing 60% of the body weight and corresponding to 80% of all larval tissues. In adult bees, the fat body is less developed and decreases in quantity during the life of the insect (29-30).

The fat body plays an important role in the absorption and accumulation of nutrients and xenobiotics, especially in the feeding phase of the larvae (29). In this period, the first 5

days of life, the connection between the midgut and the hindgut is occluded, and therefore, the larvae do not defecate. Malpighian tubules, responsible for excretion, also do not open into the gut lumen throughout the larval phase (29, 31). Thus, the ingested imidacloprid bioaccumulates in the larva until the end of the 5th instar. At this time, the connection between the midgut and the hindgut opens to allow defecation, and the contents of the Malpighian tubules are eliminated along with the feces.

Under laboratory conditions, this period before the metamorphosis is easily observed by positioning the larvae in the cell cups. In the first days, the larvae are arranged in the bottom of the cup in a C shape (feeding phase). At the end of the feeding phase, the larvae begin to spin the body inside the cup, and their guts are full (spinning phase) (Figure 1A). When they spin in the cups, the individuals defecate and “stand up,” with the head extended (prepupal period), which marks the beginning of the metamorphosis (25, 31).

Statistical analyses showed that imidacloprid affected the vertical orientation of the larvae at concentrations of 64 ng/ μ L and higher and delayed larval defecation at concentrations of 512 ng/ μ L or higher.

In the developmental progression, the next stage is pupation, when the digestive system is remodeled; the larval Malpighian tubules are destroyed, with new ones forming; and the nervous system undergoes major modifications (29, 32-33).

The neurogenesis of the adult central nervous system comprises the restructuring and degeneration of larval neurons and the differentiation of the neuroblasts that will originate new neurons (34).

Another hypothesis that would also explain larval tolerance to the insecticide is that not all brain structures are fully formed in the larvae. As their neurons remodel to become adult neurons, they do not have the same nicotinic acetylcholine receptor subtypes present in the nervous system of the adult bee. This could potentially reduce the neurotoxicity of imidacloprid at this stage of development, since this insecticide is an agonist of nicotinic acetylcholine receptors.

Eleven genes encode the different nicotinic acetylcholine receptor subtypes (35) in *A. mellifera* bees, and their mRNAs are expressed at different stages of development. The $\alpha 2$ subtype mRNA is similarly expressed in pupal and adult brains, but the $\alpha 7-1$ and $\alpha 7-2$ subtypes were found only in the optic lobes of adult bees (36). The $\alpha 3$ subtype was found to be restricted in the larvae of *A. mellifera* to the subspophageal ganglion of the peripheral nervous system, whereas in the adult workers, the expression of this subtype occurs in the optic lobes, antennal lobes, and, in particular, in the calyx of mushroom bodies (37).

Evidence exists that the presence of nicotinic acetylcholine receptor subtypes is also age dependent among adult bees, probably related to the maturation of these organisms for the performance of more-complex activities. Notably, the imidacloprid metabolites olefin and 5-hydroxyimidacloprid express different affinities to nicotinic acetylcholine receptor subtypes during the bee's adult lives (38).

The imidacloprid did not compromise the pupation rate of the exposed individuals, but at a concentration of 512 ng/ μ L or more, it caused an increase in the number of pupae that never everted their appendages, and at concentrations of 128 ng/ μ L or higher, it made the emergence of adult bees unviable.

Although larvae survive and reach emergence when exposed to low concentrations of imidacloprid, the possibility that these larvae do not become viable adults in terms of longevity and the ability to perform the many activities required to maintain the colony cannot be ruled out.

Authors have exposed larvae to different doses of imidacloprid directly in the colonies and have reported changes in pupation and emergence rates only for doses equal to or above 2000 ng/larva. Afterwards, these emerged bees, which had been exposed in the larval phase to sublethal doses of this insecticide, were submitted to the proboscis extension response assay, and they exhibited reduced olfactory-associative ability (28).

Although the results presented here show that imidacloprid causes mortality of larvae or changes some developmental parameters at concentrations higher than the median lethal concentration established for the adult insect, the risk of cumulative exposure exists for bees from the chronic consumption of pollen and nectar contaminated with pesticide residues (28).

For this reason, neonicotinoids are considered potentially dangerous for bees, and studies on their effects on larvae, in addition to adults, are important because the success of the colony depends largely on the larvae (39).

Conclusion

Larvae exposed to imidacloprid exhibit an LC_{50} (72 hours) approximately seventy times greater than the LC_{50} (24 hours) of newly emerged bees under laboratory conditions. In addition, the lowest concentration capable of causing changes in larval development was approximately eight times higher than the median lethal concentration established for adult bees. These data indicate that the larvae are more tolerant than newly emerged bees of the same species to the neonicotinoid insecticide imidacloprid.

Additional files

Table 1: Artificial diet for Africanized *A. mellifera* workers (modified from 23-24).

Day	1	2	3	4*	5	6
Type of diet	A	A	B	C	C	C
Amount per larva	10 μ L	10 μ L	20 μ L	30 μ L	40 μ L	50 μ L

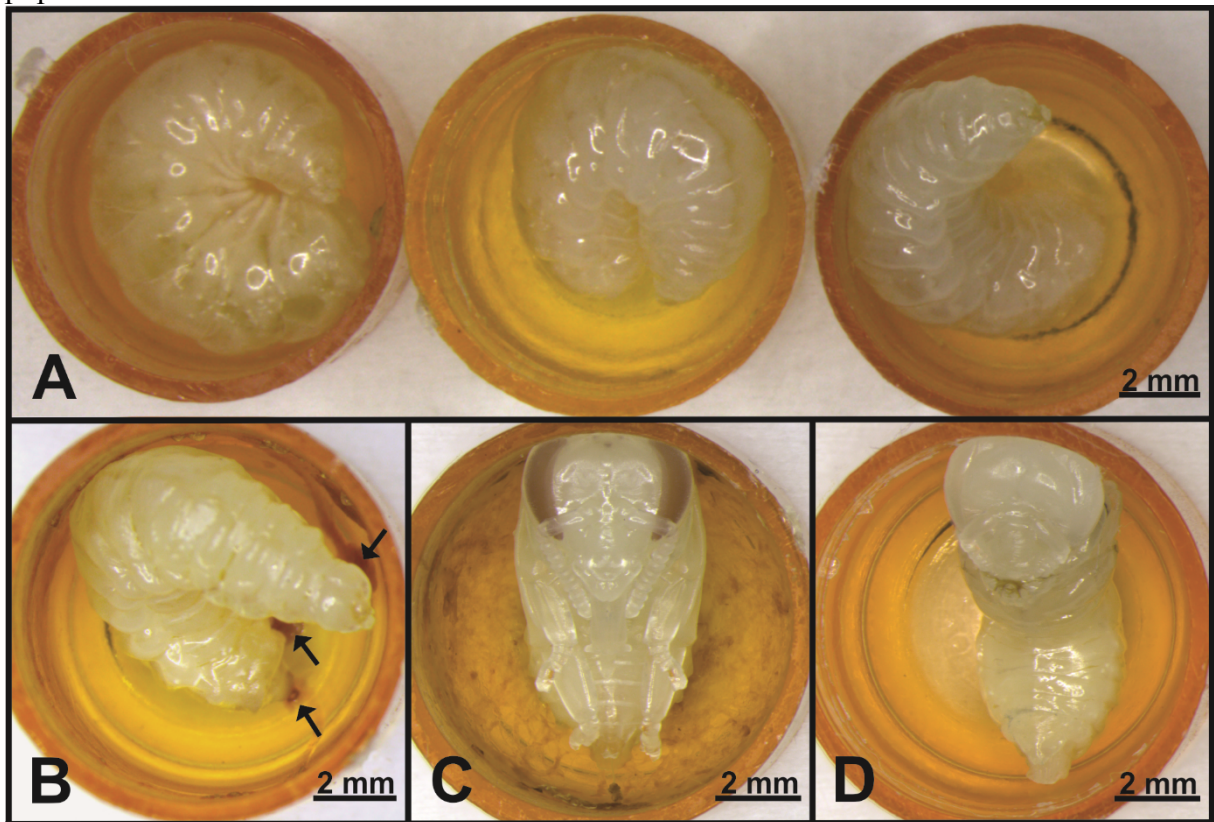
Composition of the diets: D-glucose, D-fructose, yeast extract, and royal jelly. The asterisk indicates the day of oral exposure of the larvae to the imidacloprid insecticide.

Table 2: Imidacloprid toxicity values for larvae and newly emerged adults of Africanized *A. mellifera*.

Stage	Time ^a	LC ₅₀ ^b	CI _{95%} ^c	χ^2 m ^d	DF ^e	χ^2 t ^f
Larval	72	541.89	378.32 – 705.46	23.776	24	36.41503
	96	304.68	220.88 – 388.48	25.817	24	36.41503
	120	179.98	131.61 – 228.35	15.118	24	36.41503
Adult	24	7.48	6.05 – 8.92	20.473	22	33.92444
	48	4.13	3.11 – 5.16	26.216	22	33.92444

^aExposure time in hours to imidacloprid; ^blethal concentration 50% (ng a.i./ μ L of diet); ^cconfidence interval at 95%; ^dchisquare from model; ^edegrees of freedom; ^ftabulated chisquare.

Figure 1: Progression of development. A- Vertical orientation of the larvae inside the cell cups; B- Prepupal stage (the arrows indicates defecation); C- Pupal stage; D-Anomalous pupa.



Acknowledgments

The authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP (2013/09555-5 and 2012/50197-2), PhD. Daiana Antônia Tavares for technical support and PhD. Tiago Falcon Lopes for suggestions of the statistical methods.

References

- 1- Van Engelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood RM, Tarpay DR, Pettis JS. 2009. Colony Collapse Disorder: a descriptive study. *Plos One* 4(8): 1-17.
- 2- Schmuck R, Schoning R, Stork A, Schramel O. 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag Sci* 57: 225-238.
- 3- Stoner KA, Eitzer BD. 2012. Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *Plos One* 7(6); 1-5.

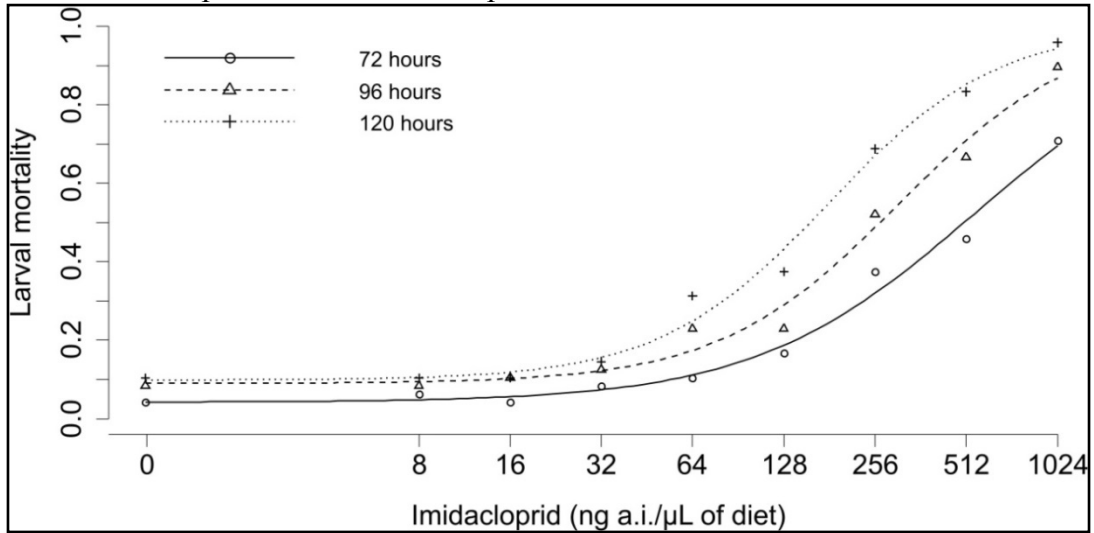
- 4- Byrne FJ, Visscher PK, Leimkuehler B, Fischer D, Grafton-Cardwell EE, Morse JG. 2014. Determination of exposure levels of honey bees foraging on flowers of mature citrus trees previously treated with imidacloprid. *Pest Manag Sci* 70: 470–482.
- 5- Schmuck R, Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U. 2003. Effects of imidacloprid and common plant metabolites of imidacloprid in the honeybee: toxicological and biochemical considerations. *Bull Insectology* 56(1): 27-34.
- 6- Rortais A, Arnold G, Halm MP, Touffet-Briens F. 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* 36: 71-83.
- 7- Wu JJ, Anelli CA, Sheppard WS. 2011. Sub-Lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *Plos One* 6(2): 1-11.
- 8- Buckingham SD, Lapied B, Le Corrionc H, Grolleau F, Sattelle DB. 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J Exp Biol* 200: 2685-2692.
- 9- Tavares DA, Roat TC, Carvalho SM, Silva-Zacarin ECM, Malaspina O. 2015. In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere* 135: 370–378.
- 10- Yang EC, Chuang YC, Chen YL, Chang LH. 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 101(6): 1743-1748.
- 11- Tan K, Chen W, Dong S, Liu X, Wang Y, Nieh JC. 2014. Imidacloprid alters foraging and decreases bee avoidance of predators. *Plos One* 9(7): 1-8.
- 12- Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delègue MH. 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 57(3): 410-419.
- 13- Williamson SM, Wright GA. 2013. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *J Exp Biol* 216: 1799-1807.
- 14- Williamson SM, Willis SJ, Wright GA. 2014. Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. *Ecotoxicology* 23: 1409-1418
- 15- Gill RJ, Ramos-Rodriguez O, Raine NE. 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature* 491: 105-109.
- 16- Gregorc A, Ellis JD. 2011. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pestic Biochem Physiol* 99: 200-207.

- 17-Feltham H, Park K, Goulson D. 2014. Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology* 23(3): 317-323.
- 18-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. 1998. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. *OECD*, n.213, 8p.
- 19-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. 1998. Honeybees, Acute Contact Toxicity Test. *OECD*, n.214, 7p.
- 20-OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. 2013. Honeybees (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure. *OECD*, n. 237, 10p.
- 21-OECD Draft Guidance Document. 2013. Honeybees (*Apis mellifera*) larval toxicity test, repeated exposure. *OECD*, 11p.
- 22- Francoy TM, Gonçalves LS, De Jong D. 2012. Rapid morphological changes in populations of hybrids between Africanized and European honey bees. *Genetics and Molecular Research* 11(3): 3349-3356.
- 23-Aupinel P, Fortini D, Dufour H, Tasei JN, Michaud B, Odoux JF, Pham-Delègue M. 2005. Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bull Insectology* 58(2): 107-111.
- 24-Aupinel P, Fortini D, Michaud B, Marolleau F, Tasei JN, Odoux JN. 2007. Toxicity of dimetoate and fenoxycarb to honeybee brood (*Apis mellifera*) using a new in vitro standardized feeding method. *Pest Manag Sci* 63(11): 1090-1094.
- 25-Michelette FER, Soares AEE. 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in africanized honey bee works (*Apis mellifera* L.) *Apidologie* 24: 431-440.
- 26-Ritz C, Streibig JC. 2005. Bioassay analysis using R. *J Stat Softw* 12 (5): 1-22.
- 27- Barbosa RA. 2015. Avaliação dos efeitos de concentrações subletais de dimetoato no cérebro e ventrículo de *Apis mellifera* africanizada. PhD thesis. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo, Brasil.
- 28-Yang EC, Chang HC, Wu WY, Chen YW. 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *Plos One* 7(11): e49472.
- 29-Cruz-Landim C. 2009. *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. Editora UNESP, São Paulo, Brasil, 416p.
- 30-Bishop GH. 1961. Growth rates of honeybees larva. *J Exp Zool* 146: 11-20
- 31-Nunes-Silva P, Gonçalves LS, Francoy TM, De Jong D. 2006. Rate of growth and development time of africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. *Braz J Morphol Sci* 23: 325-332.

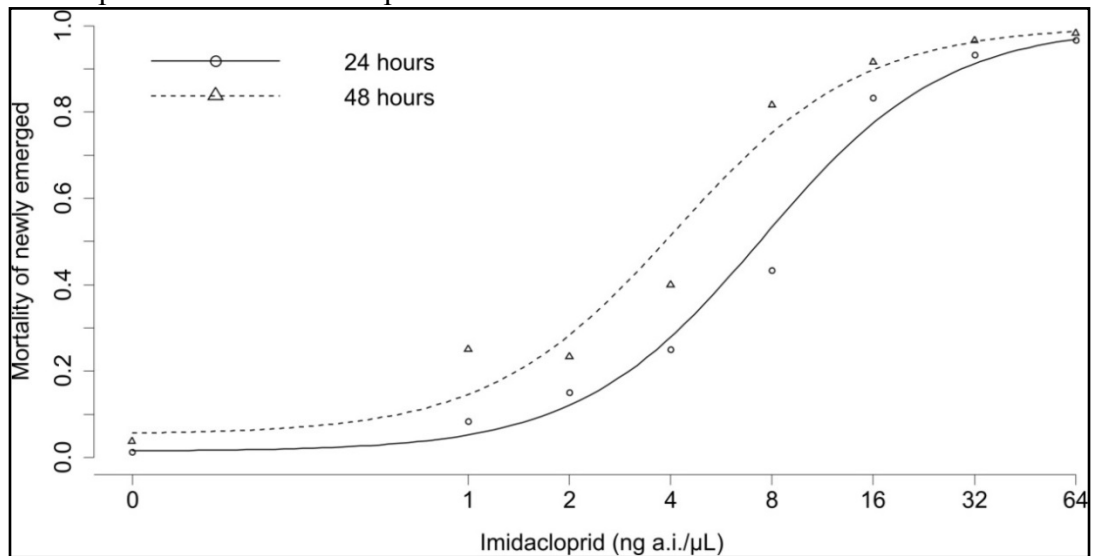
- 32-Dobrovsky TM. 1951. Postembryonic changes in the digestive tract of worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Cornell Univ Agr Exp Stat Mem* 301: 1-45.
- 33-Chapman RF. 1998. *The insects: structure and function*. Cambridge University Press, Cambridge, England, 770p.
- 34-Tissot M, Stocker RF. 2000. Metamorphosis in *Drosophila* and other insects: the fate of neurons throughout the stages. *Prog Neurobiol* 62(1): 89-111.
- 35-Jones AK, Raymond-Delpech V, Thany SH, Gauthier M, Sattelle DB. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. 2006. *Genome Res* 16: 1422-1430.
- 36-Thany SH, Crozatier M, Raymond-Delpech V, Gauthier M, Lenaers G. Apisa2, Apisa7-1 and Apisa7-2: three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor α -subunits in the honeybee brain. 2005. *Gene* 344: 125-132.
- 37-Thany SH, Lenaers G, Crozatier M, Armengaud C, Gauthier M. 2003. Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 12(3): 255-262.
- 38-Guez D, Belzunces LP, Maleszka R. 2003. Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacol Biochem Behav* 75: 217-222.
- 39-Blacquièrè T, Smaghe G, Van Gestel CAM, MommaertS M. 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21(4): 973-992.

Supplemental data

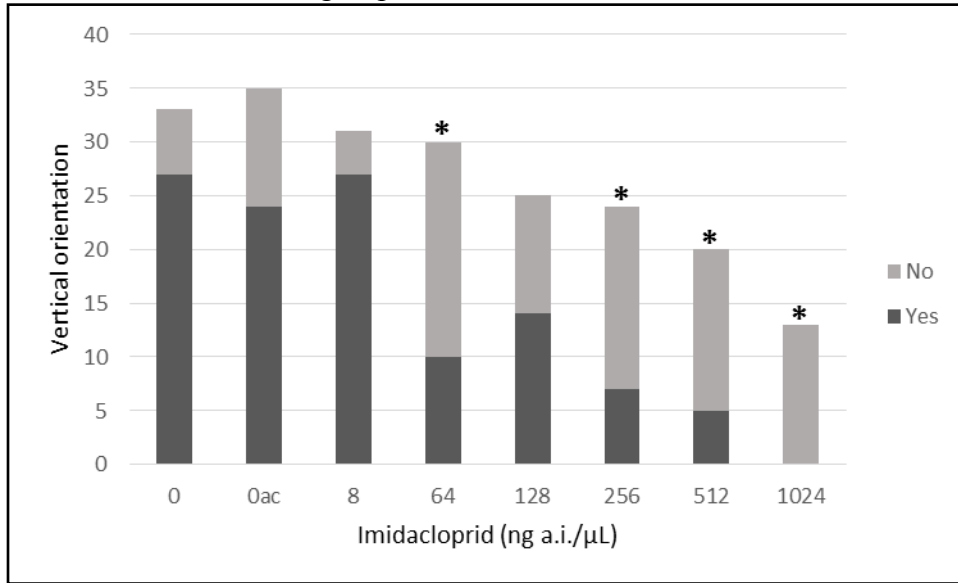
Supplementary data 1: LC_{50} statistical curve of larvae after 72 hours, 96 hours, and 120 hours of oral exposure to the imidacloprid insecticide.



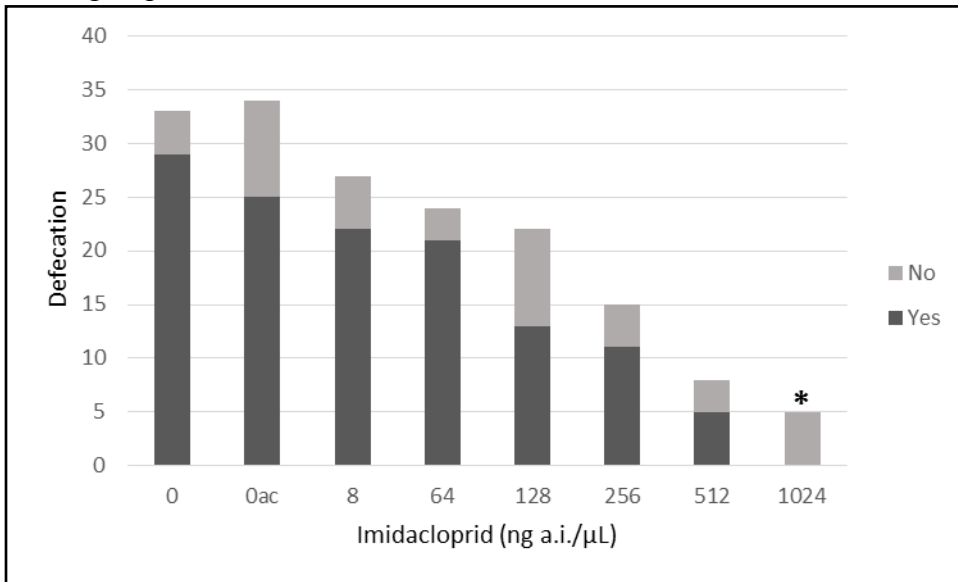
Supplementary data 2: LC_{50} statistical curve of newly emerged bees 24 and 48 hours after oral exposure to the imidacloprid insecticide.



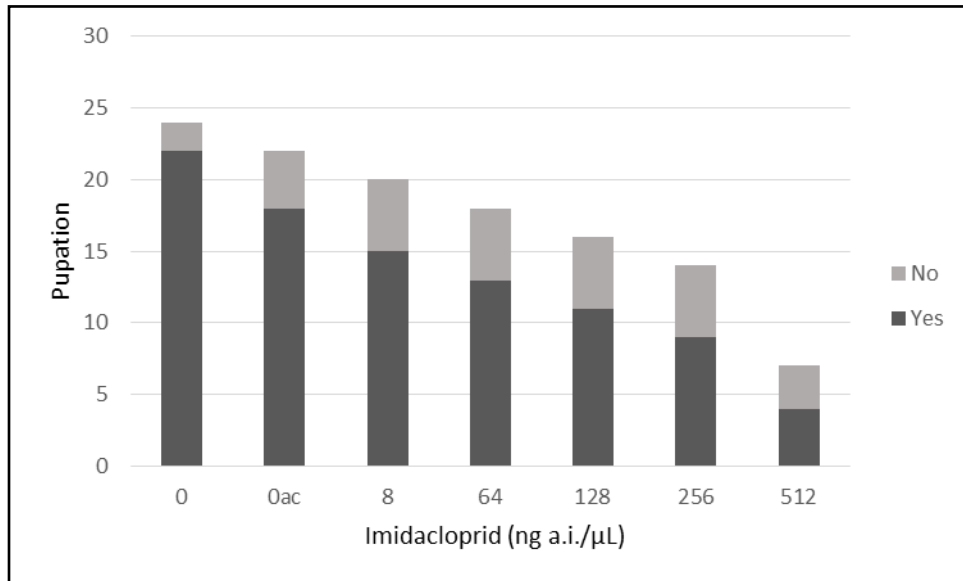
Supplementary data 3: Number of larvae in the process of vertical orientation in the cell cups on the 7th day of the experiment. The asterisks represent p-values <0.05 relative to the control, and 0 ac indicates the group that received the diet with acetone.



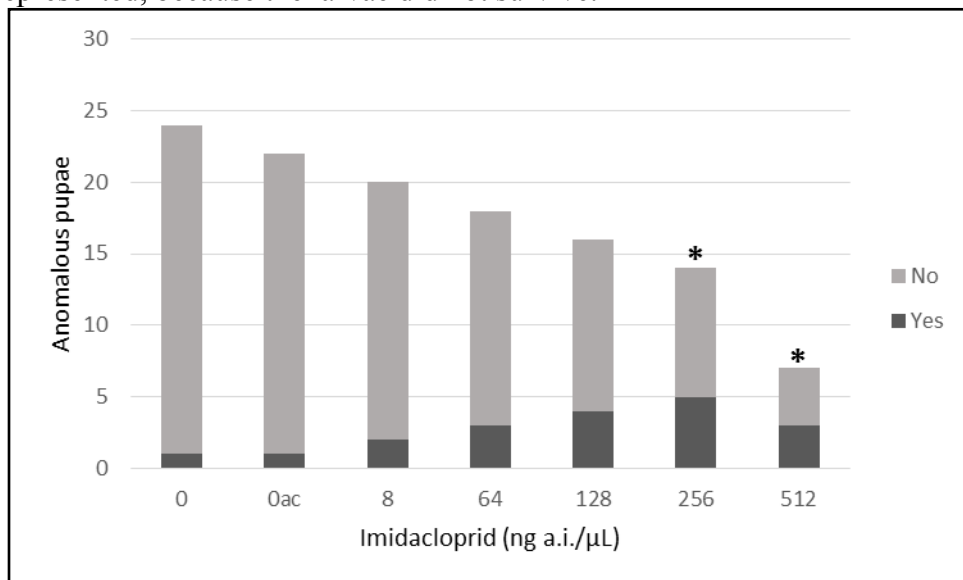
Supplementary data 4: Number of larvae that defecated or did not defecate on the 8th day of the experiment. The asterisks represent p-values <0.05 relative to the control, and 0 ac indicates the group that received the diet with acetone.



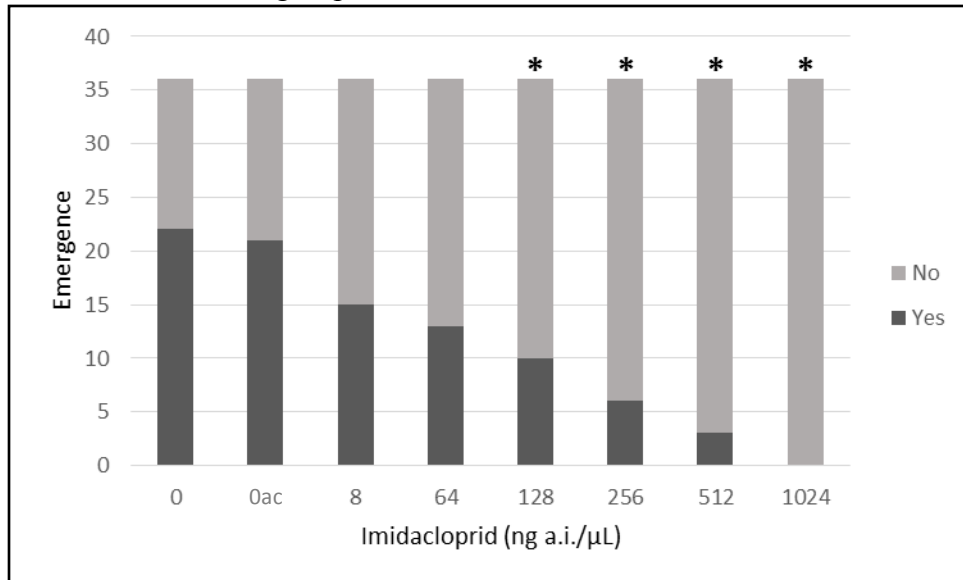
Supplementary data 5: Number of individuals in pupation on the 11th day of the experiment. 0 ac indicates the group that received the diet with acetone. Absence of p-value <0.05. The 1024 ng a.i./ μ L concentration was not represented, because the larvae did not survive.



Supplementary data 6: Number of anomalous pupae (cumulative data from the 9th to 12th day of the experiment). The asterisks represent p-values <0.05 relative to the control, and 0 ac indicates the group that received the diet with acetone. The 1024 ng a.i./ μ L concentration was not represented, because the larvae did not survive.



Supplementary data 7: Number of bees that emerged (cumulative data from the 19th to the 21st day of the experiment). The asterisks represent p-values <0.05 relative to the control, and 0 ac indicates the group that received the diet with acetone.



5. CAPÍTULO 2

Este capítulo foi confeccionado para publicação na **Plos One** e, portanto, está editado conforme as regras da revista.

***Nosema ceranae* e imidacloprido causam estresse e citotoxicidade para abelhas *Apis mellifera* africanizada**

Short title: *Nosema ceranae* e imidacloprido causam estresse e citotoxicidade em *A. mellifera*

Hellen Maria Soares Lima^a; Tatiane Caroline Grella^c; Elaine Cristina Mathias Silva Zacarin^b; Roberta Cornélio Ferreira Nocelli^c; Osmar Malaspina^a.

^a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

^b Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Humanas e Biológicas, Departamento de Biologia, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

^c Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Araras, São Paulo, Brasil.

Resumo

A interação dos agrotóxicos com as doenças tem sido apontada como uma das causas do declínio de abelhas nas matas nativas e nos agroecossistemas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da infecção por *Nosema ceranae* e/ou do imidacloprido na sobrevivência de abelhas operárias de *Apis mellifera* africanizada, além de compreender como esses fatores atuam isolados e em conjunto sobre o intestino médio e túbulos de Malpighi, através da análise morfológica dos órgãos, da imunomarcagem da proteína HSP 70 e da técnica de TUNEL. O tempo letal médio (TL₅₀) foi de aproximadamente 12 dias para o grupo Controle e 10 dias para as abelhas infectadas por *N. ceranae*. As abelhas que foram expostas ao imidacloprido apresentaram TL₅₀ de 11 dias para a concentração de 0,0075 ng imidacloprido/ μ L de dieta (CL₅₀/1000) e 9 de dias para a concentração de 0,075 ng i.a./ μ L (CL₅₀/100). Em conjunto, o microsporídio e o imidacloprido diminuiram ainda mais a sobrevivência das abelhas: 9 dias para o grupo infectado por *N. ceranae* e exposto a 0,0075 ng i.a./ μ L (N+CL₅₀/1000) e 7 dias para o grupo infectado por *N. ceranae* e exposto a 0,075 ng i.a./ μ L (N+CL₅₀/100). A infecção por *N. ceranae*, o imidacloprido e a interação entre os dois provocaram alterações no ventrículo e nos túbulos de Malpighi. Para os túbulos de Malpighi, foi mostrado que a CL₅₀/100 ou a interação do microsporídio com as duas concentrações de inseticida (N+CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/100) provocaram aumento da morte celular com diminuição da imunomarcagem da HSP 70. A N+CL₅₀/100 levou a alterações morfológicas intensas e ocorrência de morte celular no ventrículo das abelhas. O aumento nos níveis teciduais da HSP 70 no ventrículo de abelhas dos grupos CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/1000 protegeu o epitélio da morte celular. A vacuolização do tecido intestinal e os aumentos nos níveis teciduais de HSP 70 e na incidência da quebra de DNA sugerem que as mortes celulares, decorrentes da infecção por *N. ceranae* ou da exposição a CL₅₀/100, seriam macroautofágicas.

Palavras-chave: TUNEL, HSP 70, tempo letal médio, microsporídio, autofagia.

Introdução

As abelhas são importantes insetos polinizadores de plantas nativas e cultivadas devido ao fato de utilizarem os recursos florais, principalmente pólen e néctar, como fonte de alimento [1-2]. Os serviços de polinização são essenciais para a reprodução cruzada e manutenção da diversidade de espécies de plantas, além de aumentarem e melhorarem a produtividade das culturas [3-4].

Estressores múltiplos, tais como patógenos, produtos químicos, fragmentação das áreas florestais, monoculturas e queimadas, prejudicam a sobrevivência das abelhas melíferas e têm reduzido a presença desses insetos benéficos [5-7].

A nosemose, doença causada pelos microsporídios *Nosema apis* e *N. ceranae*, é transmitida pelas vias oral-fecal, principal via, ou oral-oral, pela trofalaxis [8-10]. A infecção das abelhas acontece pela ingestão dos esporos que, no intestino médio, invadem as células epiteliais do hospedeiro através da emissão do tubo polar. No citoplasma da célula hospedeira ocorre a replicação do parasita e a produção de novos esporos que podem danificar o aparelho digestório [8,11].

A infecção por *N. apis* ativa o sistema imune das abelhas por meio do aumento da expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos e outras enzimas relacionadas com a imunidade. A *N. ceranae*, em contrapartida, suprime a resposta imune reduzindo a transcrição de alguns destes genes, como o da abaecina, himenoptaecina e glucose desidrogenase [12].

Trabalhos sugeriram que a susceptibilidade das abelhas ao patógeno *Nosema* sp. ou a severidade da nosemose podem ser alteradas mediante a exposição a agrotóxicos e toxinas [13-16].

A interação entre *N. ceranae*, *N. apis* e o inseticida imidacloprido aumentou a taxa de mortalidade das operárias e enfraqueceu as colônias, por meio da diminuição da atividade da glicose oxidase, enzima relacionada com a imunidade social das abelhas [13].

O imidacloprido é um neonicotinoide que mata o inseto por hiperexcitação e, embora seu alvo seja o sistema nervoso, trabalhos mostraram que a citotoxicidade desse inseticida e do tiametoxam para o intestino e túbulos de Malpighi pode ocasionar comprometimento das funções de absorção/digestão e excreção, respectivamente [17-19].

Resíduos de imidacloprido foram encontrados no pólen (3.3 a 80.2 ppb) e no néctar (0.6 a 39.4 ppb) de diferentes culturas [20-24]. Visto que as abelhas utilizam esses recursos para alimentação, o intestino constitui importante rota de entrada e metabolização do

agrotóxico no organismo. Os túbulos de Malpighi, por sua vez, são responsáveis pela manutenção da homeostase hídrica e eliminação de produtos potencialmente tóxicos circulantes na hemolinfa. [25].

As primeiras respostas de um organismo a estressores patológicos ou ambientais acontecem bioquimicamente, das quais as proteínas de choque térmico (HSPs) representam um mecanismo de defesa celular evolutivamente conservado [26-28]. As HSPs são uma família de proteínas agrupadas de acordo com suas massas moleculares em kDa (HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60 e HSP 40) e que possuem diferentes padrões de indução, expressão e atuação nos processos celulares [29-30]. Em condições adversas, como aumento de temperatura, variação de salinidade, exposição a substâncias químicas, hipóxia, estresse oxidativo, entre outros, as HSPs 70 auxiliam no redobramento de proteínas danificadas pela injúria sofrida ou as destinam a um sistema proteolítico adequado, além de estarem envolvidas na síntese e maturação de novas proteínas [31-32].

As proteínas da família HSP 70 atuam, também, nas vias apoptóticas intrínseca e extrínseca [33]. Na via intrínseca, a HSP 70 impede a liberação de citocromo c e do fator indutor da apoptose (AIF), pois evita a perda do potencial da membrana mitocondrial externa [34]. Uma vez que a citocromo c é liberada no citosol, a HSP 70 atua impedindo a formação do apoptossoma pela inibição da ativação do fator ativador da protease apoptótica-1 (Apaf-1) e das pró-caspases 9, assim como mantém as pró-caspases-3 nas suas formas inativas (AIF) [35]. A HSP 70 pode, ainda, se ligar ao AIF, inibindo a via apoptótica independente de caspases [36].

Na via extrínseca da apoptose, a HSP 70 impede a ativação das proteínas Bid e JNK (Kinase c-Jun N-terminal), envolvidas na cascata iniciada nos receptores de morte, fator de necrose tumoral (TNF), presentes na membrana celular [37-38]. Além disso, a HSP 70 está envolvida no balanço de outras proteínas anti e pró apoptóticas, como Bax e Bcl-2 [33,39].

A apoptose possui características celulares marcantes, tais como a retração celular, condensação da cromatina e fragmentação internucleossômica do DNA [40]. O método de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) permite a visualização da fragmentação do DNA no núcleo de células em morte. Quando as endonucleases quebram o DNA, os terminais 3'OH são identificados pela enzima desoxinucleotidil transferase terminal (TdT), que catalisa a adição de nucleotídeos (dUTPs) marcados com cor ou fluorescência nessas extremidades livres [41]. Como a fragmentação de DNA é comum em diferentes tipos de morte celular, apoptose, necrose e macroautofagia, sua

detecção pelo método de TUNEL não pode ser considerado um marcador específico de apoptose, mas sim de morte celular de forma geral [42].

Assim sendo, os objetivos desse trabalho foram: (1) avaliar os efeitos isolados e conjuntos da infecção por *N. ceranae* e/ou da exposição ao inseticida imidacloprido na sobrevivência de abelhas *A. mellifera* africanizada; (2) identificar as possíveis alterações morfofisiológicas causadas por esses dois estressores sobre o intestino médio e túbulos de Malpighi das abelhas, por meio de análise morfológica e histopatológica (coloração com hematoxilina e eosina e marcação da actina-F e do núcleo), de imunomarcações de proteínas de estresse celular da família HSP70 e de morte celular por fragmentação do DNA (método de TUNEL).

Materiais e Métodos

Obtenção e manutenção das abelhas

Favos de cria operculados, provenientes de três colônias não parentais, foram coletados no apiário do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da UNESP, campus de Rio Claro, e transferidos para estufa de demanda bioquímica de oxigênio (32 ± 2 °C, 70% de umidade relativa) para monitoramento da emergência das abelhas. Abelhas, da espécie *A. mellifera* africanizada, saudáveis e livres de *Nosema* sp., com 1 dia de idade, passaram pelo bioensaio de infecção por *N. ceranae* e/ou exposição ao imidacloprido.

Infecção por *N. ceranae* e exposição ao imidacloprido

Os esporos de *N. ceranae* foram isolados e a identificação molecular da espécie dos mesmos foi confirmada [43]. Foi preparada uma solução de açúcar invertido a 50% (v:v) contendo cerca de 30.000 esporos/ μ L, cuja concentração foi determinada por câmara de Neubauer.

Foi oferecida às abelhas recém-emergidas uma gota contendo 2 μ L de solução de sacarose com ou sem esporos de *N. ceranae*. A quantidade de 60.000 esporos/abelha foi relatada como a menor concentração capaz de provocar infecção [44].

Posteriormente, essas abelhas foram acondicionadas em potes plásticos descartáveis de 250 mL (gaiolas experimentais), previamente furados e forrados com papel-filtro, e mantidas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (32 ± 1 °C e umidade relativa de 70%).

O inseticida imidacloprido (Sigma-Aldrich) foi solubilizado em acetona e água e, posteriormente, sucessivas diluições foram realizadas no alimento (açúcar invertido e água 1:1, v:v) para atingir as concentrações oferecidas às abelhas: o valor da concentração letal

média (CL₅₀) [45], dividido por cem (CL₅₀/100 correspondente a 0,075 ng de imidacloprido/ μ L de dieta) e a concentração letal média dividida por mil (CL₅₀/1000 correspondente a 0,0075 ng de imidacloprido/ μ L de dieta).

As concentrações subletais do inseticida imidacloprido, diluídas no alimento, foram oferecidas *ad libitum* às abelhas, durante todo o período do experimento. O alimento ficou disponível nas gaiolas experimentais por meio de um microtubo plástico de 1,5 mL, furado e fixado na tampa das gaiolas. As abelhas do grupo Controle e do grupo apenas infectado com *N. ceranae* receberam alimento sem inseticida.

Dessa forma, este trabalho contou com os seguintes grupos experimentais: Controle (abelhas não infectadas com esporos de *N. ceranae* e não expostas ao imidacloprido); Nosema (abelhas infectadas com esporos de *N. ceranae*); CL₅₀/1000 (abelhas expostas a 0,0075 ng i.a./ μ L); N+CL₅₀/1000 (abelhas infectadas com esporos de *N. ceranae* e expostas a 0,0075 ng i.a./ μ L); CL₅₀/100 (abelhas expostas a 0,075 ng i.a./ μ L) e N+CL₅₀/100 (abelhas infectadas com esporos de *N. ceranae* e expostas a 0,075 ng i.a./ μ L).

Tempo letal médio (TL₅₀)

Em cada bioensaio de estabelecimento do tempo letal médio (TL₅₀) foram montados quatro repetições de cada grupo experimental, sendo que cada repetição foi composta de 30 abelhas por gaiola. Os bioensaios de sobrevivência foram realizados três vezes. O início do bioensaio se deu quando as abelhas, após receberem a gota contendo ou não esporos do microsporídio, foram acondicionadas nas gaiolas experimentais, as quais estavam providas do alimento contendo ou não as concentrações subletais do inseticida.

A mortalidade das abelhas foi aferida a cada 24 horas, até a morte do último indivíduo, e os dados foram analisados com auxílio do software SigmaPlot 13 [46]. Foi realizado o teste Log-Rank para comparar as curvas de sobrevivência de cada grupo experimental (método de Kaplan-Meier). A identificação das diferenças estatísticas significativas entre os grupos foi feita pelo teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak.

Contagem de esporos

Um dia, 6 dias e 12 dias após o início dos bioensaios, 30 abelhas de cada grupo experimental foram anestesiadas por resfriamento e tiveram seus abdomens macerados para contagem, em câmara de Neubauer, do número de esporos de *N. ceranae*. Os tempos foram baseados na TL₅₀ estabelecida para o grupo Controle.

Microscopias de luz de campo claro e confocal de varredura a laser

As abelhas infectadas por *N. ceranae* e/ou expostas ao imidacloprido, assim como as do grupo Controle, foram coletadas 1 dia, 6 dias e 12 dias após início dos bioensaios. Após isso, as abelhas dos diferentes grupos experimentais foram anestesiadas por resfriamento e seus intestinos médios e túbulos de Malpighi dissecados. Os órgãos obtidos de 9 indivíduos de cada grupo experimental foram processados para realização da técnica de hematoxilina e eosina (histopatologia), 9 foram destinados a marcação da actina-F e nuclear, 9 foram submetidos à imunomarcação da HSP 70 e outros 9 passaram pelo método de TUNEL.

Para a realização da microscopia de luz de campo claro, os órgãos foram fixados em paraformaldeído 4% e desidratados em uma série crescente de álcoois (15% a 95%) [47]. Posteriormente, o material foi transferido para a resina de embebição e incluídos em historesina (Leica). Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo (Leica), com espessura de 6 µm, e colocados sobre lâminas.

Para a realização da microscopia confocal à laser, os materiais foram fixados em paraformaldeído 4% e posteriormente lavados em tampão PBS (tampão fosfato salino pH 7,4). Os órgãos foram emblocados em agarose (Agarose IITM, Amresco) para a obtenção de cortes com 100 µm de espessura em vibrátomo (Leica VT1000S).

Hematoxilina e Eosina (HE)

As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris por 10 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos e, a seguir, submetidas a uma solução aquosa de Eosina por 5 minutos. Após uma nova lavagem em água corrente, as lâminas foram secas, montadas em DPX.

As fotomicrografias foram adquiridas no Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP de Rio Claro-SP, por meio de uma camera digital, Olympus DP-71, acoplada um microscópio, Olympus BX51. Para a aquisição das imagens, foi utilizado o software DP Controller.

Para cada um dos 9 indivíduos foram escolhidos 6 cortes não sequenciais, dos quais foram fotografados 3 regiões do intestino médio (aumento de 400x). De cada corte escolhido foram fotografados, ainda, 3 túbulos de Malpighi na região mediana.

Baseados nos trabalhos [48] e [49] e fazendo as devidas adaptações para os órgãos das abelhas, foram realizadas análises semi-quantitativas nas imagens adquiridas.

O grau de importância atribuído para cada alteração morfológica encontrada, no presente trabalho, foi determinado com base no impacto que a mesma ocasiona na função do

órgão bem como, na possibilidade de sua reversão: secreção apócrina e eliminação celular para o lúmen (grau 1); desorganização e/ou degeneração do epitélio (grau 2); e alterações nas características nucleares das células digestórias (grau 3).

Na sequência, o grau de importância foi multiplicado pela frequência da ocorrência de cada alteração, sendo (0) não ocorrência; (2) ocorrência leve; (4) ocorrência moderada e (6) ocorrência acentuada.

Para cada alteração morfológica, os conjuntos de valores obtidos nas imagens foram comparados, estatisticamente, entre os grupos experimentais.

Visando estimar o dano morfológico geral causado por determinada concentração do imidacloprido e/ou pelo microsporídio, também se analisou a combinação de todos conjuntos de valores das alterações.

Os resultados expressaram em porcentagem, para cada grupo experimental, a relação entre o dano morfológico geral observado e o maior valor total de dano morfológico geral possível de se alcançar. O maior dano morfológico geral possível de se alcançar corresponde à multiplicação do grau de importância com o maior valor de frequência de ocorrência (6). Determinou-se ainda a proporção das alterações morfológicas que compõem o dano morfológico geral.

Marcação da actina-F e do núcleo

Para a marcação da actina-F, os cortes foram permeabilizados com 0,2% de Triton X-100 (Sigma) e posteriormente lavados em PBS. Os cortes foram, então, incubados por 30 minutos com faloidina conjugada com Alexa 488 (Molecular Probes), soro normal de cabra (Vector) e PBS. Os núcleos foram marcados com DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol, Molecular Probes) e as lâminas montadas utilizando o Prolong® Diamond Antifade (Molecular Probes).

Imunomarcação da proteína HSP 70

Para a imunomarcação da HSP 70, os cortes foram primeiramente submetidos à recuperação antigênica, utilizando tampão citrato de sódio (0,1M e pH=6). Os cortes foram, então, incubados com 0,5% de Triton X-100 (Sigma) por 10 min e, posteriormente, com 3% de albumina sérica bovina (Sigma) por 30 minutos. Após 3 lavagens no tampão PBS, os cortes foram incubados no anticorpo primário monoclonal anti-HSP 70 produzido em rato (1:100, Invitrogen) por 1 hora, ausência de luz, 37 °C e em câmara úmida. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados em PBS e o anticorpo secundário IgG de cabra produzido em rato conjugado com CY5 (1:500, Molecular Probes) foi usado na

incubação das secções dos órgãos durante 1 hora. Finalmente, depois de lavagem em PBS, as lâminas foram montadas utilizando o Prolong® Diamond Antifade (Molecular Probes).

Com o objetivo de comprovar a imunomarcção da HSP 70 entre os grupos, foram realizados dois controles negativos da reação para cada um dos órgãos, utilizando os mesmos procedimentos acima descritos, exceto, que no primeiro os cortes não foram incubados com anticorpo primário, e no segundo não foram incubados com o anticorpo secundário.

Método de TUNEL

Para marcação de TUNEL, os cortes foram incubados com solução de proteinase K (20 µg/mL em 10 Mm Tris-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, lavados em PBS e, posteriormente, tratados de acordo com o protocolo do Kit AP “In Situ Cell Death Detection” (Roche). As lâminas foram então montadas com Prolong® Diamond Antifade (Molecular Probes).

Foram realizados controles positivos da técnica para os dois órgãos avaliados, nos quais foi adicionado DNase (Invitrogen) para realizar a quebra do DNA e validar a reação de TUNEL do kit.

Aquisição das imagens e quantificação

As marcações da actina-F e do núcleo, da HSP 70 e do TUNEL foram visualizadas no Centro de Microscopia e Imagem da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-FOP/UNICAMP, por meio de um microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SP5) e para a aquisição das imagens foi utilizado o software Leica Application Suite-AF

Foram feitas secções ópticas de 35 µm de espessura, com intervalo de 1 µm, sob aumento de 400x e os materiais foram fotografados com os seguintes parâmetros: faloidina (laser Argônio=10%, λ =488 nm, Gain=957.0 V, Offset=-1.9%, Pinhole=53.64 µm), DAPI (laser diodo=10%, λ =405 nm, Gain=730.0 V, Offset=-1.0%, Pinhole=67.90 µm), HSP 70 (laser HeNe=14%, λ =633 nm, Gain=914.0 V, Offset=-1.9%, Pinhole=67,90 µm), TUNEL (laser Argônio=10%, λ =488 nm, Gain=878.0 V, Offset=-1.0%, Pinhole=67.90 µm).

As marcações da actina-F e do núcleo foram realizadas com o objetivo de avaliar a citoarquitetura do órgão nos diferentes grupos experimentais. Portanto, essa marcação não foi quantificada.

A quantificação da imunomarcção de HSP 70 e da marcação de TUNEL nas imagens adquiridas foi feita com auxílio do software Leica Application Suite-AF. Para cada indivíduo de cada uma das técnicas, 3 regiões do intestino médio e 3 túbulos de Malpighi foram analisados quantitativamente. Cada região do intestino e cada túbulo de Malpighi foi dividida

em três áreas circulares de 100 e 50 μm de diâmetro, respectivamente, nos quais a intensidade de fluorescência emitida foi mensurada em escala de cinza.

Análises estatísticas

As comparações estatísticas entre os resultados obtidos pela técnica de HE e das intensidades de fluorescência mensuradas nas técnicas de HSP 70 e TUNEL para os diferentes grupos experimentais foram efetuadas, utilizando o programa SigmaPlot 13 [46] análise de variância ANOVA one way, Kruskal-Wallis; Dunn.

Resultados

Tempo letal médio (TL₅₀)

O tempo letal médio (TL₅₀) corresponde ao período em que a exposição a determinado composto leva para ocasionar 50% de morte do grupo amostral. Os resultados de TL₅₀ foram de, aproximadamente, de 12 dias (280,97 horas) para o grupo Controle, 10 dias (234,09 horas) para o grupo Nosema, 11 dias (268,60 horas) para o grupo CL₅₀/1000, 9 dias (212,35 horas) para o grupo N+CL₅₀/1000, 9 dias (217,92 horas) para o grupo CL₅₀/100 e 7 dias (177,48 horas) para o grupo N+CL₅₀/100 (Tabela 1 e S1 Fig).

Pela análise estatística das curvas de sobrevivência, todos os grupos experimentais apresentaram diferenças significativas quando comparados ao Controle (Tabela 1 e S1 Fig).

A sobrevivência das abelhas infectadas apenas por *N. ceranae* (grupo Nosema) foi semelhante, estatisticamente, àquelas que, além dos esporos, foram expostas a concentração subletal mais baixa do inseticida (grupo N+CL₅₀/1000) (Tabela 1 e S1 Fig).

A CL₅₀/1000, por sua vez, diferiu do grupo N+CL₅₀/1000 (Tabela 1 e S1 Fig).

As duas concentrações do imidacloprido diferiram entre si quanto a mortalidade das abelhas, sendo que a menor concentração levou a um maior tempo de sobrevivência (Tabela 1 e S1 Fig).

Tabela 1: Valores do tempo letal médio das abelhas *A. mellifera* africanizada.

Grupo	TL₅₀ (horas)	IC_{95%}	Representação estatística
Controle	280,976	263,164 – 298,787	A
Nosema	234,095	218,975 – 249,216	B
CL ₅₀ /1000	268,601	259,942 – 277,259	C
N+CL ₅₀ /1000	212,352	194,574 – 230,130	BD
CL ₅₀ /100	217,923	210,362 – 225,484	DE
N+CL ₅₀ /100	177,484	160,056 – 194,912	E

(TL₅₀) tempo letal médio e (IC_{95%}) intervalo de confiança 95%. As letras da coluna denominada representação estatística mostram a comparação entre os dados de sobrevivência dos diferentes grupos experimentais, sendo que letras diferentes indicam significância $p \leq 0,05$ (Holm-Sidak).

Contagem de esporos

Os grupos que não foram infectados com o microsporídio, não apresentaram esporos nos tempos avaliados.

No primeiro dia de análise foram encontrados cerca de 25.000 esporos no abdômen das abelhas pertencentes aos três grupos experimentais que foram infectados com *N. ceranae*. No sexto dia, as abelhas do grupo Nosema, N+CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/100 apresentaram 60.000, 325.000 e 125.000 esporos, no entanto, 12 dias após a infecção das abelhas, a contagem de esporos foi de 3.700.000, 3.287.500 e 3.825.000, respectivamente.

As Figs 1G-H e 3C mostram os esporos de *N. ceranae* nas células do intestino médio das abelhas, comprovando a infecção pelos mesmos.

Alterações morfológicas

Intestino Médio

As Figs 1A-B e 3A mostram intestinos médios do grupo Controle, os quais apresentaram características morfológicas típicas [50].

No primeiro dia, os danos morfológicos gerais do grupo infectado com *N. ceranae* (Nosema) e do grupo CL₅₀/100 foram significativamente maiores do que o grupo Controle. O grupo Nosema apresentou, ainda, aumento significativo na desorganização epitelial em comparação com o grupo Controle (Fig 2I e S1 Tabela).

A desorganização epitelial foi caracterizada pela modificação da citoarquitetura tecidual do epitélio e, na maioria das vezes, foram encontradas células vacuolizadas ou rompidas (Figs 1C-H).

Nos 6º e 12º dias, houve aumento significativo nos danos morfológicos gerais de todos os grupos experimentais, em relação ao Controle (Figs 2II-III e S1 Tabela).

Houve intensificação da secreção apócrina nos epitélios ventriculares dos grupos Nosema, CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100 em comparação como o Controle, 6 dias após o início do bioensaio. Neste mesmo dia, os grupos Nosema, CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/100 em comparação com o Controle, apresentaram, ainda, aumento significativo na desorganização do epitélio intestinal e nas alterações nucleares (Fig 2II e S1 Tabela).

As alterações nucleares encontradas foram picnose com formação de halos pericromatínicos, perda do formato arredondado e aumento de tamanho sem picnose (Figs 1C e E-G).

O grupo N+CL₅₀/100 diferiu do Controle no sexto dia também devido ao aumento significativo do número de eliminações de células ao lúmen (Fig 2II e S1 Tabela).

Todos os grupos experimentais apresentaram aumento de secreção apócrina quando seus epitélios foram comparados ao epitélio do grupo Controle, 12 dias após o início do bioensaio (Fig 1E, Fig 2III e S1 Tabela).

Os grupos Nosema, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100, aos 12 dias, apresentaram aumento no número de células eliminadas para o lúmen e de núcleos alterados (Fig 2III, Fig 3B e S1 Tabela). Para a alteração desorganização epitelial, apenas os grupos Nosema e CL₅₀/100 foram estatisticamente diferentes do grupo Controle, com aumento dessa alteração morfológica, 12 dias após o início do bioensaio (Fig 2III e S1 Tabela).

Túbulos de Malpighi

Não foram observadas alterações morfológicas nos túbulos de Malpighi dos diferentes grupos experimentais para os três momentos analisados (Figs 5A-E e S2 Tabela).

Imunomarcção da HSP 70

O padrão da imunomarcção da HSP 70 nas células do intestino médio e nos túbulos de Malpighi pode ser visualizado na Fig 3D-F e na Fig 5F-H, respectivamente.

Intestino Médio

No primeiro dia e em comparação com o Controle, a intensidade na imunomarcção da HSP 70 aumentou significativamente para os grupos que foram simultaneamente infectados por *N. ceranae* e expostos ao imidacloprido nas duas concentrações (N+CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/100) (Fig 4I e S1 Tabela).

Seis dias após o início do bioensaio, o grupo exposto a menor concentração do imidacloprido ($CL_{50}/1000$) apresentou aumento significativo na intensidade de imunomarcação da HSP 70, enquanto que no grupo $N+CL_{50}/1000$ houve diminuição da intensidade da imunomarcação dessa proteína, sendo ambas as comparações feitas com o Controle (Fig 4II e S1 Tabela).

Aos 12 dias, apenas nos grupos $N+CL_{50}/1000$ e $N+CL_{50}/100$ a intensidade da imunomarcação da HSP 70 foi semelhante ao grupo Controle, enquanto nos demais grupos experimentais (Nosema, $CL_{50}/1000$ e $CL_{50}/100$) essa imunomarcação aumentou (Fig 4 III e S1 Tabela).

Túbulos de Malpighi

Em 1 dia de análise os grupos experimentais não diferiram estatisticamente quanto a intensidade da imunomarcação da HSP 70 (Fig 6I e S2 Tabela).

No 6º dia, os grupos experimentais $N+CL_{50}/1000$, $CL_{50}/100$ e $N+CL_{50}/100$ apresentaram diminuição significativa na intensidade da imunomarcação da HSP 70 em comparação com o grupo Controle (Fig 6II e S2 Fig). Enquanto que aos 12 dias, a diminuição foi observada apenas nos grupos $CL_{50}/100$ e $N+CL_{50}/100$ (Fig 6III e S2 Tabela).

Marcação de TUNEL

A marcação pela técnica de TUNEL está exemplificada na Fig 3G-H para o intestino médio e na Fig 5I-K para os túbulos de Malpighi, respectivamente.

Intestino Médio

Os grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas na intensidade de marcação de núcleos com quebra de DNA, no primeiro dia avaliado (Fig 4IV e S1 Tabela)

O grupo que foi infectado com esporos de *N. ceranae* (Nosema) apresentou aumento na intensidade de marcação de TUNEL, no 6º e 12º dias, em comparação com Controle (Fig 4V-VI e S1 Tabela).

Aos 6 dias, os grupos $N+CL_{50}/1000$, $CL_{50}/100$ apresentaram aumento na intensidade de marcação de TUNEL em relação ao grupo Controle (Fig 4V e S1 Tabela). Enquanto que aos 12 dias, os grupos que tiveram aumento na marcação de núcleos com quebra de DNA foram $CL_{50}/100$ e $N+CL_{50}/100$, em comparação com o Controle (Fig 4VI e S1 Tabela).

Túbulos de Malpighi

O grupo experimental simultaneamente infectado por *N. ceranae* e exposto ao imidacloprido na maior concentração (N+CL₅₀/100) apresentou aumento significativo na intensidade de marcação de núcleos com quebra de DNA quando comparado ao grupo Controle, em todos os tempos de análise (Fig 6IV-VI e S2 Tabela).

Seis e 12 dias após o início do bioensaio, a intensidade de marcação de TUNEL aumentou significativamente nos grupos N+CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100 em relação ao Controle (Fig 6V-VI e S2 Tabela).

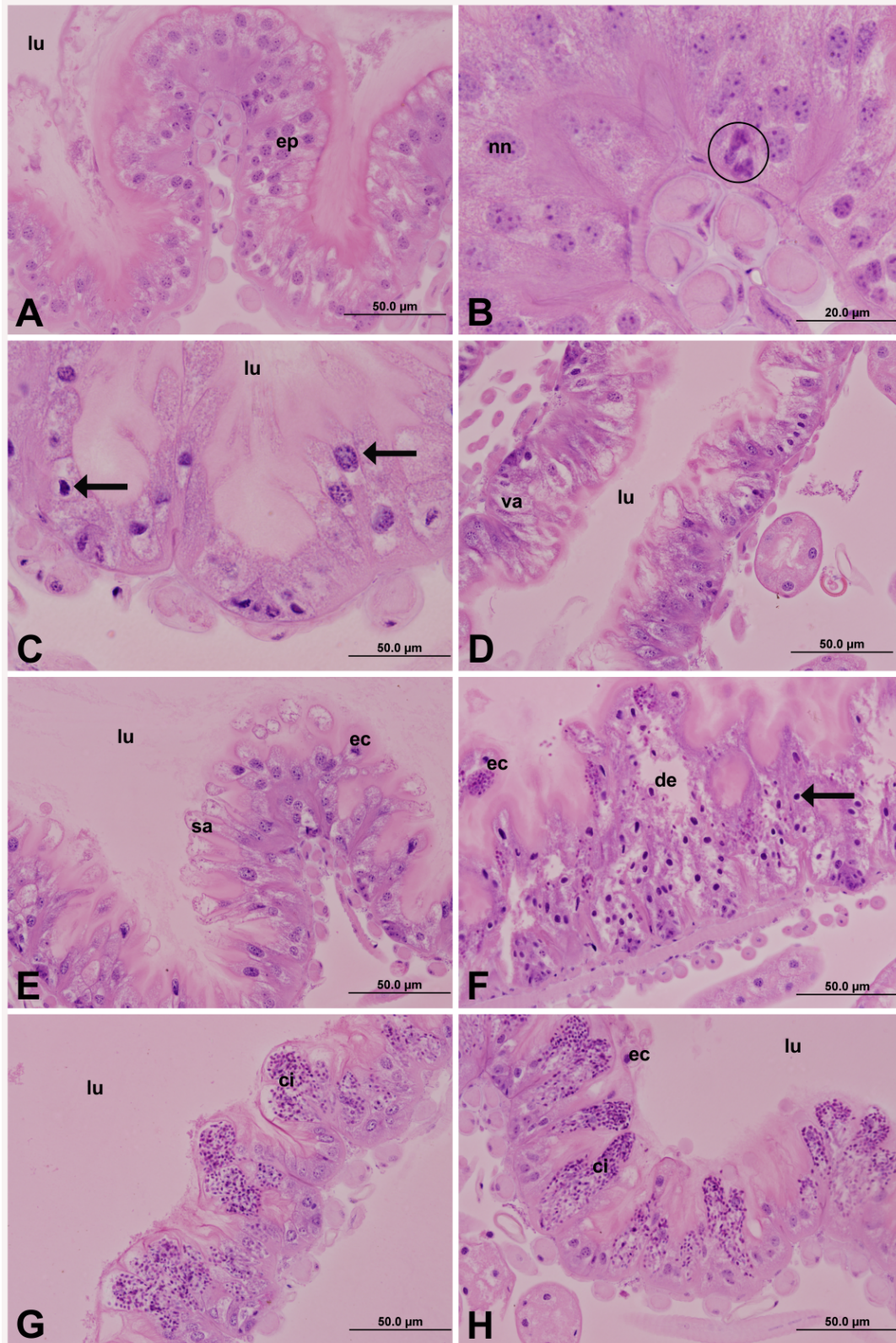


Fig 1. Ventriculos de abelhas *A. mellifera* africanizada corados com hematoxilina e eosina.

(A-B) Controle 12 dias, (C) CL₅₀/100 12 dias, (D-E) *Nosema* 6 dias, (F) N+CL₅₀/100 6 dias, (G) *Nosema* 12 dias e (H) N+CL₅₀/100 12 dias. As siglas indicam: lu-lúmen, ep-epitélio, nn-núcleo não alterado, ec- eliminação celular ao lúmen, sa- secreção apócrina, va- vacuolização, de-desorganização ou degeneração epitelial e ci- célula infectada. O círculo evidencia um ninho de células regenerativas e as setas mostram alterações nucleares.

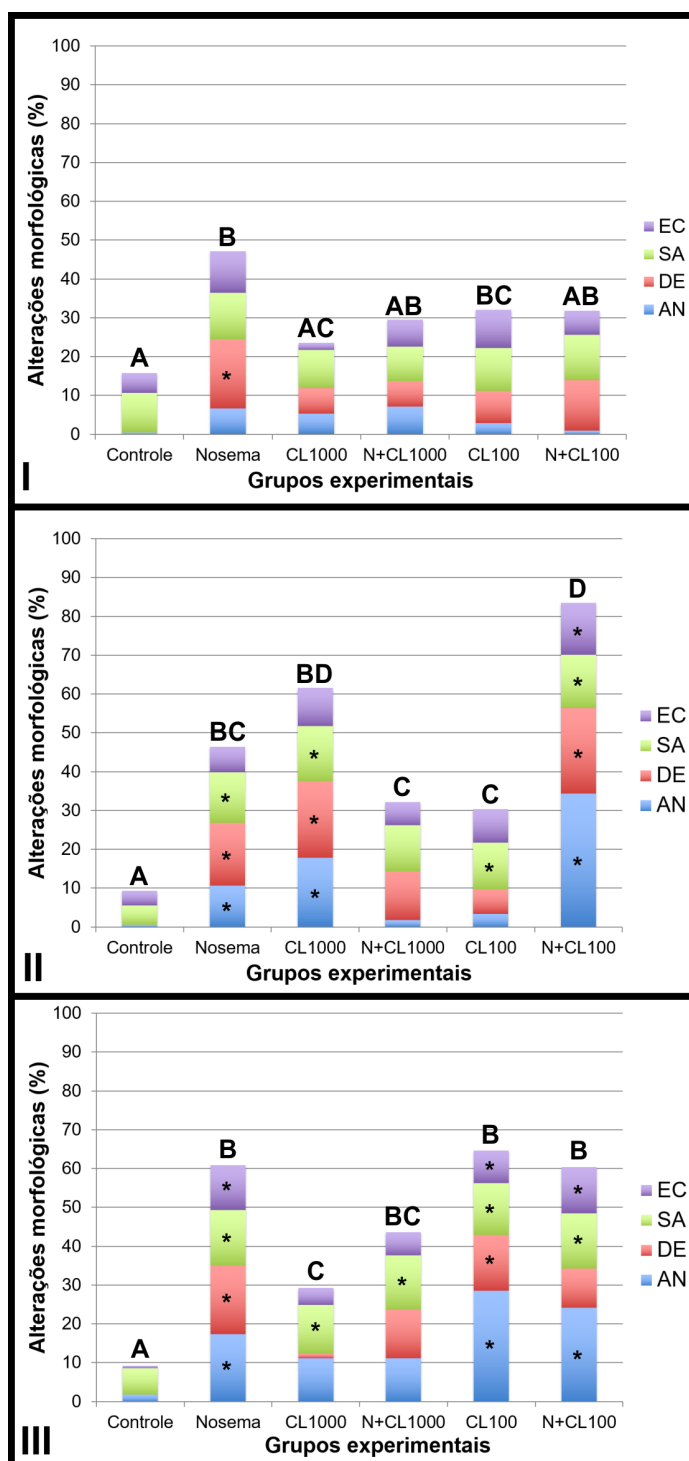


Fig 2. Danos morfológicos gerais no intestino médio de abelhas *A. mellifera* africanizada. As análises foram realizadas com 1(I), 6(II) e 12(III) dias de bioensaio. As letras acima das barras representam os resultados estatísticos das comparações entre os danos morfológicos gerais (estatística realizada considerando-se todas as alterações morfológicas de um determinado grupo em comparação com outro), sendo que letras diferentes indicam significância $p < 0,05$ (Kruskall-Wallis, Dunn). Os asteriscos indicam a alteração morfológica específica que foi estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$ Kruskall-Wallis, Dunn), são elas: (EC) eliminação de células para o lúmen, (SA) secreção apócrina, (DE) desorganização ou degeneração epitelial, (AN) alterações nucleares. As siglas CL1000, N+CL1000, CL100 e N+CL100 correspondem, respectivamente, aos grupos CL₅₀/1000, N+CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100.

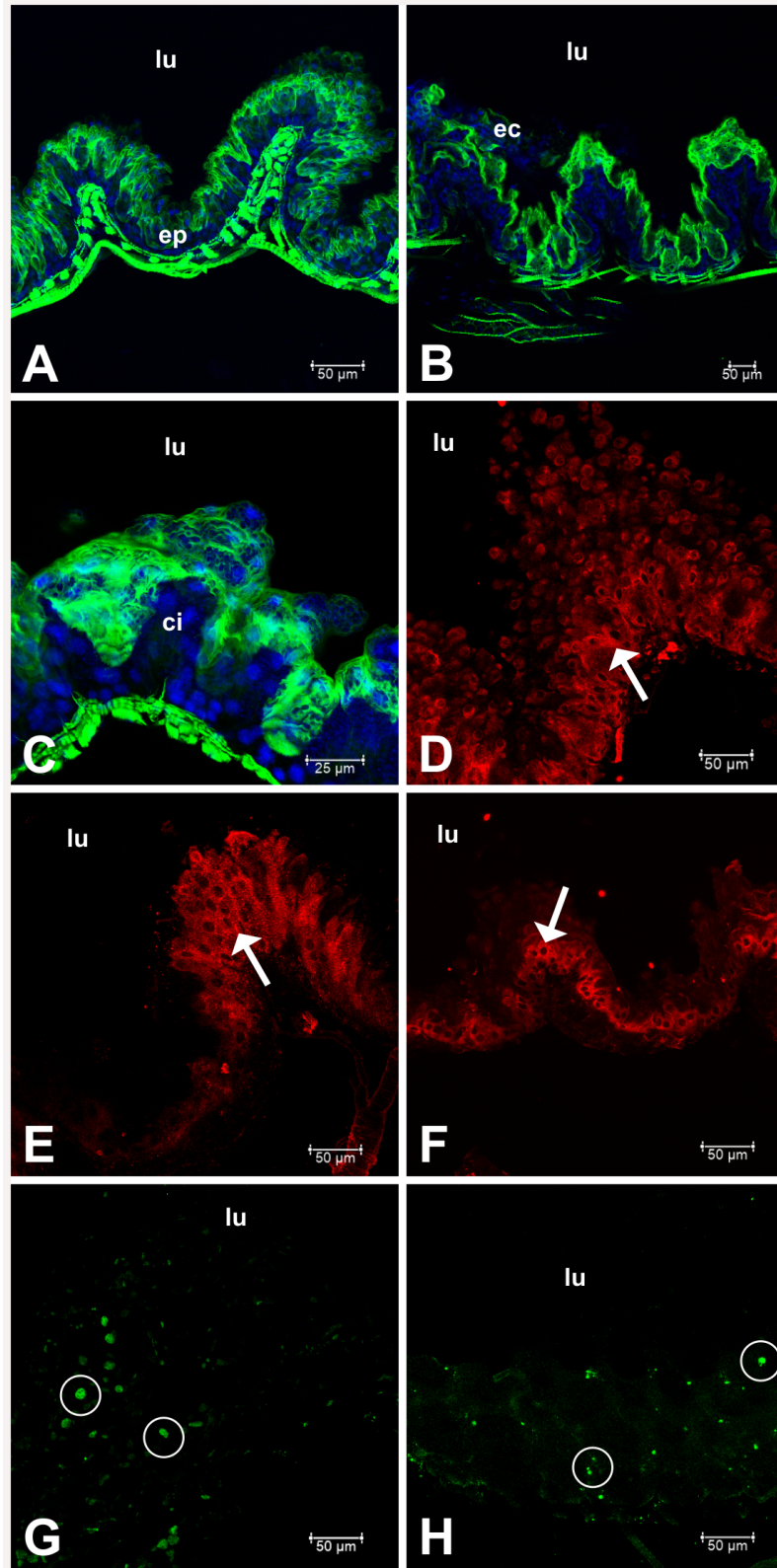


Fig 3. Intestino médio de abelhas *A. mellifera* africanizada.

Marcação com Faloidina e DAPI (A-C), imunomarcção com HSP 70 (D-F) e método de TUNEL (G-H). (A) Controle 12 dias, (B) CL₅₀/100 12 dias, (C) Nosema 12 dias, (D) Nosema 6 dias, (E) CL₅₀/100 1 dia, (F) CL₅₀/1000 6 dias, (G) Nosema 6 dias e (H) Nosema 12 dias. As siglas indicam: lu-lúmen, ep-epitélio, ec-eliminação celular ao lúmen e ci-célula infectada. As setas mostram a imunomarcção positiva para HSP 70 e os círculos marcação pela técnica de TUNEL.

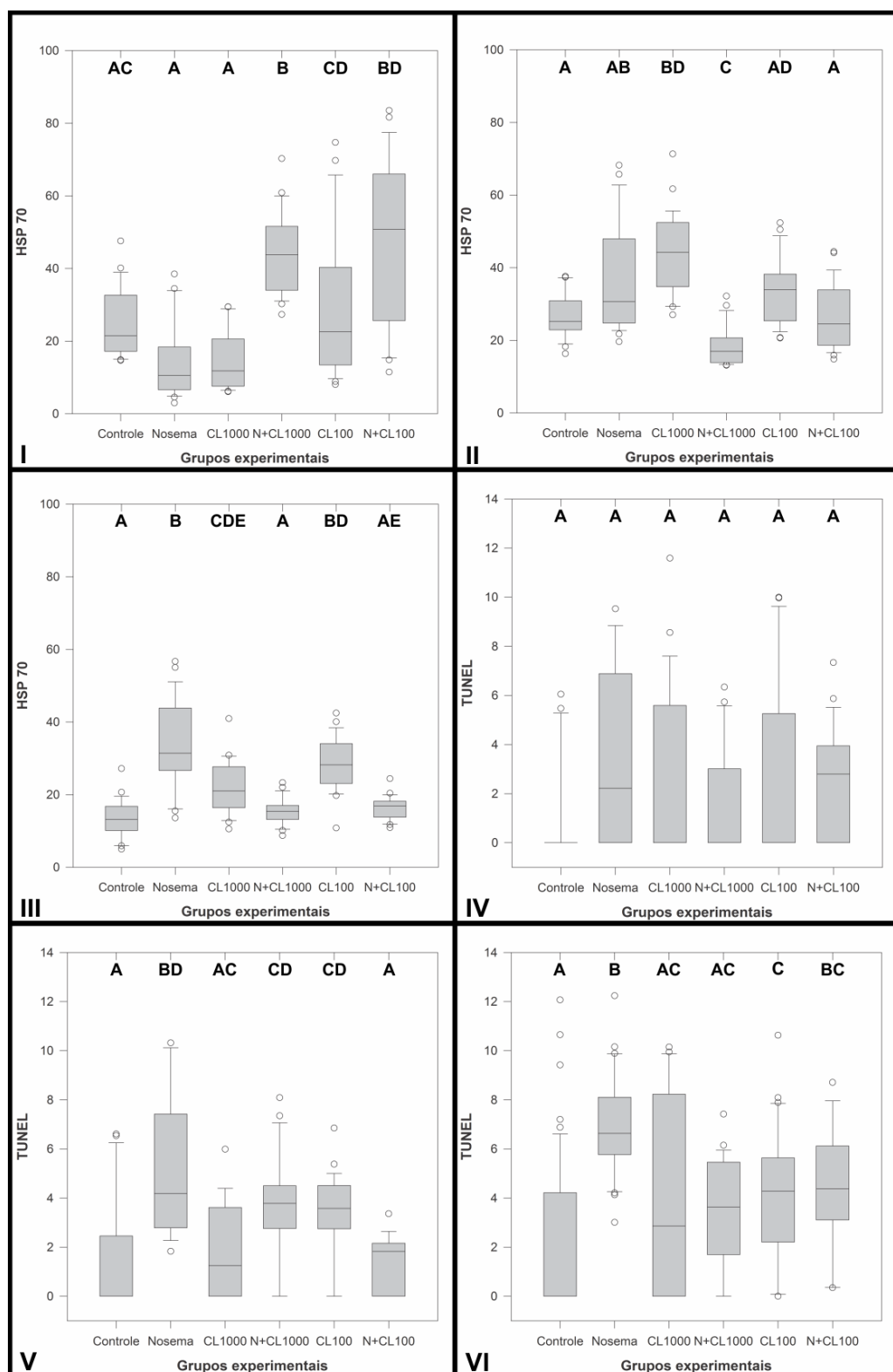


Fig 4. Intensidades da imunomarcagem da proteína HSP 70 e da marcação pela técnica de TUNEL no intestino médio de abelhas *A. mellifera* africanizada.

As análises foram realizadas com 1 dia (I e IV), 6 dias (II e V) e 12 dias (III e VI) de bioensaio. As letras no topo dos gráficos representam os resultados estatísticos das comparações entre os grupos experimentais, sendo que letras diferentes indicam significância $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, Dunn). As siglas CL1000, N+CL1000, CL100 e N+CL100 correspondem, respectivamente, aos grupos CL₅₀/1000, N+CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100.

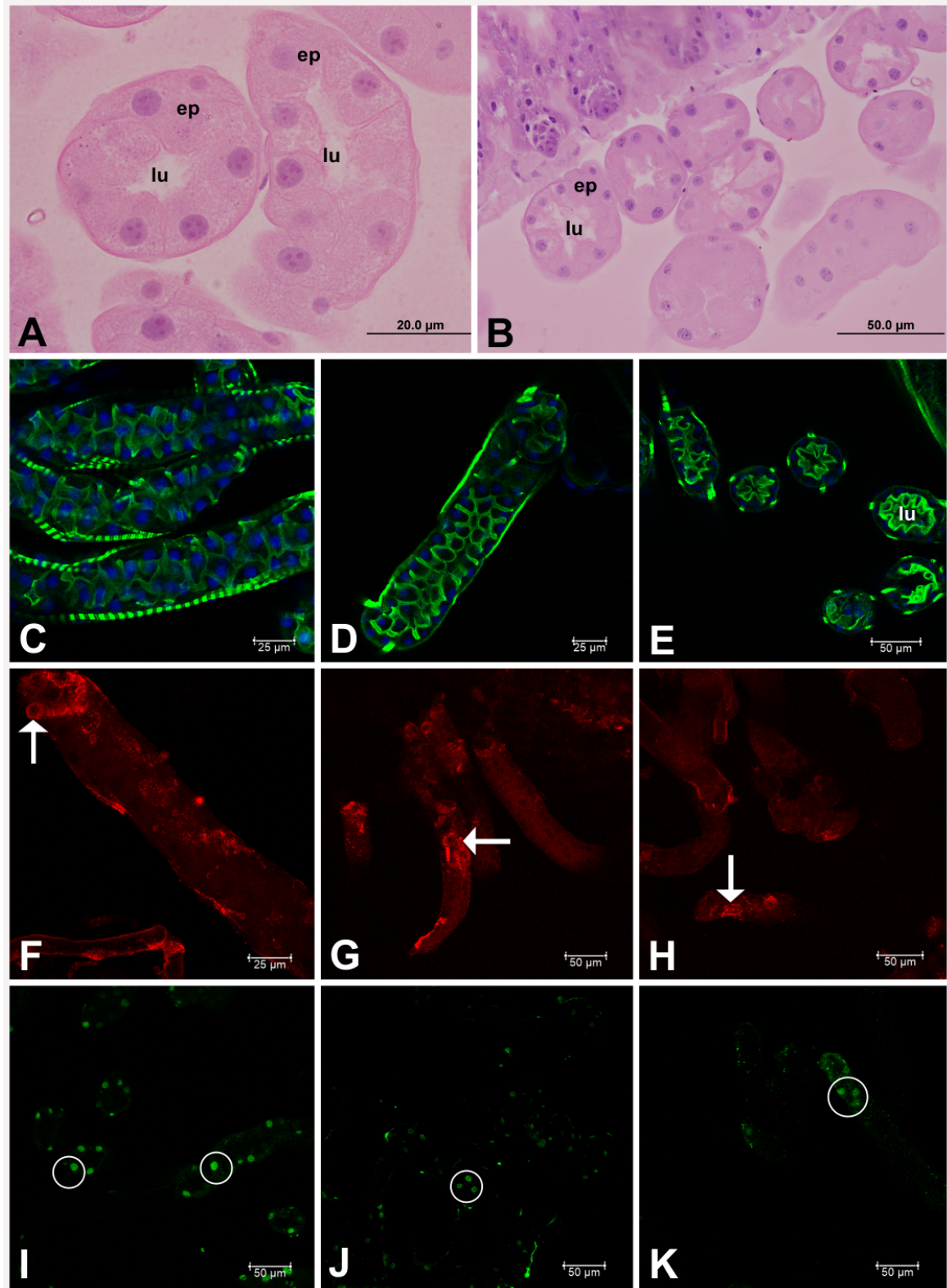


Fig 5. Túbulos de Malpighi de abelhas *A. mellifera* africanizada.

Coloração com hematoxilina e eosina (A-B), marcação com faloidina e DAPI (C-E), imunomarcação da HSP 70 (F-H) e método de TUNEL (I-K). (A) Controle 1 dia, (B) CL₅₀/1000 6 dias, (C-D) CL₅₀/100 6 dias, (E) CL₅₀/1000 1 dia, (F) CL₅₀/100 6 dias, (G-H) N+CL₅₀/100 1 dia, (I) CL₅₀/1000 6 dias, (J) N+CL₅₀/100 6 dias, (K) CL₅₀/100 6 dias. As siglas indicam: lu-lúmen e ep-epitélio. As setas mostram a imunomarcação positiva para HSP 70 e os círculos marcação pela técnica de TUNEL.

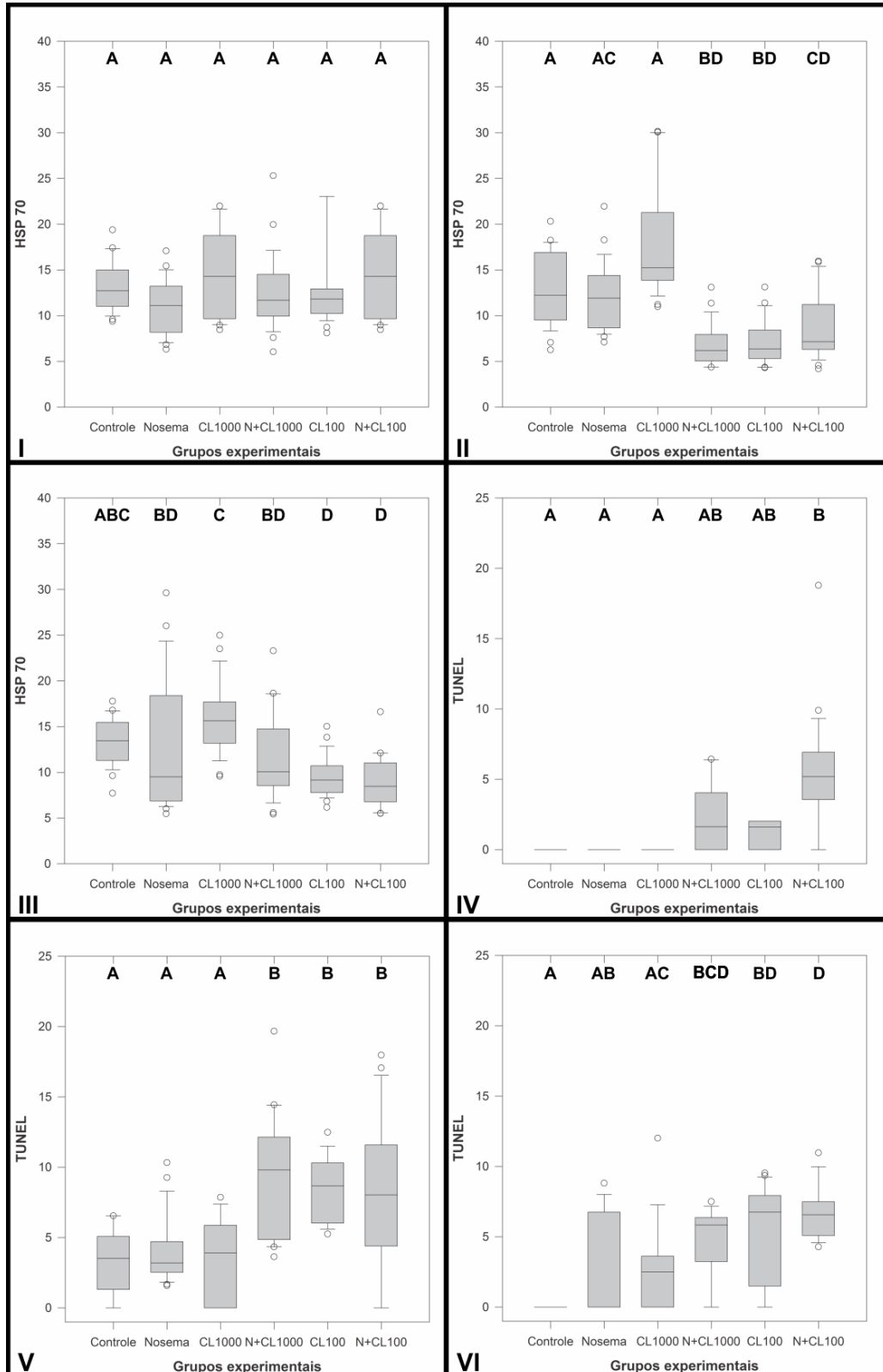


Fig 6. Intensidades da imunomarcagem da proteína HSP 70 e da marcação pela técnica de TUNEL nos túbulos de Malpighi de abelhas *A. mellifera* africanizada.

As análises foram feitas com 1 dia (I e IV), 6 dias (II e V) e 12 dias (III e VI) de bioensaio. As letras no topo dos gráficos representam os resultados estatísticos das comparações entre os grupos experimentais, sendo que letras diferentes indicam significância $p < 0,05$ (Kruskall-Wallis, Dunn). As siglas CL1000, N+CL1000, CL100 e N+CL100 correspondem, respectivamente, aos grupos CL₅₀/1000, N+CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100.

Discussão

As interações entre estressores podem ser classificadas como: antagonista, quando o efeito de um fator reduz o efeito do segundo; aditiva, quando o efeito final é a soma dos efeitos isolados de cada estressor; sinérgica, quando vários fatores, em conjunto, causam um efeito maior do que a soma de seus efeitos individuais; ou de potencialização, quando o efeito de um dos agentes é aumentado se combinado com outro [51].

A análise estatística de comparação entre as curvas de TL₅₀, no presente trabalho, mostrou que a interação *N. ceranae*-imidacloprido não se trata de um efeito antagonista, aditivo, sinérgico ou potencializador, uma vez que o grupo Nosema não diferiu estatisticamente do grupo N+CL₅₀/1000 e os grupos CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100 também não foram diferentes entre si.

Porém, a infecção por *N. ceranae*, a exposição a concentrações compatíveis com as residuais encontradas no pólen e no néctar do inseticida imidacloprido e os estressores combinados interferiram na sobrevivência das abelhas.

A associação de 200.000 esporos de *N. apis* e *N. ceranae* com o imidacloprido só levou a um efeito sinérgico ou potencializador na mortalidade de abelhas *A. mellifera* europeias quando as mesmas receberam 0,7 ou 70 ppb do inseticida, respectivamente, enquanto que a concentração de 7 ppb não ocasionou estes efeitos [13]. Uma vez que, no presente trabalho, foram oferecidos às abelhas 60.000 esporos de *N. ceranae* e/ou imidacloprido nas concentrações de 6,10 ppb e 61,02 ppb, os resultados corroboram a literatura apenas na menor concentração.

Efeitos sinérgicos entre um patógeno e um estressor ambiental foram descritos em estudo com *N. ceranae* e o inseticida fipronil, no qual a mortalidade atingiu 84% quando as abelhas foram expostas a ambos os fatores, sendo que a mortalidade registrada para *N. ceranae* foi de 39% e para o fipronil de 31%. [14]. Em contrapartida, em 2014, os mesmos autores não identificaram essa interação microsporídio-fipronil como sinérgica. As respostas contraditórias foram atribuídas a diferenças individuais entre as abelhas amostradas e às condições de cada colônia utilizada, como recursos alimentares, outros contaminantes ambientais e outros patógenos, que podem estar diretamente relacionados ao tempo de vida [52].

Os efeitos subletais do imidacloprido e a infecção pelo microsporídio não só interferiram na sobrevivência das abelhas, como também comprometeram a morfofisiologia do ventrículo e dos túbulos de Malpighi.

A menor concentração do imidacloprido ocasionou danos morfológicos no intestino médio das abelhas em 6 dias, com secreção apócrina, alterações nucleares e desorganização epitelial, porém com aumento da expressão de HSP 70. Essa expressão aumentada, tanto em 6 como em 12 dias, auxiliou o epitélio no combate ao estresse e aos danos causados pelo inseticida, uma vez que em 12 dias os danos morfológicos gerais ainda foram encontrados, porém apenas o aumento de secreção apócrina foi significativo.

Os níveis aumentados de HSP 70, além da ação proteotóxica a xenobióticos que não foram eliminados pelos processos de biotransformação e, conseqüentemente, afetaram o dobramento correto de proteínas [53], atuam inibindo eventos iniciadores da apoptose [33]. Elas também combatem processos caspase dependentes mais tardios, como ativação da fosfolipase citosólica A2, mudanças na morfologia nuclear e expressão da caspase-3 [54]. Adicionalmente, em insetos, HSPs podem atuar em várias outras vias sinalizadoras como, por exemplo, na remodelação do intestino durante a metamorfose [55].

A formação de vesículas de secreção na porção apical das células é comum no ventrículo das abelhas, pois é através desse processo que acontece a liberação de enzimas digestórias para o lúmen do órgão [50,56]. A intensificação dessa secreção apócrina pode estar relacionada à desintoxicação, na qual as células carregam o agrotóxico, juntamente com porções de seus citoplasmas, para o lúmen [57-59], por isso, esse evento foi observado na maioria dos grupos experimentais expostos ao imidacloprido.

O aumento da secreção apócrina verificada nas abelhas infectadas com o microsporídio podem indicar uma resposta de defesa das células para a eliminação do parasita junto à porções citoplasmáticas, principalmente aos 6 dias, quando os parasitas não completaram seu ciclo [60], evidenciado pela presença de quantidade mediana de esporos.

Quando ingerido, o imidacloprido é distribuído para todas as partes do corpo do inseto, sendo encontrado no intestino médio, reto, abdômen, tórax e cabeça, e seus metabólitos podem ser identificados após 24 horas [61]. Além de executar funções de absorção e digestão, o ventrículo é responsável pela síntese de enzimas envolvidas em mecanismos de biotransformação de xenobióticos [62-63].

Como a infecção pelo microsporídio causa danos teciduais no ventrículo, pode ocorrer comprometimento na capacidade das células de realizarem o processo de biotransformação e metabolização do imidacloprido. A diminuição da integridade epitelial ocasionaria aumento na quantidade do inseticida na hemolinfa e, conseqüentemente, nos túbulos de Malpighi. Assim, no primeiro dia, a interação do microsporídio com o inseticida, na maior concentração, aumentou a incidência de morte celular com quebra de DNA nos túbulos de Malpighi, fato

este que não aconteceu quando o inseticida foi administrado isoladamente. A alteração das funções dos túbulos de Malpighi, por sua vez, provavelmente diminuiu a excreção do inseticida, o que aumentou seu acúmulo na hemolinfa e sua biodisponibilidade para o órgão alvo, o cérebro.

Nos grupos de abelhas em que houve aumento na marcação pelo método de TUNEL nos túbulos de Malpighi, 6 e 12 dias após o início do bioensaio, a expressão da HSP 70 foi mantida ou diminuiu. A subexpressão da HSP 70 e o aparecimento da morte celular com quebra de DNA foi observado também no ventrículo de abelhas infectadas por *N. ceranae* e expostas ao imidacloprido na menor concentração por 6 dias. Nesse caso, a morte celular ocorreu quando a quantidade dessas proteínas deixou de atingir o limiar no qual elas teriam uma ação anti-apoptótica [33-34]. A expressão de HSP 70 abaixo do limite detectável está relacionada a danos celulares graves provocados por contaminantes ambientais [64].

Quando a capacidade de uma célula em se adaptar ultrapassa o seu limiar, a célula passa a apresentar alterações estruturais, que caracterizam a lesão reversível e, posteriormente, aparecem as alterações de lesão irreversível, que culminarão em morte celular rápida, dependendo do tipo e intensidade do estresse químico ou patológico [65].

A menor concentração do inseticida combinada com os esporos de *N. ceranae* diminuiu a expressão da HSP 70, aumentou a ocorrência de marcação pelo método TUNEL e os danos morfológicos gerais. As respostas celulares dessa combinação, em 6 dias, foram semelhantes ao efeito que a maior concentração do inseticida sozinha causou no ventrículo, exceto que não houve alteração da HSP 70. As alterações que esses dois grupos, N+CL₅₀/1000 e CL₅₀/100, causaram nos túbulos de Malpighi também se assemelharam, assim como as curvas de sobrevivência das abelhas não diferiram estatisticamente.

Vinte e quatro horas após a ingestão de *N. ceranae*, os esporos provocaram danos morfológicos no intestino, dentre eles a desorganização epitelial, provavelmente devido ao período de infecção das células pelo microsporídio. As contagens dos esporos nos abdomens das abelhas 1, 6 e 12 dias após a infecção, mostra que os parasitas injetaram seu esporoplasma com eficiência nas células intestinais, onde se replicaram para a produção de novos esporos.

O grupo Nosema apresentou aumento da expressão de HSP 70 no 12º dia do bioensaio. No entanto, a infecção das abelhas por *N. ceranae* em conjunto com a exposição pelas duas concentrações do imidacloprido acelerou temporalmente essa imunomarcação, prevenindo inclusive, as alterações morfológicas, conforme observado no 1º dia para os grupos N+CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/100 e no 12º dia para o grupo N+CL₅₀/1000. Foi mostrado

que abelhas infectadas por *N. ceranae* tiveram um aumento da expressão dos genes da família HSP 70 [66], o que conferiu citoproteção [33-34].

Outro fato que pode explicar poucas alterações morfológicas no epitélio intestinal dos grupos N+CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/100, é que por ser um parasita intracelular obrigatório, o microsporídio inibe a via mitocondrial apoptótica [67-69] e aumenta o nível de expressão do gene que codifica a proteína inibidora de apoptose *iap-2* [70], gerando um ambiente intracelular ótimo para completar o seu ciclo de infecção e sobreviver.

O aumento tardio dos níveis de HSP 70 (12 dias) no grupo *Nosema* e, também, no grupo CL₅₀/100 não impediu a fragmentação do DNA, provavelmente porque já tinha sido ativada a via apoptótica ou porque o tipo de morte celular observado não é inibido por HSP 70.

Muitos são os processos que levam a morte celular por apoptose e a atuação da HSP 70 é limitada em impedir esses eventos. Apenas a inativação da proteína quinase JNK pela HSP 70 não seria suficiente para prevenir a morte celular, se ela não estiver atuando como chaperona em outros processos como, por exemplo, evitando a ativação das procaspases [37]. A HSP 70 pode bloquear o processamento das procaspases, mas não consegue inibir as caspases ativas, principalmente a caspase efetora 3 [37,71].

A HSP 70 controla a apoptose inibindo eventos que alteram a permeabilização da membrana mitocondrial, como o bloqueio de sinais que ativam a proteína Bax, porém uma vez que esses eventos tenham ocorrido, a proteína HSP 70 não consegue mais evitar a morte celular. Ademais, se houver perturbações ou disrupção mitocondrial, a atuação da HSP 70 em evitar a liberação do citocromo c torna-se limitada [71]. Foi mostrado que os inseticidas podem levar as mitocôndrias ao inchaço e a perda de cristas [19,72].

Um mesmo estímulo pode induzir as células a morrerem por necrose, autofagia ou apoptose, no entanto, quando a apoptose é dificultada pela superexpressão de proteínas anti-apoptóticas, como as HSP 70, há o favorecimento da morte celular por autofagia ou necrose [73].

O aumento nos níveis teciduais de HSP 70 observados com 12 dias no grupo *Nosema*, acompanhado de aumento da fragmentação do DNA, indicada pela técnica de TUNEL, sugerem ainda que, neste período, provavelmente foi ativado um tipo de morte celular não apoptótica, como a macroautofagia. A resposta das células intestinais das abelhas à infecção por *Nosema* sp. inclui a expressão de genes envolvidos na regulação da morte celular por autofagia, como o *Atg2* [74], além daqueles envolvidos na apoptose, o que demonstra a

ocorrência de diferentes mecanismos de regulação de morte celular em abelhas infectadas pelo microsporídio.

A autofagia é descrita como um tipo de morte celular presente no intestino médio dos insetos e a sua via sinalizadora envolve os receptores de insulina. O estresse celular ocasionado por xenobióticos, como o estresse oxidativo e a privação energética podem induzir a autofagia [75]. Mudanças na distribuição corpórea da trealose e na absorção de glicose pelo intestino médio de insetos indicam que a exposição ao imidacloprido aumenta a necessidade energética dos indivíduos [76]. Além disso, um dos sinais da infecção por *Nosema* sp. em abelhas é o estresse energético, sendo que há um efeito pleiotrópico na via regulatória do hormônio adipocinético (AKH), que mobiliza as reservas energéticas do corpo gorduroso [77]. Dessa forma, tanto o imidacloprido quanto a infecção pelos microsporídios interferem no metabolismo energético das abelhas, o que poderia ativar a morte celular pela via do receptor de insulina.

Adicionalmente, a desorganização ou degeneração epitelial observada em alguns grupos do presente trabalho sugere a ocorrência de morte celular autofágica.

A lise celular ou vacuolização do epitélio intestinal, como sintoma da contaminação por parasitas, que levam a desorganização ou degeneração do tecido também foram relatadas em estudos com abelhas adultas ou larvas infectadas com *N. ceranae* [78], *N. apis* [79] ou *Paenibacillus larvae*, bactéria causadora da Cria Pútrida Americana [80]. A vacuolização está associada a indução de autofagia em células infectadas por patógeno [81].

Vacúolos no citoplasma das células intestinais de abelhas também podem ser consequência da exposição aos neonicotinoides [18], fato este que explicaria a desorganização epitelial encontrada também nos grupos que foram expostos ao imidacloprido de forma isolada ou associada a infecção por *N. ceranae*.

Em 12 dias, os grupos de abelhas isoladamente infectadas por *N. ceranae* ou expostas ao imidacloprido na maior concentração apresentaram, ainda, aumento no número de células eliminadas no lúmen, indicando que o microsporídio ou o imidacloprido inviabilizam as funções celulares. Mais de três milhões de esporos foram encontrados no ventrículo das abelhas, sendo assim, a eliminação e rompimento celular devem ser consequências da finalização da etapa de reprodução intra-epitelial do microsporídio, que precisa ser liberado no lúmen do órgão para completar seu ciclo de infecção.

A combinação entre maior concentração do imidacloprido com a *N. ceranae*, em 6 dias, embora não tenha levado a alterações na imunomarcagem da HSP 70 ou na marcação pelo método de TUNEL, ocasionou cerca de 80% de alterações morfológicas no epitélio

ventricular, com alterações nucleares, secreção apócrina e desorganização epitelial intensa. Aos 12 dias, nesse mesmo grupo, os danos morfológicos gerais foram cerca de 60%, sendo que a degeneração epitelial não foi significativa em relação ao Controle, porém houve aumento da incidência de morte celular com quebra de DNA. Uma vez que os microsporídios evitam provocar a morte celular por apoptose antes de completarem seu ciclo reprodutivo [67,68,69,70,82,83], a intensa vacuolização observada em 6 dias seria decorrente da indução da macroautofagia. Aos 12 dias, período no qual os esporos maduros são liberados no lúmen do intestino, as mortes celulares, com quebra do DNA, poderiam ser apoptose ou a coexistência de apoptose e autofagia. Esses resultados indicam, mais uma vez, a possibilidade do inseticida e da infecção pela *N. ceranae* terem induzido a mais de uma via de morte nas células intestinais. Autores mostraram a ocorrência de apoptose e necrose no intestino de abelhas infectadas com *N. ceranae* e expostas ao tiametoxam [44] ou nos tecidos de larvas infectadas com *P. larvae* [80]. Em processos fisiológicos normais dos insetos, apoptose e autofagia são relatadas em um mesmo tecido e acontecendo ao mesmo tempo [84-86].

O tempo médio de vida de 7 dias das abelhas do grupo N+CL₅₀/100 indica que a morte destas não só foi em decorrência da hiperexcitação do sistema nervoso provocada pelo imidacloprido, como também pelos danos graves ocasionados pela combinação do microsporídio com o inseticida sobre o ventrículo e sobre os túbulos de Malpighi.

A interação entre *N. ceranae* e concentrações subletais do tiametoxam diminuiu a quantidade de células intestinais em processo de morte, quando comparada às mortes ocasionadas por esses fatores isolados no 5º dia de infecção. Nesse período, por meio da contagem de esporos no intestino, foi mostrado ainda que o inseticida interferiu na invasão das células pelos parasitas e evitou sua replicação [44]. Por outro lado, no presente estudo, o número de esporos nos grupos simultaneamente infectados por *N. ceranae* e expostos às duas concentrações do imidacloprido aumentou no 6º dia. Portanto, mesmo que ambos os agrotóxicos pertençam à classe dos neonicotinoides, nota-se que existe diferença entre eles em relação aos efeitos na infecção intestinal à *N. ceranae*.

A partir dos dados aqui apresentados, conclui-se que a imunomarcagem da HSP 70, a marcação pelo método de TUNEL e as análises morfológicas são bons bioindicadores das condições fisiológicas e da saúde das abelhas, porém sozinhas essas técnicas podem levar a interpretações equivocadas. Por exemplo, nem sempre o aumento de HSP 70 conferiu proteção contra a morte celular ou a ausência de quebra do DNA nem sempre representou ausência de danos no tecido.

Espera-se que esses resultados contribuam para o melhor entendimento da relação parasita-imidacloprido, principalmente sobre *A. mellifera* africanizada, híbrido encontrado no Brasil, com as quais poucas pesquisas nesse sentido são encontradas em comparação com as diferentes subespécies de *A. mellifera* europeias.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP (2013/09555-5; 2014/12488-0; 2012/13370-8), à Dr^a. Erica Weinstein Teixeira pela identificação da espécie do microsporídio de trabalho e a Isabella Camargo pelo auxílio na realização dos bioensaios.

Referências

1. Kearns C, Inouye DW. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. Much remains to be learned about pollinators and plants. *Bioscience*. 1997;47(3): 297-307. doi: 10.2307/131319
2. Nogueira-Neto P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis; 1997.
3. Eardley C, Roth D, Clarke J, Buchmann S, Gemmil B. Pollinators and pollination: a resource book for policy and practice. 1st ed. Pretoria: Agricultural Research Council (ARC); 2006.
4. Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B, Biol. Sci.* 2007;274: 303-313. doi: 10.1098/rspb.2006.3721
5. Kerr WE, Carvalho GA, Silva AC, Assis, MGP. Parcerias Estratégicas. 2001; 12: 20-41.
6. vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, et al. Colony Collapse Disorder: a descriptive study. *Plos One*. 2009;4(8): 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0006481
7. Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW, Jabbour RE, et al. Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. *Plos One*. 2010;5(10): 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0013181
8. Watanabe ME. Colony collapse disorder: Many suspects, no smoking gun. *Bioscience* 2008;58(5): 384-388. doi: 10.1641/B580503

9. Mayack C, Naug D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertbr. Pathol.* 2009;100: 185-189. doi: 10.1016/j.jip.2008.12.001
10. Martín-Hernández R, Botía C, Barros L, Martínez-Salvador A, Meana A, Mayack C, et al. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol. Res.* 2011;109: 605-612. doi: 10.1007/s00436-011-2292-9
11. Gisder S, Möckel N, Linde A, Genersch E. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environ. Microbiol.* 2011;13(2): 404-413. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x
12. Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* 2009;11(9): 2284-2290. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x
13. Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchmitchan S, Cousin M, et al. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 2010;12(3): 774-782. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x
14. Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, et al. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* 2012;2(326): 1-7. doi: 10.1038/srep00326
15. Pettis JS, vanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G. Pesticide exposure in honey bees results in increased level of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften.* 2012;99: 153-158. doi: 10.1007/s00114-011-0881-1
16. Pettis JS, Lichtenberg EM, Andree M, Stitzinger J, Rose R, vanEngelsdorp D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *Plos One.* 2013;98(7): 1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0070182
17. Rossi CA, Roat TC, Tavares DA, Cintra-Socolowski P, Malaspina O. Brain morphophysiology of africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2013;65(2): 234-243. doi: 10.1007/s00244-013-9897-1
18. Oliveira RA, Roat TC, Carvalho SM, Malaspina O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environ. Toxicol.* 2013;29(10): 1122-1133. doi: 10.1002/tox.21842

19. Catae AF, Roat TC, Oliveira RA, Nocelli RCF, Malaspina O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and Malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc. Res. Tech.* 2014;77(4): 274-281. doi: 10.1002/jemt.22339
20. Schmuck R, Schoning R, Stork A, Schramel O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag. Sci.* 2001;57: 225-238. doi: 10.1002/ps.270
21. Dively GP, Kamel A. Insecticide residues in pollen and nectar of a Cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60: 4449-4456. doi: 10.1021/jf205393x
22. Pohorecka K, Skubida P, Miszczak A, Semkiw P, Sikorski P, Zagibajlo K, et. al. Residues of neonicotinoid insecticides in bee collected plant materials from oilseed rape crops and their effect on bee colonies. *J Apic. Sci.* 2012;56(2): 115-134. doi: 10.2478/v10289-012-0029-3
23. Stoner K, Eitzer BD. Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *Plos One.* 2012;7(6): 1-5. doi: 10.1371/journal.pone.0039114
24. Byrne FJ, Visscher PK, Leimkuehler B, Fischer D, Grafton-Cardwella EE, Morse JG. Determination of exposure levels of honey bees foraging on flowers of mature citrus trees previously treated with imidacloprid. *Pest Manag. Sci.* 2014;70: 470-482. doi: 10.1002/ps.3596
25. Berridge MJ, Oschmann JL. A structural basis for fluid secretion by Malpighian tubules. *Tissue Cell.* 1969;1(2): 247-272. doi: 10.1016/S0040-8166(69)80025-X
26. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 1988;22: 631-677. doi: 10.1146/annurev.ge.22.120188.003215
27. Kregel KC. Invited review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 2002;92(5): 2177-2186. doi: 10.1152/jappphysiol.01267.2001
28. Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhun DK. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far?. *Life Sci.* 2010;86(11): 377-384. doi: 10.1016/j.lfs.2009.12.015
29. Feder ME, Parsell DA, Lindquist SL. The stress response and stress proteins. In: Lemasters JJ, Oliver C, editors. *Cell Biology of Trauma*. Boca Raton: CRC Press; 1995. pp. 177-191.

30. Yenari AM, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg MD. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Trends Mol. Med.* 1999;5(2): 525-531. doi: 10.1016/S1357-4310(99)01599-3
31. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998;92(3): 351-366. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80928-9
32. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular function and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005;62: 670. doi:10.1007/s00018-004-4464-6
33. Takayama S, Reed JC, Homma Sachiko. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene.* 2003;22: 9041-9047. doi: 10.1038/sj.onc.1207114
34. Creagh EM, Carmody RJ, Cotter TG. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and - independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp. Cell Res.* 2000;(257): 58–66. doi: 10.1006/excr.2000.4856
35. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17(9): 5317-5327. doi: 10.1128/MCB.17.9.5317
36. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Marise C, Daugas E, Zamzami N, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* 2001;3: 839-843. doi: 10.1038/ncb0901-839
37. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(10): 7146-7159. doi: 10.1128/MCB.20.19.7146-7159.2000
38. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, et al. Requirement of JNK for stress- induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000;288(5467): 870-874. doi: 10.1126/science.288.5467.870
39. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ.* 2004;11(4): 390-402. doi:10.1038/sj.cdd.4401369
40. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 2000;45(3): 528-537. doi: 10.1016/S0008-6363(99)00384-3
41. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 1992;119(3): 439-501. PMID: PMC2289665

42. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In Situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*. 1995;21(5): 1465-1468. doi: 10.1016/0270-9139(95)90071-3
43. Higes M, Garcia-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 2007;94(3): 211-217. doi: 10.1016/j.jip.2006.11.001
44. Gregorc A, Silva-Zacarin ECM, Carvalho SM, Karamberger D, Teixeira EW, Malaspina O. Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. *Chemosphere* 2016;147 : 328-336. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.12.030
45. Soares-Lima HM, Carvalho SM, Dorigo AS, Silva-Zacarin ECM, Nocelli RCF, Malaspina O. Larvae are more tolerant to imidacloprid than adult honeybees. Submetido para *Environ. Toxicol. Chem.* 2017. Capítulo 01 dessa Tese.
46. Systat Software, San Jose, CA, USA. www.sigmaplot.com
47. Silva-Zacarin ECM, Chauzat MP, Zeggane S, Drajnudel P, Schurr F, Faucon JP, et al. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. In Mendez-Vilas A, editors. *Current microscopy contributions to advances in science and technology*. Badajoz: Formatex Research Center; 2012. pp 696-703. ISBN (13): 978-84-939843-5-9
48. Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution*. *J. Fish Dis.* 1999;22: 25-34. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x
49. Marinho JFU, Correia JE, De Castro Marcato AC, Pedro-Escher J, Fontanetti CS. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. *Ecotoxicol. environ. saf.* 2014;110: 239-245.
50. Cruz-Landim C. *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. 1st ed. São Paulo: Unesp Press; 2009. ISBN: 978-8-5713-9927-3
51. Doublet V, Labarussias M, Miranda JR, Moritz, RFA, Paxton RJ. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ. Microbiol.* 2015; 17(4): 969-983. doi: 10.1111/1462-2920.12426

52. Aufauvre J, Misme-Aucouturier B, Viguès B, Texier C, Delbac F, Blot N. Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. Plos One 2014;9(2): 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091686>
53. Sanders BM, Martin LS. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. Sci. Total Environ. 1993;139-140: 459-470. doi: 10.1016/0048-9697(93)90043-6
54. Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, Kalluni T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. Embo J. 1998;17(21): 6124-6134. doi: 10.1093/emboj/17.21.6124
55. Gu J, Huang LX, Shen Y, Huang LH, Feng QL. Hsp70 and small Hsps are the major heat shock protein members involved in midgut metamorphosis in the common cutworm, *Spodoptera litura*. Insect Mol Biol. 2012;21(5): 535-43. doi: 10.1111/j.1365-2583.2012.01158.x.
56. Cruz-Landim C, Serrão E, Silva-de-Moraes RLM. Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bee. Cytobios 1996;88(353): 94-104. <http://hdl.handle.net/11449/34546>
57. Caetano FH, Torres AHJr, Camargo-Mathias AMI, Tomake EM. . Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). Cytobios 1994;80: 235-242.
58. Malaspina O, Silva-Zacarin ECM. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. Braz. J. Morphol. Sci. 2006;23: 129-136.
59. Oliveira RA, Roat TC, Carvalho SM, Malaspina OM. Side-Effects of Thiamethoxam on the Brain and Midgut of the Africanized Honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Environ. Toxicol. 2014;29(10): 1122-1133. doi: 10.1002/tox.21842
60. Porrini MP, Sarlo EG, Medici SK, Garrido PM, Porrini DP, Damiani N, et al. *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. J. Apic. Res. 2011;50(1): 35-41. doi: 10.3896/IBRA.1.50.1.04
61. Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. P. Manag. Sci. 2004;60(3): 291-296. doi: 10.1002/ps.772
62. Yu SJ, Robinson FA, Nation JL. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. Pestic. Biochem. Physiol. 1984;22(3): 360-368. doi: 10.1016/0048-3575(84)90029-4
63. Smirle M, Winston ML. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems. Can. J. Zool. 1988;66(9): 1938-1942. doi: 10.1139/z88-283

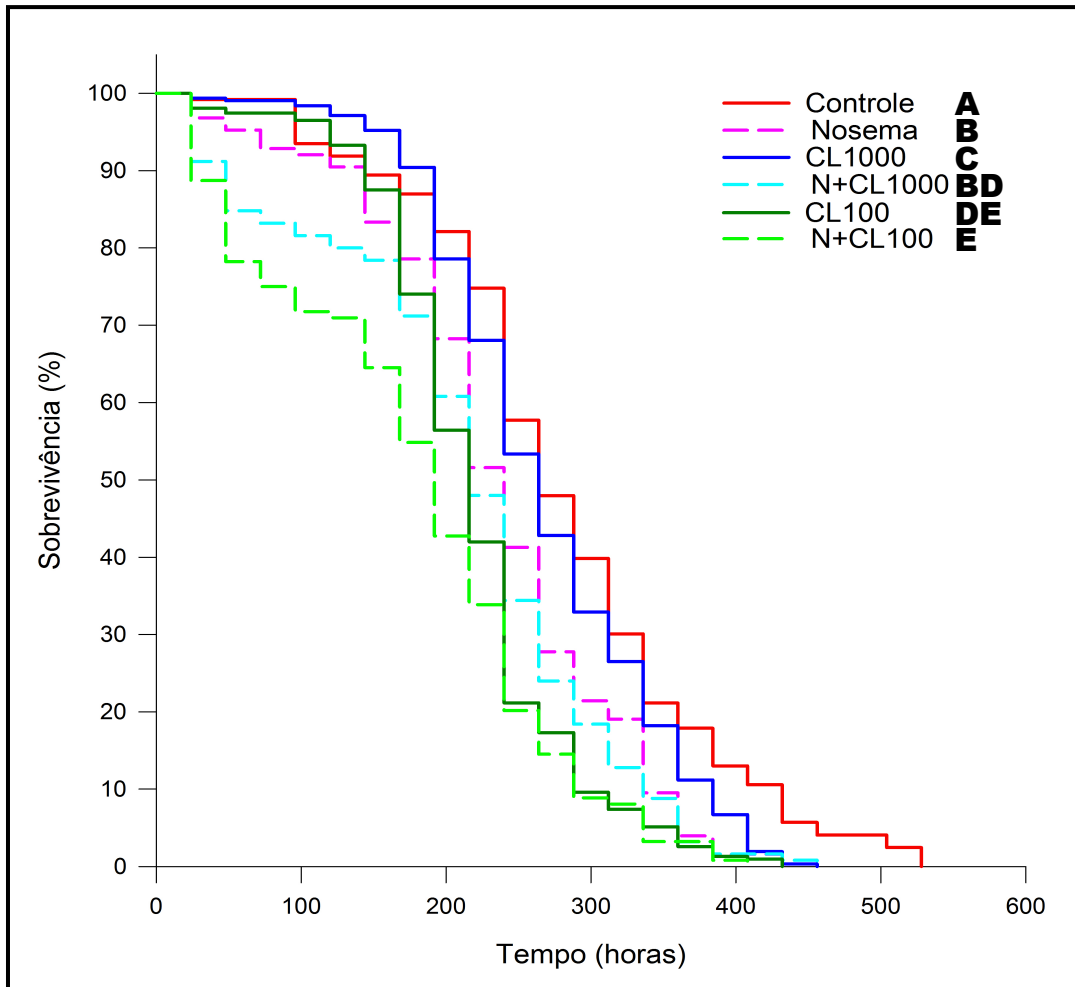
64. Köhler H-R, Eckwert H, Triebkorn R, Bengtsson G. Interaction between tolerance and 70 kDa stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution. *Appl. Soil Ecol.* 1999;11(1) 43-52. doi: 10.1016/S0929-1393(98)00127-9
65. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic basis of disease. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2014. ISBN 978-1-4557-2613-4
66. Vidau C, Panek J, Texier C, Biron DG, Belzunces LP, Le Gall M, et al. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *J Invertebr Pathol.* 2014;121: 89–96. doi: 10.1016/j.jip.2014.07.002 PMID: 25038465
67. He X, Fu Z, Li M, Liu H, Cai S, Man N, et al. *Nosema bombycis* (Microsporidia) suppresses apoptosis in BmN cells (*Bombyx mori*). *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2015;47(9): 696-702. doi: 10.1093/abbs/gmv062.
68. Huang Q, Chen YP, Wang RW, Cheng S, Evans JD. Host-Parasite Interactions and Purifying Selection in a Microsporidian Parasite of Honey Bees. *Plos One.* 2016;11(2):e0147549. doi: 10.1371/journal.pone.0147549.
69. Martín-Hernández R, Higes M, Sagastume S, Juarranz Á, Dias-Almeida J, Budge GE, et al. Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *Plos One.* 2017;12(2):e0170183. doi: 10.1371/journal.pone.0170183.
70. Kurze C, Le Conte Y, Dussaubat C, Erler S, Kryger P, Lewkowski O, et al. *Nosema* Tolerant Honeybees (*Apis mellifera*) Escape Parasitic Manipulation of Apoptosis. *Plos One.* 2015;10(10):e0140174. doi: 10.1371/journal.pone.0140174
71. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CPZ, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 Inhibits Heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing bax translocation. *J. Biol. Chem.* 2005;280(46): 38729 -38739. doi: 10.1074/jbc.M509497200
72. Jacob CRO, Soares HM, Nocelli RCF, Malaspina O. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. *Pest. Manag. Sci.* 2015;71(1): 114-122. doi: 10.1002/ps.3776
73. Kochevar IE, Lynch MC, Zhuang S, Lambert CR. Singlet Oxygen, but not Oxidizing Radicals, Induces Apoptosis in HL-60 Cells. *Photochem. Photobiol.* 2000;72(4): 548-553. doi: 10.1562/0031-8655(2000)072<0548:SOBNOR>2.0.CO;2
74. Doublet V, Poeschl Y, Gogol-Döring A, Alaux C, Annoscia D, Aurori C, et al. Unity in defence: honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics.* 2017;18(1):207. doi: 10.1186/s12864-017-3597-6. Erratum in: *BMC Genomics.* 2017;18(1):256.

75. Malagoli D, Abdalla FC, Cao Y, Feng Q, Fujisaki K, Gregorc A, et al. Autophagy and its physiological relevance in arthropods: current knowledge and perspectives. *Autophagy*. 2010;6(5): 575-88. doi: 10.4161/auto.6.5.11962. Epub 2010 Jul 1.
76. Sawczyn T, Dolezych B, Klosok M, Augustyniak M, Stygar D, Buldak RJ, et al. Alteration of carbohydrates metabolism and midgut glucose absorption in *Gromphadorhina portentosa* after subchronic exposure to imidacloprid and fenitrothion. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ Eng.* 2012;47(11): 1644-51. doi: 10.1080/10934529.2012.687181.
77. Mayack C, Natsopoulou ME, McMahon DP. *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees. *Insect Mol. Biol.* 2015;24(6): 662-70. doi: 10.1111/imb.12190.
78. Higes M, Garcia-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 2007;94: 211-217. doi: 10.1016/j.jip.2006.11.001
79. Liu TP. Ultrastructure of the midgut of the worker honey bee *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*. *J. Invertbr. Pathol.* 1984;44: 282-291. doi: 10.1016/0022-2011(84)90026-0
80. Gregorc A, Bowen ID. In situ localization of heat-shock and histone proteins in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae infected with *Paenibacillus larvae*. *Cell Biol. Int.* 1999;23: 211-218. doi: 10.1006/cbir.1999.0344
81. Opota O, Gauthier NC, Doye A, Berry C, Gounon P, Lemichez E, et al. *Bacillus sphaericus* binary toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication. *Plos One*. 2011;6(2):e14682. doi: 10.1371/journal.pone.0014682.
82. Scanlon M, Leitch GJ, Shaw AP, Moura H, Visvesvara GS. Susceptibility to apoptosis is reduced in the microsporidia-infected host cell. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1999;46(5): 34S-35S. pmid:10519237
83. Higes M, Juarranz A, Dias-Almeida J, Lucena S, Botias C, Meana A, et al. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Env Microbiol Rep.* 2013;5: 530-536. doi: 10.1111/1758-2229.12059
84. Silva-Zacarin ECM. Autophagy and apoptosis coordinate physiological cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Autophagy*. 2007;3(5): 515-517. doi: 10.4161/auto.4735
85. Velentzas AD, Nezis IP, Stravopodis DJ, Papassideri IS, Margaritis LH. Apoptosis and autophagy function cooperatively for the efficacious execution of programmed nurse cell

death during *Drosophila virilis* oogenesis. *Autophagy*. 2007;3(2): 130-132. doi: 0.4161/auto.3582

86. Reginato RD, Cruz-Landim C. Morphological characterization of cell death during the ovary differentiation in worker honey bee. *Cell Biol. Int.* 2002;26(3): 243-251. doi: 10.1006/cbir.2001.0839

Informações suplementares



S1 Fig. Sobrevivência das abelhas após a infecção por esporos de *N. ceranae* e/ou exposição oral ao imidacloprido.

As letras em negrito representam os resultados estatísticos da comparação entre as curvas de sobrevivência dos diferentes grupos experimentais, sendo que letras diferentes indicam significância $p \leq 0,05$ (Holm-Sidak). As siglas CL1000, N+CL1000, CL100 e N+CL100 correspondem, respectivamente, aos grupos CL₅₀/1000, N+CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100.

S1 Tabela. Resumo das alterações morfológicas, imunomarcações pela HSP 70 e marcações pela técnica de TUNEL encontradas no intestino médio dos diferentes grupos experimentais e que foram significativas em relação ao Controle.

Grupo experimental	1 dia	6 dias	12 dias
Nosema	↑DMG (DE)	↑DMG (SA, DE, AN) ↑TUNEL	↑DMG (EC, SA, DE, AN) ↑HSP70 ↑TUNEL
CL₅₀/1000	-	↑DMG (SA, DE, AN) ↑HSP70	↑DMG (SA) ↑HSP70
N+CL₅₀/1000	↑HSP70	↑DMG ↓HSP70 ↑TUNEL	↑DMG (SA)
CL₅₀/100	↑DMG	↑DMG (SA) ↑TUNEL	↑DMG (EC, SA, DE, AN) ↑HSP70 ↑TUNEL
N+CL₅₀/100	↑HSP70	↑DMG (EC, SA, DE, AN)	↑DMG (EC, SA, AN) ↑TUNEL

DMG: danos morfológicos gerais;

EC: Eliminação de células para o lúmen;

SA: Secreção apócrina;

DE: Desorganização epitelial;

AN: Alterações nucleares (picnose com halos pericromatínicos, aumento de tamanho ou formato irregular);

↑: aumento significativo;

↓: diminuição significativa.

S2 Tabela. Resumo das imunomarcações pela HSP 70 e das marcações pela técnica de TUNEL encontradas nos túbulos de Malpighi dos diferentes grupos experimentais e que foram significativas em relação ao Controle.

Grupo experimental	1 dia	6 dias	12 dias
Nosema	-	-	-
CL₅₀/1000	-	-	-
N+CL₅₀/1000	-	↓HSP70 ↑TUNEL	↑TUNEL
CL₅₀/100	-	↓HSP70 ↑TUNEL	↓HSP70 ↑TUNEL
N+CL₅₀/100	↑TUNEL	↓HSP70 ↑TUNEL	↓HSP70 ↑TUNEL

↑: aumento significativo;

↓: diminuição significativa.

6. CAPÍTULO 3

Este capítulo foi confeccionado para publicação na **Chemosphere** e, portanto, está editado conforme as regras da revista.

Abelhas têm resposta neural alterada após infecção por *Nosema ceranae* e exposição ao imidacloprido

Hellen Maria Soares Lima^a, Elaine Cristina Mathias Silva Zacarin^b, Roberta Cornélio Ferreira Nocelli^c, Osmar Malaspina^a.

^a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

^b Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Humanas e Biológicas, Departamento de Biologia, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

^c Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Araras, São Paulo, Brasil.

HIGHLIGHTS

- Abelhas têm atividade sináptica dos corpos pedunculados alterada.
- Aumento na imunomarcagem de HSP 70 indica resposta dos corpos pedunculados para manter a homeostase neural.
- Quantidade de células gliais aumentada apontam danos as células de Kenyon.

Resumo

As abelhas sociais são consideradas importantes modelos neurobiológicos devido à complexidade de comportamento e sistema nervoso anatomicamente simples. Os corpos pedunculados, estruturas localizadas no protocérebro, são centros de integração multimodal e, por isso, estão relacionados à plasticidade comportamental das abelhas. Alterações na atividade neural dos corpos pedunculados podem refletir mudanças nas condições ambientais. Dessa forma, no presente estudo foram avaliados os efeitos da infecção por *Nosema ceranae*, microsporídio causador da nosemose, e de concentrações de campo do inseticida imidacloprido na morfologia e na imunomarcção das proteínas sinapsina e HSP 70 dos corpos pedunculados de abelhas operárias de *Apis mellifera* africanizada. Com relação à imunomarcção da sinapsina, os resultados mostraram que os grupos infectados por *N. ceranae* e expostos a 0,0075 ng de imidacloprido/ μ L de dieta, isoladamente, tiveram aumento nos níveis teciduais desta proteína aos 12 dias, provavelmente em resposta ao parasitismo e a hiperexcitação provocada pela ação do inseticida no sistema nervoso, respectivamente. As distintas concentrações do inseticida levaram a diferentes atividades neurais, sendo que a concentração de 0,075 ng i.a./ μ L não ocasionou, nos tempos avaliados, alterações na imunomarcção da sinapsina, mas respondeu ao estresse sofrido pelo composto com o aumento na expressão de HSP 70 e, posteriormente, com o aumento na quantidade de células gliais. A queda nos níveis teciduais de HSP 70 e o aumento na quantidade de células gliais no grupo que foi simultaneamente exposto ao imidacloprido (0,0075 ng/ μ L) e a *N. ceranae* indicam que as células de Kenyon sofreram danos. A diminuição na imunomarcção de sinapsina no grupo de abelhas expostas aos microsporídios e ao inseticida na maior concentração (0,075 ng/ μ L) sugerem que os efeitos dos estressores no organismo conduzem as células de Kenyon a um possível estresse energético.

Palavras-chave: corpos pedunculados, sinapsina, HSP 70, patógenos, neonicotinoide.

Introdução

Com comportamento complexo, capacidade de aprendizagem, formação de memória, habilidades cognitivas e sistema nervoso relativamente simples em termos de estrutura e número de células nervosas, as abelhas são consideradas importantes modelos neurobiológicos (Menzel, 1983; Menzel, 2001).

Em abelhas adultas, o cérebro é formado pela fusão de três gânglios: o tritocérebro, o deutocérebro e o protocérebro (Cruz-Landim, 2009). No protocérebro estão localizados os corpos pedunculados, estruturas relacionadas à plasticidade comportamental das abelhas, uma vez que são centros de integração multimodal e recebem informações olfativas, visuais, gustatórias e mecanossensoriais (Komischke et al., 2005; Kiya et al., 2007).

Os corpos pedunculados são estruturas pares constituídas de neurópilas em forma de cálice, as quais são preenchidas com os corpos celulares de neurônios, chamados de células de Kenyon (Rybak e Menzel, 1993; Farris et al., 1999). As células de Kenyon são diferenciadas em compactas internas, não compactas e compactas externas, de acordo com a localização e quantidade de citoplasma em relação ao núcleo (Farris e Sinakevitch, 2003; Fahrbach, 2006).

Além das células neurais, as células gliais constituem as estruturas do cérebro e tem como função o suporte, a contribuição na nutrição dos neurônios, a regulação de íons e neurotransmissores no ambiente extracelular e o isolamento elétrico (Treherne e Schofield, 1981; Pentreath, 1989; Carlson e Saint Marie, 1990; Tsacopoulos e Magistretti, 1996; Hahnlein e Bicker, 1996, Kretzschmar e Pflugfelder, 2002)

Segundo Kretzschmar e Pflugfelder (2002), a interação entre as células gliais e entre elas e os neurônios é necessária não só para manter a homeostase do cérebro dos insetos, como também dotá-lo da capacidade de responder e adaptar-se às mudanças do meio ambiente.

É pelo intrínseco contato com o ambiente, na coleta de pólen e néctar como recursos alimentares, que as abelhas estão constantemente expostas aos agrotóxicos aplicados nas áreas de cultivo, embora sejam insetos benéficos e não-alvos desses compostos (Allen-Wardell et al., 1998; Kerr et al., 2001).

Desenvolvidos em meados de 1990, os inseticidas neonicotinoides, como o imidacloprido, são neurotóxicos e atuam competindo com a acetilcolina pelos receptores nicotínicos de acetilcolina localizados na membrana pós-sináptica (Buckingham et al., 1997; Fairbrother et al., 2014).

Peng e Yang (2016) avaliaram a densidade microglomerular dos corpos pedunculados de *A. mellifera* adultas expostas na fase larval ao inseticida imidacloprido, utilizando a imunomarcagem da proteína sinapsina. Os autores notaram que até mesmo a concentração de 10 ppb do inseticida levou à diminuição da densidade microglomerular de algumas das regiões dos corpos pedunculados.

Cresswell (2011) estimou que a concentração realística encontrada em campo do imidacloprido seria de 0,7 a 10 ppb para o néctar floral. Assim, os resíduos do imidacloprido no ambiente causariam, segundo Peng e Yang (2016), efeito negativo no desenvolvimento do sistema nervoso das abelhas, diminuindo a aprendizagem e memória olfativas e limitando a eficiência do forrageamento.

As sinapsinas são fosfoproteínas, filogeneticamente conservadas, que atuam na formação das sinapses nervosas. Quando desfosforiladas, elas mantêm as vesículas sinápticas agrupadas e ancoradas ao citoesqueleto. A condução do impulso nervoso estimula a fosforilação das sinapsinas que se soltam das vesículas sinápticas deixando-as livres para a exocitose e liberação dos neurotransmissores da membrana pré-sináptica (Llinás et al., 1985; Gartner e Hiatt, 2007). Apesar de não serem essenciais para a transmissão sináptica, as sinapsinas promovem o ajuste e remodelação das sinapses (Benfenati, 2011; Humeau et al., 2011). Devido ao seu papel de regulação sináptica existe a correlação entre a sinapsina e plasticidade comportamental das abelhas (Godenschwege et al., 2004; Michels et al., 2005).

Não só a ação de inseticidas sobre o sistema nervoso é capaz de afetar o comportamento das abelhas e prejudicar a realização de atividades para a manutenção das colônias, como também as doenças.

Mallon et al. (2003) visaram avaliar a ligação entre o sistema nervoso das abelhas com o sistema imune. As abelhas que tiveram o sistema imunológico estimulado por um lipopolissacarídeo elicitor, componente da parede celular de bactérias gram negativas, tiveram capacidade reduzida de associar um odor à recompensa alimentar medida pelo teste de respostas de extensão da probóscide. Os autores concluíram que o acometimento do sistema imune por um patógeno pode além de afetar a sobrevivência do hospedeiro, alterar a capacidade de aprendizagem e formação de memória.

A nosebose é uma doença provocada pelo microsporídio *N. ceranae* que suprime a resposta imune em abelhas por meio da redução da transcrição de alguns genes, como o da defensina, abaecina, apidaecina, himenoptaecina e glucose desidrogenase (Antúnez et al., 2009; Chaimanee et al., 2012; Aufauvre et al., 2014).

Sánchez-Bayo e Desneux (2015) associaram a prevalência de parasitas e doenças nas populações de abelhas, principalmente *Varroa destructor* e *N. ceranae*, aos neonicotinoides, como o imidacloprido, tiametoxam e clotianidina. Na região de Ontário, 76% das colônias acometidas pelo fenômeno do desaparecimento de abelhas melíferas (“Colony Collapse Disorder”) estavam infectadas com *V. destructor* e 26% delas possuíam esporos de *Nosema* spp. (Guzmán-Novoa et al., 2010).

A interação entre *N. ceranae* e o inseticida fipronil aumentou a taxa de mortalidade das operárias, quando comparada às taxas de mortalidade observadas pela exposição destes insetos aos estressores isolados (Aufauvre et al., 2012; Aufauvre et al., 2014).

A proteína de choque térmico (Heat Shock Protein) de massa molecular 70 kDa (HSP70) é comumente utilizada como indicadora do estresse celular ocasionado por concentrações subletais de agrotóxicos (Hranitz et al., 2009). Elas atuam como chaperonas, auxiliando no enovelamento de diversas proteínas e impedindo que proteínas com sequências hidrofóbicas expostas formem agregados que podem ser nocivos às células (Mayer e Bukau, 2005). Autores sugeriram que o aumento na expressão de HSP 70 poderia ser um mecanismo preventivo da morte celular em larga escala de órgãos de abelhas expostas à agrotóxicos (Silva-Zacarin et al., 2006) ou infectadas por patógenos (Gregorc e Bowen, 1998; Gregorc e Bowen, 1999).

As proteínas da família HSP 70 podem interferir nas vias apoptóticas intrínseca e extrínseca de muitas formas como, por exemplo, impedindo a liberação de citocromo c e do fator indutor da apoptose (AIF) das mitocôndrias e inibindo a ativação do fator ativador da protease apoptótica 1 (Apaf-1), das pró-caspases e das proteínas Bid e JNK (Kinase c-Jun N-terminal) (Mosser et al., 1997; Creagh et al., 2000; Mosser et al., 2000; Takayama et al., 2003).

Visto que mudanças na atividade neuronal podem refletir a interação entre o organismo e o meio (Chen et al., 2002) e que as abelhas são bioindicadoras das condições ambientais (Pham-Delègue et al., 2002), este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do imidacloprido e/ou da infecção pelo microsporídio *N. ceranae* sobre os corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizada. Para isso, foram utilizados os seguintes biomarcadores: presença e quantidade das células da glia e imunomarcação das proteínas sinapsina e HSP 70.

Materiais e Métodos

Obtenção e manutenção das abelhas

Favos de cria operculados, provenientes de três colônias não parentais, foram coletados no apiário do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da UNESP, campus de Rio Claro, e transferidos para estufa de demanda bioquímica de oxigênio (32 ± 2 °C, 70% de umidade relativa) para monitoramento da emergência das abelhas. Abelhas recém-emergidas da espécie *A. mellifera* africanizada, saudáveis e livres de *Nosema* sp., com 1 dia de idade, foram submetidas ao bioensaio de infecção por *N. ceranae* e/ou exposição ao imidacloprido.

Infecção por *N. ceranae* e exposição ao imidacloprido

Os esporos de *N. ceranae* foram isolados e a identificação molecular da espécie dos mesmos foi confirmada de acordo com o protocolo desenvolvido por Higes et al. (2007). Foi preparada uma solução de açúcar invertido a 50% (v:v) contendo cerca de 60.000 esporos/abelha, cuja concentração foi determinada por câmara de Neubauer. Essa quantidade de esporos por abelha foi utilizada por ser relatada como a menor concentração capaz de provocar infecção (Gregorc et al., 2016).

Às abelhas recém-emergidas foi oferecida uma gota de 2 µL de solução de sacarose contendo ou não esporos de *N. ceranae*. Posteriormente, essas abelhas foram acondicionadas em potes plásticos descartáveis de 250 mL (gaiolas experimentais), previamente furados e forrados com papel-filtro, e mantidas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (32 ± 1 °C e umidade relativa de 70%).

O inseticida imidacloprido (Sigma-Aldrich) foi solubilizado em acetona e água e, posteriormente, sucessivas diluições foram realizadas no alimento (açúcar invertido e água 1:1, v:v) para atingir as concentrações a serem oferecidas às abelhas: o valor da concentração letal média (CL_{50}), estabelecido por Soares-Lima et al. (2017a), dividido por cem ($CL_{50}/100$ correspondente a 0,075 ng de imidacloprido/µL de dieta) e a concentração letal média dividida por mil ($CL_{50}/1000$ correspondente a 0,0075 ng de imidacloprido/µL de dieta). As concentrações de 0,075 ng/µL e 0,0075, correspondem à 61,02 ppb e 6,10 ppb, respectivamente, considerando que o alimento possuía densidade de 1,2290 g/mL e, assim, são compatíveis com as concentrações residuais encontradas no pólen e néctar (Dively e Kamel, 2012).

As concentrações subletais do inseticida imidacloprido, diluídas no alimento, foram oferecidas *ad libitum* às abelhas, durante todo o período do experimento. O alimento ficou

disponível nas gaiolas experimentais por meio de um microtubo plástico de 1,5 mL, furado e fixado na tampa dos potes plásticos. As abelhas do grupo Controle e do grupo que passaram apenas por infecção com *N. ceranae* receberam alimento sem inseticida.

Dessa forma, este trabalho contou com os seguintes grupos experimentais: Controle (abelhas não infectadas com esporos de *N. ceranae* e não expostas ao imidacloprido); Nosema (abelhas infectadas com esporos de *N. ceranae*); CL₅₀/1000 (abelhas expostas à 0,0075 ng i.a./μL); N+CL₅₀/1000 (abelhas infectadas com esporos de *N. ceranae* e expostas à 0,0075 ng i.a./μL); CL₅₀/100 (abelhas expostas à 0,075 ng i.a./μL) e N+CL₅₀/100 (abelhas infectadas com esporos de *N. ceranae* e expostas à 0,075 ng i.a./μL).

Microscopias de luz de campo claro e confocal de varredura a laser

As abelhas infectadas por *N. ceranae* e/ou expostas ao imidacloprido, assim como as do grupo Controle, foram coletadas 1 dia, 6 dias e 12 dias após início dos bioensaios. Os tempos de coleta foram baseados na TL₅₀ estabelecida para o grupo Controle por Soares-Lima et al. (2017b). Após isso, as abelhas dos diferentes grupos experimentais foram anestesiadas por resfriamento e seus cérebros dissecados. Nove cérebros de cada grupo experimental foram processados para realização da técnica de hematoxilina e eosina, 9 foram destinados a marcação da actina-F e do núcleo, outros 9 foram submetidos à imunomarcação da sinapsina e mais 9 à imunomarcação da HSP 70.

Hematoxilina e Eosina

Os cérebros dissecados foram fixados em paraformaldeído 4% e desidratados em uma série crescente de álcoois (15% a 95%), segundo protocolo de Silva-Zacarin et al. (2012). Posteriormente, o material foi transferido para resina de embebição (overnight) e incluídos em historesina (Leica).

Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo (Leica), com espessura de 6 μm, e colocados sobre lâminas. As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris por 10 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos e, a seguir, submetidas a uma solução aquosa de Eosina por 5 minutos. Após uma nova lavagem em água corrente, as lâminas foram secas, montadas em DPX.

As fotomicrografias foram adquiridas no Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP de Rio Claro-SP por meio de uma camera digital, Olympus DP-71, acoplada a um microscópio, Olympus BX51. Para a aquisição das imagens foi utilizado o software DP Controller.

Para cada indivíduo avaliado foram fotografados 3 corpos pedunculados (aumento de 400x) de cada um dos 6 diferentes cortes não-sequenciais.

Foi feita uma quantificação relativa das células da glia de cada corpo pedunculado avaliado, levando em consideração a área ocupada por elas, em relação a área ocupada pelas células de Kenyon internas. A estimativa da área ocupada pelas células foi realizada com auxílio do software ImageJ (Rasband, 1997-2016).

As comparações estatísticas entre a quantidade relativa de células da glia dos diferentes grupos experimentais foram efetuadas utilizando o programa SigmaPlot 13 (Systat Software), análise de variância ANOVA one way, Kruskal-Wallis; Dunn.

Imunomarcação das proteínas HSP70 e sinapsina e marcação da actina-F e do núcleo

O material dissecado foi fixado em paraformaldeído 4% em PBS (tampão fosfato de sódio pH 7.4) e posteriormente lavados em tampão PBS. Os órgãos foram emblocados em agarose (Agarose II™, Amresco) para a obtenção de cortes com 100 µm de espessura em vibrátomo (Leica VT1000S).

Para imunomarcação da sinapsina, os cortes foram, permeabilizados por 1h em solução PBS contendo 2% de soro normal de cabra (Vector) e 0,2% Triton X-100 (Sigma). Após 3 lavagens no tampão PBS, os cortes foram incubados no anticorpo primário monoclonal 3C11 anti-SYNORF1 produzido em rato (1:50, DSHB) por 5 dias na ausência de luz e a 4 °C. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário IgG de cabra contra rato, conjugado com CY5 (1:1000, Molecular Probes), durante 1 hora e, finalmente, as lâminas foram montadas utilizando o Prolong® Diamond Antifade (Molecular Probes).

Para a imunomarcação da HSP70, os cortes foram primeiramente submetidos à recuperação antigênica utilizando tampão citrato de sódio (0,1M e pH=6). Os cortes foram, então, permeabilizados com 0,5% de Triton X-100 (Sigma) por 10 min e, posteriormente, incubados com 3% de albumina sérica bovina (Sigma) por 30 minutos. Após 3 lavagens no tampão PBS, os cortes foram incubados no anticorpo primário monoclonal anti-HSP70 produzido em rato (1:100, Invitrogen) por 1 hora, ausência de luz, a 37 °C e em câmara úmida. Após a incubação com o anticorpo primário, o anticorpo secundário IgG de cabra contra rato conjugado com CY5 (1:500, Molecular Probes) foi usado na incubação das secções dos órgãos durante 1 hora e, finalmente, as lâminas foram montadas utilizando o Prolong® Diamond Antifade (Molecular Probes).

Com o objetivo de comprovar as imunomarcações da sinapsina e da HSP70, foram realizados dois controles negativos da reação para cada técnica, utilizando os mesmos procedimentos acima descritos, exceto que no primeiro o material não foi incubado com anticorpo primário e no segundo o material não foi incubado com o anticorpo secundário.

Para a marcação da actina-F, os cortes foram incubados com 0,2% de Triton X-100 (Sigma) e posteriormente lavados em PBS. Os cortes foram, então, incubados por 30 minutos com faloidina conjugada com Alexa 488 (Molecular Probes), soro normal de cabra (Vector) e PBS. Os núcleos foram marcados com DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol, Molecular Probes) e as lâminas montadas utilizando o Prolong® Diamond Antifade (Molecular Probes).

As marcações foram visualizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP de Rio Claro- SP, por meio de um microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SP5 II), e para a aquisição das imagens foi utilizado o software Leica Application Suite-AF.

Foram feitas secções ópticas de 35 μm de espessura, com intervalo de 1 μm , sob aumento de 400x e os materiais foram fotografados com os mesmos parâmetros: sinapsina (laser HeNe=13%, $\lambda=633$ nm, Gain=950.0 V, Offset=-1.0%, Pinhole=67,90 μm , Zomm=1.00), HSP70 (laser HeNe=14%, $\lambda=633$ nm, Gain=914.0 V, Offset=-1.9%, Pinhole=67,90 μm , Zomm=1.00), faloidina (laser Argônio=10%, $\lambda=488$ nm, Gain=957.0 V, Offset=-1.9%, Pinhole=53.64 μm , Zomm=1.00), DAPI (laser diodo=10%, $\lambda=405$ nm, Gain=730.0 V, Offset=-1.0%, Pinhole=67,90 μm , Zomm=1.00).

As marcações da actina-F e do núcleo foram realizadas com o objetivo de avaliar a citoarquitetura do órgão nos diferentes grupos experimentais. Portanto, essa marcação não foi quantificada.

A quantificação das imunomarcações de sinapsina e de HSP 70 nas imagens adquiridas foi realizada com auxílio do software Leica Application Suite-AF. Para cada grupo experimental, 3 corpos pedunculados de 9 indivíduos diferentes foram analisados quantitativamente. Cada corpo pedunculado foi dividido em cinco regiões para quantificação da sinapsina e três para HSP 70, por círculos de 100 μm de diâmetro, nos quais a intensidade de fluorescência emitida foi mensurada em escala de cinza.

As comparações estatísticas entre as intensidades de fluorescência mensuradas para os diferentes grupos experimentais foram efetuadas utilizando o programa SigmaPlot 13 (Systat Software), análise de variância ANOVA one way, Kruskal- Wallis; Dunn.

Resultados

Quantificação de células da glia

As técnicas de coloração com hematoxilina e eosina e marcação da actina-F e do núcleo não mostraram alteração na morfologia das células de Kenyon e nem da estrutura dos corpos pedunculados (Figura 1), porém observou-se a presença de células fortemente coradas com características de células da glia (Figura 1 C-E e G).

Não houve diferenças significativas na quantidade de células de glia entre os grupos experimentais, no primeiro dia de bioensaio (Figura 2 I).

O grupo N+CL₅₀/1000, em comparação com os grupos Controle e Nosema, no 6º dia do bioensaio apresentou aumento significativo no número destas células mais coradas (Figura 2 II).

Doze dias após o início do bioensaio, os grupos CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100 diferiram do grupo Controle na quantidade de células gliais (Figura 2 III).

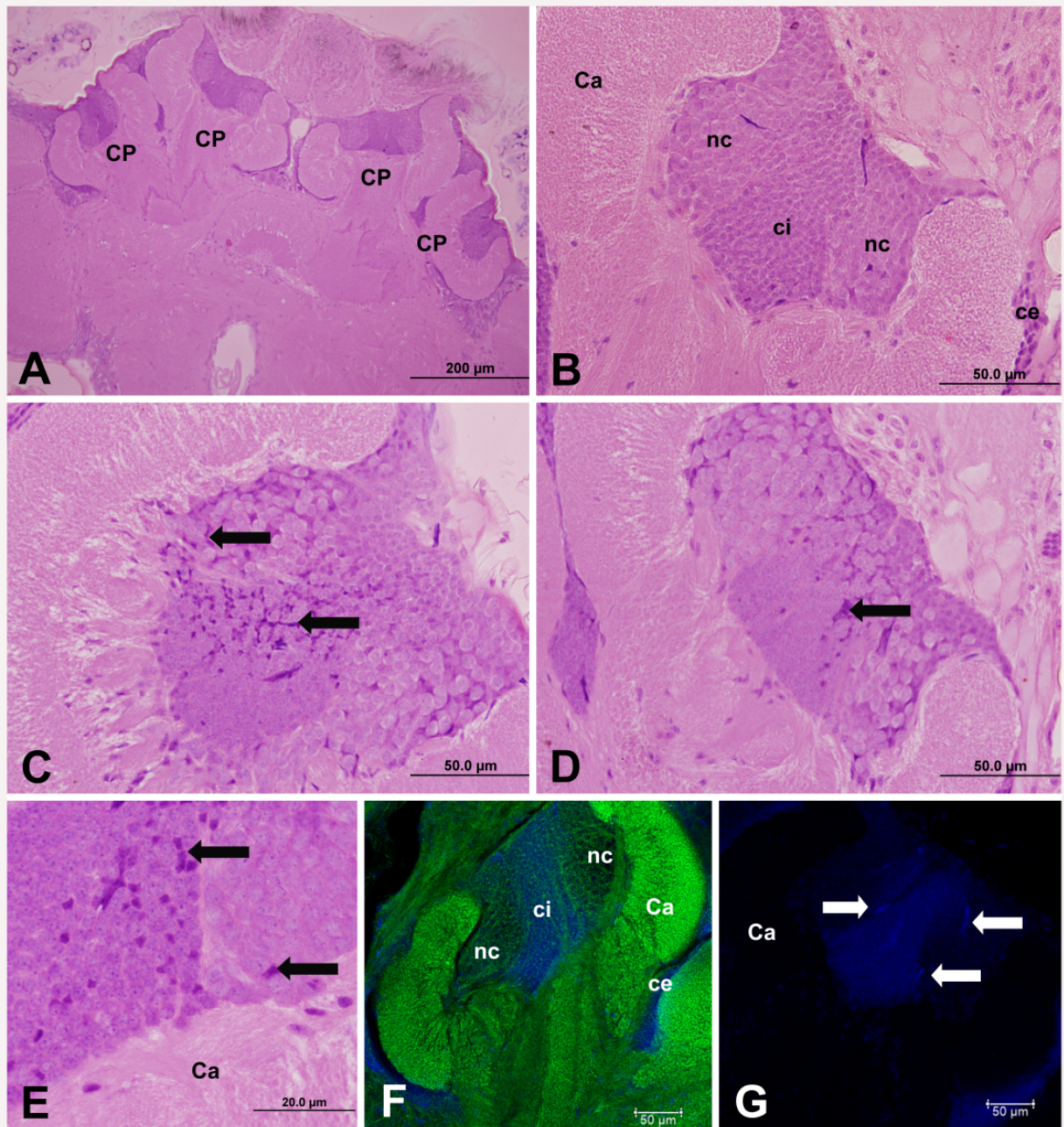


Figura 1: Corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizada corados com hematoxilina e eosina (A-E) e marcados com faloidina em verde e DAPI em azul (F-G). (A) visão geral dos quatro corpos pedunculados do cérebro de abelhas do grupo Controle 12 dias. Corpos pedunculados dos grupos (B) Controle 12 dias, (C) N+CL₅₀/1000 6 dias, (D) N+CL₅₀/100 12 dias, (E) CL₅₀/100 6 dias, (F) Controle 6 dias e (G) Nosema 6 dias. As setas apontam as células de glia. As siglas indicam: CP- corpo pedunculado, Ca- cálice, ci- células de Kenyon compactas internas, nc- células de Kenyon não compactas e ce- células de Kenyon compactas externas.

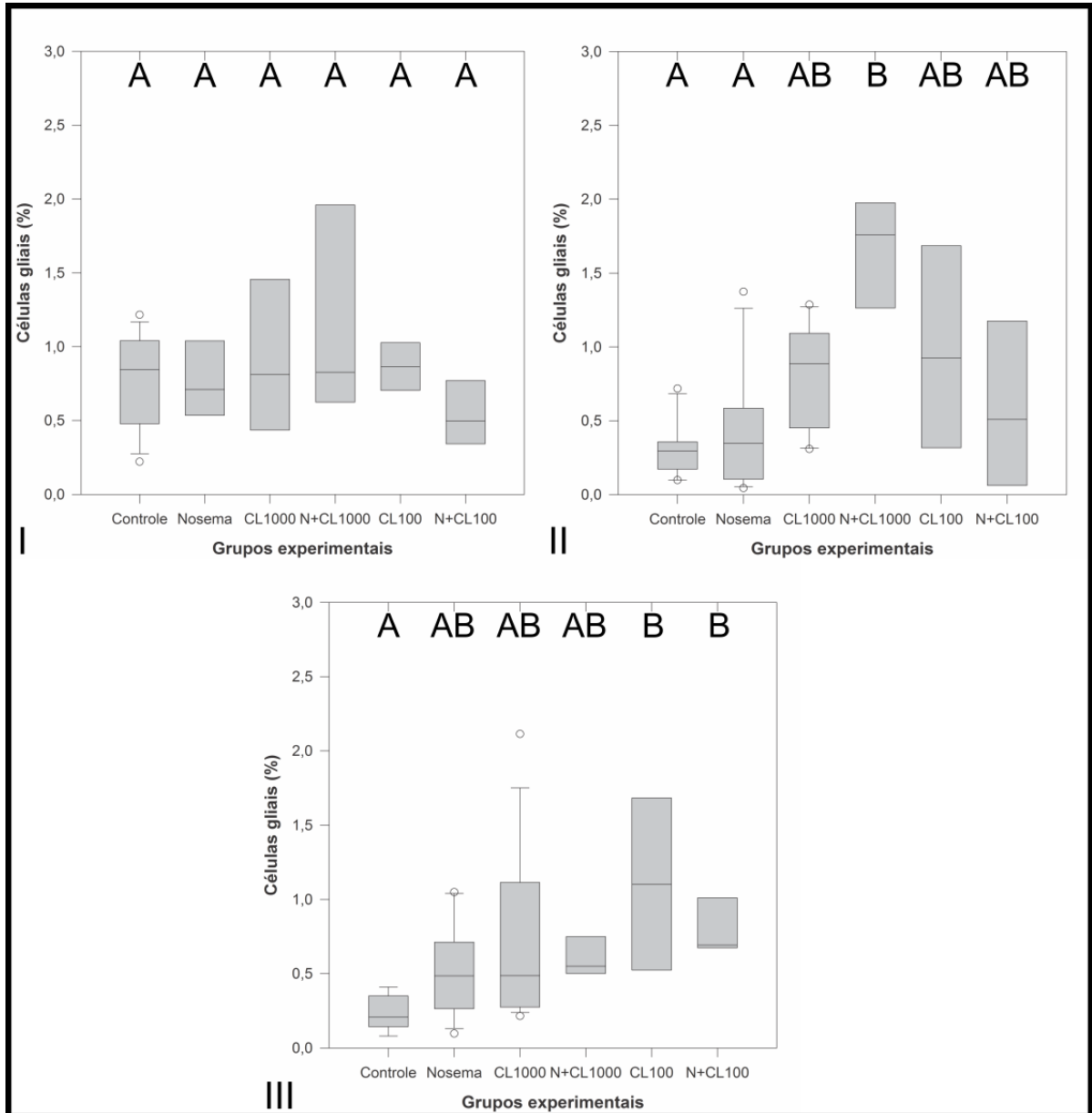


Figura 2: Quantificação relativa das células gliais dos corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizada para 1(I), 6(II) e 12(III) dias de bioensaio. As letras no topo dos gráficos representam os resultados estatísticos das comparações entre a quantificação das células gliais dos diferentes grupos experimentais, sendo que letras diferentes indicam significância $p < 0,05$ (Kruskall-Wallis, Dunn). As siglas CL1000, N+CL1000, CL100 e N+CL100 correspondem, respectivamente, aos grupos CL₅₀/1000, N+CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100.

Imunomarcação da sinapsina

A imunomarcação positiva para sinapsina ocorreu na região do cálice dos corpos pedunculados (Figura 3) e as intensidades mensuradas dessa proteína alteraram de acordo com o tempo de exposição e o grupo experimental ao qual as abelhas pertenciam.

1 dia:

A intensidade da imunomarcção da sinapsina foi estatisticamente semelhante para todos os grupos experimentais em relação ao Controle. Apenas os grupos N+CL₅₀/1000 e CL₅₀/100 diferiram estatisticamente entre si (Figura 4 I).

6 dias:

Com 6 dias de exposição *ad libitum* ao imidacloprido e após a infecção pela *N. ceranae*, apenas o grupo N+CL₅₀/100 diferiu estatisticamente do Controle, sendo que a intensidade de imunomarcção da sinapsina aumentou (Figura 4 II).

O grupo Nosema diferiu estatisticamente dos grupos CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/100, nos quais a imunomarcção aumentou (Figura 4 II).

Embora a média da intensidade de imunomarcção do grupo CL₅₀/1000 tenha aumentado em comparação ao Controle, essa diferença não foi significativa. Esse aumento na imunomarcção observada para CL₅₀/1000 levou a uma diferença estatística entre esse grupo e os grupos Nosema, N+CL₅₀/1000 e CL₅₀/100 (Figura 4 II).

O efeito conjunto da infecção por *N. ceranae* e do imidacloprido na maior concentração (N+CL₅₀/100) também levou a um aumento significativo na intensidade de imunomarcção quando comparado ao efeito desses estressores isolados (grupos Nosema e CL₅₀/100) (Figura 4 II).

12 dias:

Após 12 dias, a intensidade de imunomarcção do grupo Controle diferiu estatisticamente dos grupos Nosema, CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/100 (Figura 4 III).

A intensidade na imunomarcção de sinapsina aumentou para grupo Nosema e, assim, ele diferiu estatisticamente dos grupos CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100 (Figura 4 III).

Na concentração mais baixa do imidacloprido (CL₅₀/1000) houve aumento significativo na intensidade da imunomarcção de sinapsina quando comparada aos outros grupos experimentais, exceto Nosema (Figura 4 III).

Os grupos que sofreram a ação conjunta do microsporídeo e do imidacloprido (N+CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/100) diferiram entre si (Figura 4 III).

O grupo N+CL₅₀/100 apresentou uma diminuição significativa na imunomarcção da sinapsina quando comparado aos demais grupos (Figura 4 III).

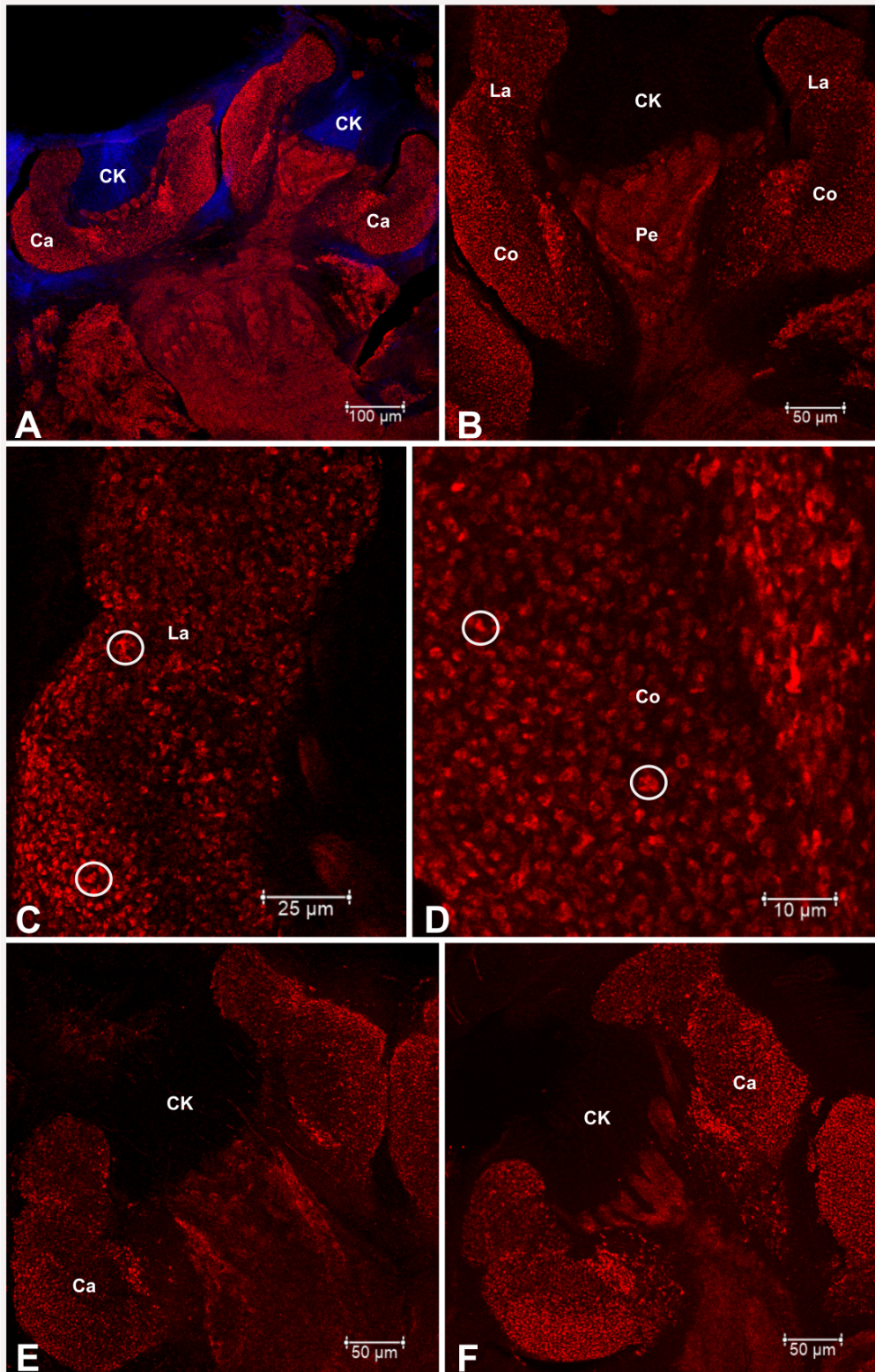


Figura 3: Corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizada imunomarcados com sinapsina em vermelho e DAPI em azul. (A) visão geral dos corpos pedunculados de um dos hemisférios do cérebro, (B) detalhe de um dos corpos pedunculados da imagem A, (C) detalhe da região do lábio do corpo pedunculado mostrado em B, (D) detalhe da região do colar do corpo pedunculado mostrado em B. Corpos pedunculados dos grupos (E) Controle 12 dias e (F) N+CL₅₀/1000 12 dias. Os círculos indicam microglomérulos com marcação positiva para sinapsina. As siglas indicam: Ca- cálice, CK- células de Kenyon, La- lábio, Co- colar e Pe- pedúnculo.

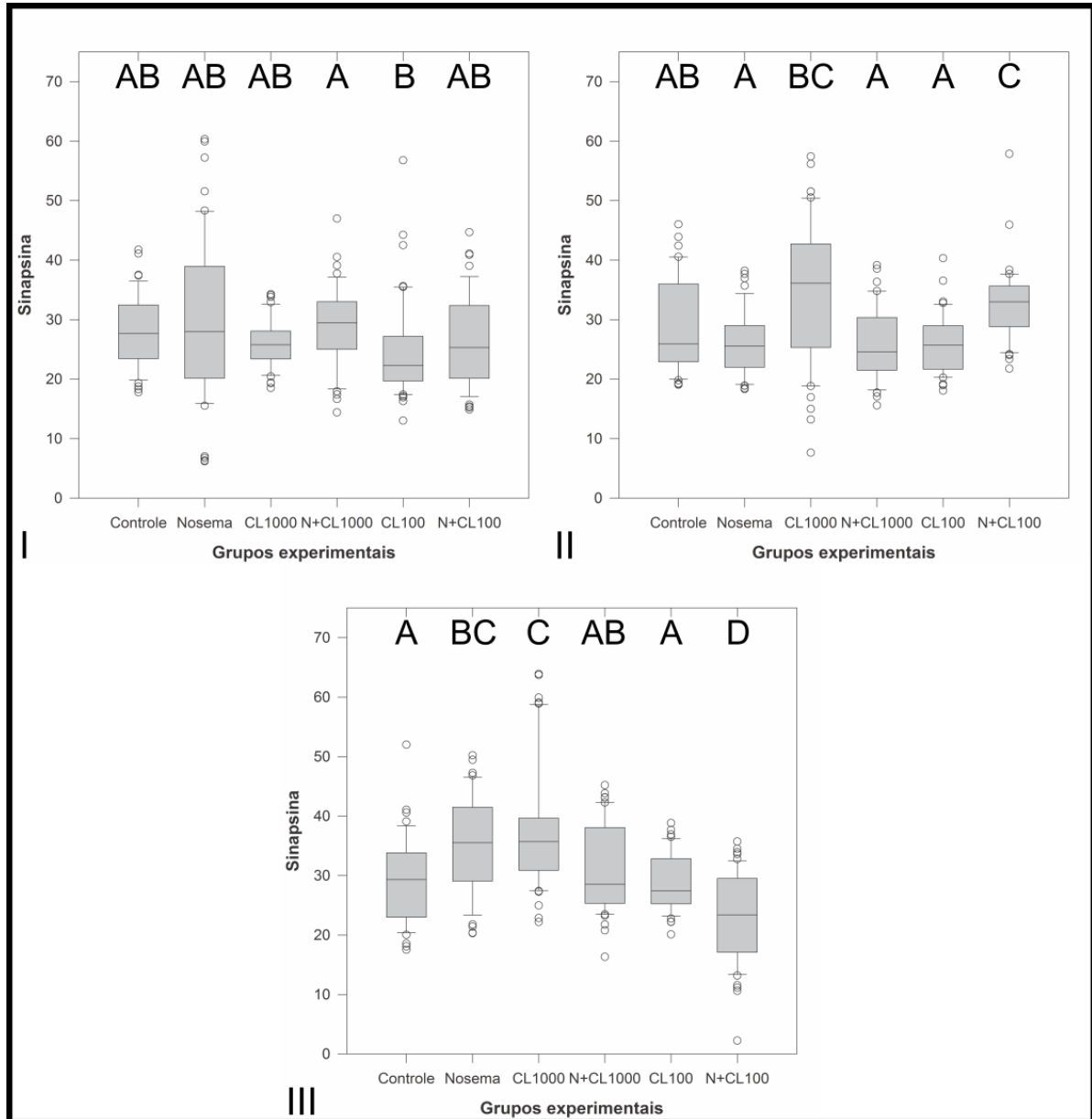


Figura 4: Intensidade da imunomarcção de sinapsina dos corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizada para 1(I), 6(II) e 12(III) dias de bioensaio. As letras no topo dos gráficos representam os resultados estatísticos das comparações entre a quantificação das células glias dos diferentes grupos experimentais, sendo que letras diferentes indicam significância $p < 0,05$ (Kruskall-Wallis, Dunn). As siglas CL1000, N+CL1000, CL100 e N+CL100 correspondem, respectivamente, aos grupos CL₅₀/1000, N+CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100.

Imunomarcção da HSP 70

A imunomarcção positiva para HSP 70 foi visualizada no citoplasma das células de Kenyon (Figura 5) e as intensidades mensuradas desta proteína foram dependentes do tempo e dos grupos experimentais.

1 dia:

Houve aumento na intensidade da imunomarcção para a HSP 70 no grupo exposto simultaneamente à *N. ceranae* e ao imidacloprido na concentração de 0,075 ng/ μ L (N+CL₅₀/100), o que levou a diferença estatística desse grupo com os grupos Controle e Nosema (Figura 6 I).

O grupo CL₅₀/1000 foi o que apresentou a menor intensidade na imunomarcção da HSP 70 e, assim, diferiu dos grupos Nosema, CL₅₀/100, N+CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/100 (Figura 6 I).

6 dias:

O grupo Controle diferiu estatisticamente dos grupos Nosema, N+CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100, dos quais o grupo CL₅₀/100 apresentou um aumento na intensidade de imunomarcção de HSP 70, enquanto os outros apresentaram diminuição (Figura 6 II).

Houve diferença significativa entre as duas concentrações subletais do imidacloprido testadas (CL₅₀/1000 e CL₅₀/100) (Figura 6 II).

A intensidade da imunomarcção da HSP 70 foi maior nos grupos expostos ao imidacloprido (CL₅₀/1000 e CL₅₀/100) quando comparada as imunomarcções dos grupos Nosema, N+CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/100 (Figura 6 II).

12 dias:

O grupo Nosema apresentou aumento na intensidade da imunomarcção da HSP 70 e, dessa forma, diferiu estatisticamente do Controle e dos grupos CL₅₀/1000, N+CL₅₀/1000 e CL₅₀/100 (Figura 6 III).

O grupo N+CL₅₀/100 apresentou aumento significativo da imunomarcção da HSP 70 quando comparado ao Controle.

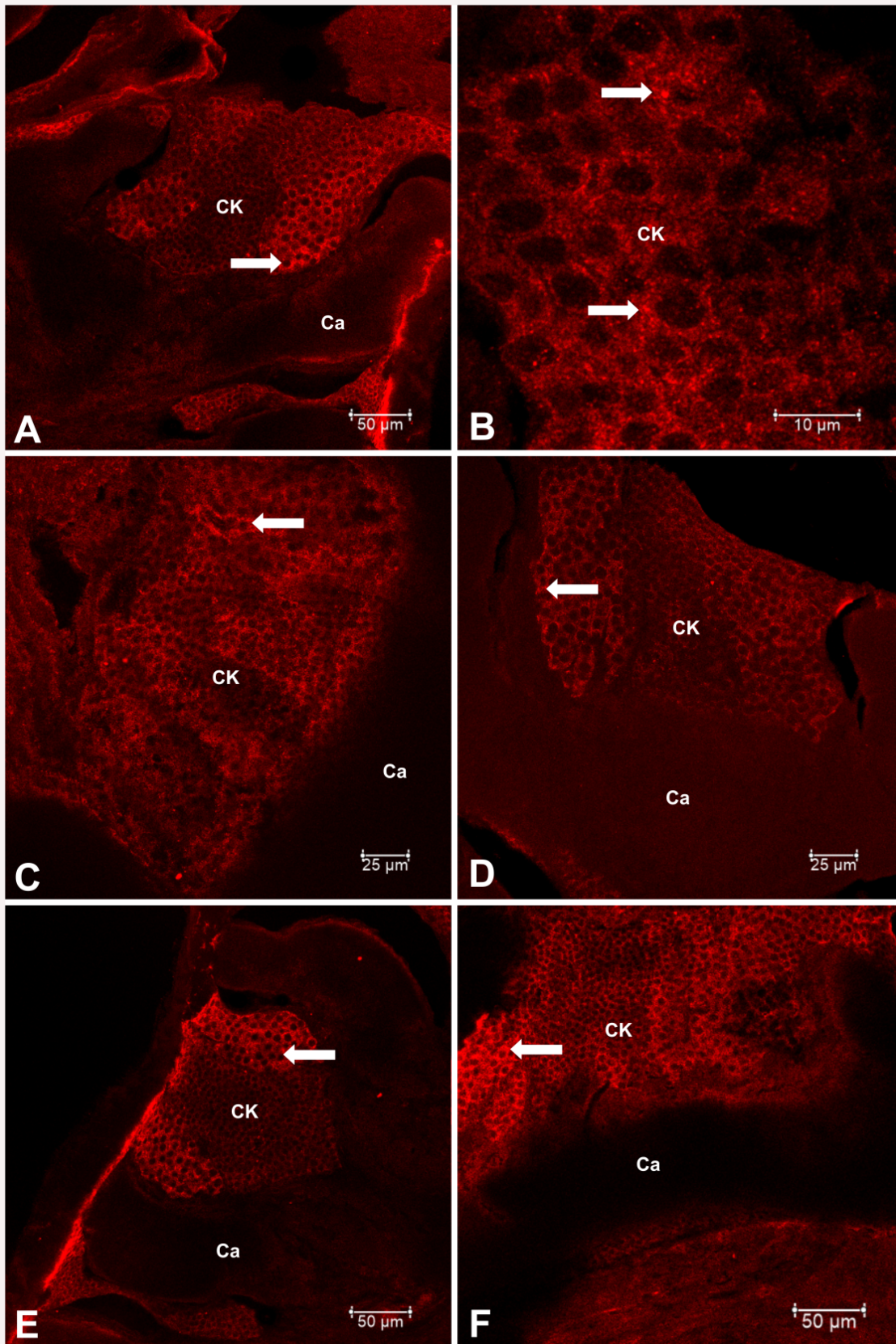


Figura 5: Corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizada imunomarcados com HSP 70 em vermelho dos grupos (A) N+CL₅₀/1000 1 dia, (B) CL₅₀/1000 6 dias, (C) Nosema 6 dias, (D) N+CL₅₀/1000 6 dias e (E) N+CL₅₀/1000 12 dias (F). As seta apontam imunomarcção positiva para HSP 70. As siglas indicam: Ca- cálice e CK- células de Kenyon.

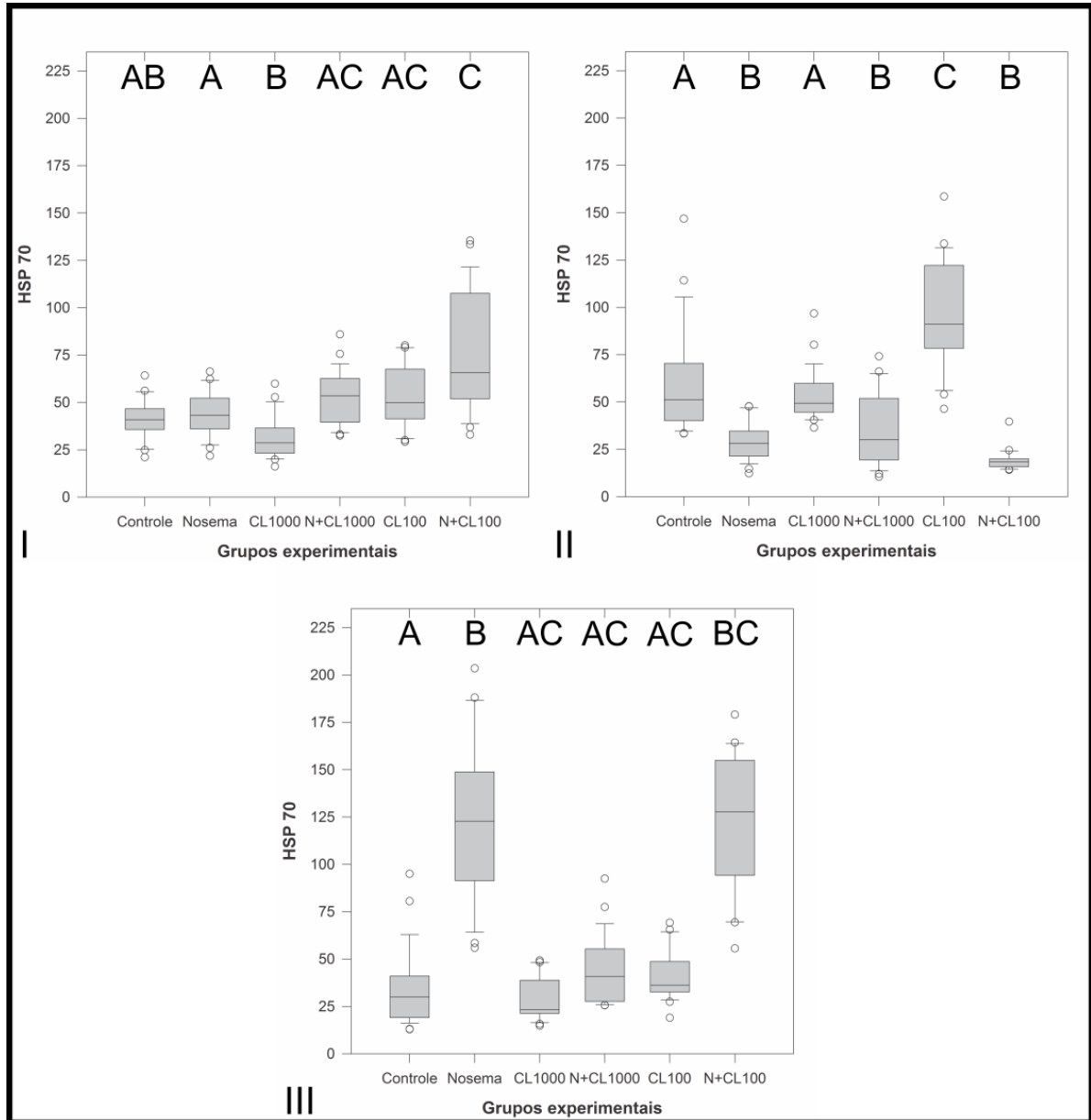


Figura 6: Intensidade da imunomarcação de HSP 70 dos corpos pedunculados de abelhas *A. mellifera* africanizada para 1(I), 6(II) e 12(III) dias de bioensaio. As letras no topo dos gráficos representam os resultados estatísticos das compara es entre a quantifica o das células glias dos diferentes grupos experimentais, sendo que letras diferentes indicam significância $p < 0,05$ (Kruskall-Wallis, Dunn). As siglas CL1000, N+CL1000, CL100 e N+CL100 correspondem, respectivamente, aos grupos CL₅₀/1000, N+CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100.

Discussão

A ausência de diferenças nas intensidades de imunomarca o da sinapsina e da HSP 70 um e 6 dias após a infec o por *N. ceranae* podem ser explicadas pelo tempo que o microsporídio demora para completar o ciclo de infec o no interior das células do intestino e causar danos ao organismo. Ao serem ingeridos, os microsporídios infectam as células

epiteliais do intestino do hospedeiro, onde se replicam e produzem novos esporos (Gisder et al., 2011). De 3 a 6 dias após a infecção das abelhas, os níveis de esporos são baixos no intestino, porém do 9º ao 12º dias os níveis de esporos aumentam consideravelmente (Porrini et al., 2011; Soares-Lima et al., 2017b). Isso explica, também, o aumento da intensidade da imunomarcção da sinapsina e da HSP 70, após 12 dias do início da infecção, quando comparados o grupo *Nosema* com o grupo Controle.

Embora o parasita cause danos no sistema digestório das abelhas (Soares-Lima et al., 2017b), isto pode ter se refletido no sistema nervoso, que desencadeou respostas para que o organismo reagisse aos efeitos nocivos sofridos. Em resposta ao parasitismo, abelhas infectadas por *V. destructor* ou *N. ceranae* tiveram regulação da expressão gênica no cérebro (McDonnell et al., 2013).

Para garantir a homeostase corporal e equilibrar as funções fisiológicas diante dos agentes estressores, como variações de temperatura, exposição a substâncias tóxicas, hipóxia e estresse oxidativo, a síntese das HSPs pode ocorrer para compensar as perturbações celulares causadas (Feder e Hofmann, 1999; Yenari et al., 1999), auxiliando na síntese, dobramento ou direcionamento para a degradação de proteínas e na preservação da viabilidade celular por atuar como anti-apoptótica (Meyer e Bukau, 2005; Gupta et al., 2007).

O modo de ação do imidacloprido e a hiperexcitação causada por ele (Buckingham et al., 1997; Suchail et al., 2004) são possíveis explicações para o aumento da imunomarcção da sinapsina, observado no grupo CL₅₀/1000, aos 12 dias de experimentação. Uma vez que o anticorpo 3C11 anti-SYNORF1 reconhece o fragmento clivado das sinapsinas, sua imunomarcção acontece nas zonas sinápticas ativas.

A condução do impulso nervoso ocorre devido à despolarização dos neurônios, que, por sua vez, provoca o influxo de cálcio (Ca⁺²). O aumento intracelular nos níveis de íons cálcio leva à fosforilação da sinapsina, que permite a exocitose das vesículas sinápticas.

As vesículas sinápticas se organizam funcionalmente em três conjuntos: conjuntos de vesículas prontamente liberáveis, conjuntos de vesículas recicláveis e conjunto de vesículas de reserva. A sinapsina mantém a dinâmica entre os conjuntos de vesículas através de sua fosforilação ou desfosforilação que envolvem muitas vias e sítios diferentes (Hilfiker et al., 1999; Bykhovskaia, 2011).

A exposição ao inseticida pode fazer com que a ativação das sinapsinas seja aumentada, devido à maior demanda dessa durante a hiperexcitação do sistema nervoso, situação na qual a dinâmica entre os conjuntos de vesículas sinápticas acontece de forma contínua e a formação das vesículas de neurotransmissores, sua ancoragem, agrupamento e

exocitose são intensificados. Nesse caso, pode-se supor que o aumento da detecção de sinapsina esteja relacionado ao aumento da atividade sináptica em decorrência da ação do imidacloprido.

Corroborando esses resultados, o trabalho de Cintra-Socolowski et al. (2015) mostrou aumento nos níveis de sinapsina nos corpos pedunculados de formigas *Atta sexdens rubropilosa* expostas topicamente ao inseticida fipronil que, apesar de não ser um inseticida neonicotinoide, também conduz à morte do inseto por hiperexcitação.

Autores mostraram que quantidades distintas de imidacloprido levam a diferentes respostas sinápticas (Peng e Yang, 2016). A imunomarcação da sinapsina do grupo CL₅₀/100 permaneceu semelhante ao Controle com o passar do tempo, porém nota-se aumento na expressão de HSP 70 e do número de células gliais após 6 e 12 dias de exposição ao inseticida, respectivamente. Neste contexto, a HSP 70 estaria atuando como citoprotetora e tentando reparar os possíveis danos provocados pelo inseticida em 6 dias. Aos 12 dias, porém, a proliferação glial indica que houve injúria ao tecido nervoso.

A proliferação das células gliais foi associada à danos neuronais por Kato et al. (2009), que mostraram que a ablação das antenas de moscas *Drosophila* provocou a morte celular dos neurônios sensoriais e a consequente divisão celular glial no cérebro desses insetos.

As células gliais do sistema nervoso central de vertebrados têm uma atuação fagocítica de detritos celulares. Esta atuação pode ser intensificada em lesões, assim como, a perda de tecido neural leva a um recrutamento das células gliais para facilitar a reorganização dos circuitos neuronais (Neumann et al., 2009).

Nas abelhas do grupo N+CL₅₀/1000, o aumento do número de células gliais veio acompanhada da diminuição significativa na expressão de HSP 70, no 6º dia do bioensaio. Em condições de danos celulares graves, decorrentes da exposição a contaminantes ambientais, a detecção de HSP 70 no tecido pode ser menor que os níveis basais (Köhler et al., 1999). Esses resultados mostram que a morte celular, indicada pelo aumento glial, acontece quando a HSP 70 deixa de atuar na proteção dos neurônios.

Outro resultado intrigante desse trabalho foi o comportamento neural dos corpos pedunculados de abelhas do grupo N+CL₅₀/100. No primeiro dia de análise houve um aumento da expressão de HSP 70. Aos 6 dias, nota-se aumento significativo na imunomarcação da sinapsina e, em contrapartida, com 12 dias após a infecção por *N. ceranae* e consumo do imidacloprido, os níveis de sinapsina detectáveis diminuíram muito e diferiram do Controle e dos demais grupos experimentais. Aos 12 dias ainda, este grupo teve aumento

significativo da imunomarcagem de HSP 70 e do número de células gliais quando comparado ao grupo Controle.

Assim que o organismo fica exposto aos fatores estressantes, a primeira resposta das células neurais é aumentando a expressão de HSP 70. Com 6 dias, os danos provocados pelo parasita ao epitélio digestório fazem com que maior quantidade do inseticida chegue à hemolinfa e atinja os corpos pedunculados, causando hiperexcitação e consequente aumento da atividade sináptica. A constante hiperexcitação dos neurônios levaria ao esgotamento dos conjuntos de vesículas de neurotransmissores, as quais não precisariam mais serem moduladas pela sinapsina e, assim, a fosforilação desta proteína seria inibida aos 12 dias.

A morte dos neurônios ou a falta de ATP também podem diminuir a quantidade de sinapsinas ativas (Huttner et al., 1983). A HSP 70 pode, ainda, proteger as células contra a privação de energia e/ou a depleção de ATP associadas à morte (Wong et al., 1998 e Kabakov et al., 2002), por isso seu aumento em 12 dias. A proliferação das células gliais é mais um indício de que, em 12 dias, o sistema nervoso está respondendo à injúria sofrida, além de ter sido demonstrado que as células gliais, em condições de estresse metabólico, também podem sintetizar e liberar HSP 70 para o meio extracelular. A HSP 70 liberada pela glia pode ser absorvida pelos neurônios para suportar suas funções (Guzhova et al., 2001).

Xu et al. (2013) mostraram que a expressão de HSP 75 no cérebro de ratos aumentou a viabilidade das células após lesões cerebrais isquêmicas, protegendo as mitocôndrias, atenuando a perda de ATP e reduzindo os níveis de espécies reativas de oxigênio e os danos oxidativos no tecido.

Nas glândulas salivares de larvas de abelhas, a HSP 70 induzida pelo estresse foi identificada nos núcleos e na região citoplasmática rica em mitocôndrias, devido ao seu efeito supressor de lesões mitocondriais e nucleares (Buzzard et al., 1998; Silva, 2002).

Creagh et al. (2000) comprovaram, ainda, que a superexpressão da HSP 70 impede a perda do potencial da membrana mitocondrial externa, o que dificulta a liberação de citocromo c e do fator indutor da apoptose (AIF), a partir da mitocôndria.

Trabalhos com abelhas sem ferrão, *Scaptotrigona postica*, expostas aos inseticidas fipronil e imidacloprido mostraram que os compostos provocaram alterações nas cristas mitocondriais das células de Kenyon do cérebro (Soares, 2012; Jacob et al., 2015). As mitocôndrias desempenham função no metabolismo celular, pois geram ATP pela fosforilação oxidativa (Junqueira e Carneiro, 2012). Uma vez alteradas as mitocôndrias, o processo de geração de ATP fica comprometido.

Dessa forma, outra hipótese para a interpretação dos resultados do presente trabalho seria que mesmo com o aumento da expressão de HSP 70 nos neurônios, o imidacloprido comprometeu as funções mitocondriais e levou à diminuição na produção de ATP. O estresse energético pode alterar a atividade de proteínas dependentes de ATP, como a da Ca^{+2} /calmodulina quinase, a qual catalisa a fosforilação da sinapsina (Hilfiker et al., 1999). A falta de ATP inibe, assim, a fosforilação da sinapsina e, conseqüentemente, não diminui a afinidade dela com a actina, evitando que a proteína fique livre no citoplasma e possa ser detectada pelo anticorpo.

Os estressores ambientais e as doenças aos quais as abelhas estão expostas não só refletem diferenças na sobrevivência, facilmente notáveis (Soares-Lima et al., 2017b), mas podem levar a alterações fisiológicas no cérebro e, conseqüentemente, comportamentais que, por sua vez, podem comprometer a dinâmica de atividades para manutenção de toda a colônia (Decourtye et al., 2004; Gill et al., 2012; Whitehorn et al., 2012; Williamson e Wright, 2013; Williamson et al., 2014).

Conclusões

As abelhas expostas a concentrações encontradas em campo do inseticida imidacloprido e infectadas pelo microsporídio causador da nosemose podem ocasionar alterações na função dos corpos pedunculados, uma vez que ambos os estressores comprometeram a atividade sináptica, levaram as células de Kenyon a um possível estresse energético e causaram danos que foram indiretamente observados pelo aumento no número de células gliais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP (2013/09555-5; 2012/13370-8), à Dr^a. Erica Weinstein Teixeira pela identificação da espécie do microsporídio de trabalho e à MSc. Tatiane Caroline Grella e Isabella Camargo pelo auxílio na realização dos bioensaios.

Referências

Allen-Wardell, G., Bernhardt, P., Buchmann, S., Cane, J., Cox, P.A., Dalton, V., Feinsinger, P., Ingram, M., Inouye, D., Jones, C.E., Kennedy, K., Kevan, P., Koopowitz, H., Medellin, R., Medellin-Morales, S., Nabhan, G.P., Pavlik, B., Tepedino, V., Torchio, P., Walker, S., 1998. The potential consequences of pollinator declines on conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conserv. Biol.* 12(1), 8-17.

- Antúñez, K., Matín-Hernández, R., Preito, L., Meana, A., Zunido, P., Higes, M., 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* 11(9), 2284-2290. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x
- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Viguès, B., Belzinces, L.P., Delbac, F., Blot, N., 2012. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* 2(326), 1-7. doi: 10.1038/srep00326
- Aufauvre, J., Misme-Acouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F., Blot, N., 2014. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *Plos One* 9(3), 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0091686
- Benfenati, F., 2011. Synapsins – Molecular function, development and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22(4), 377. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.07.016
- Buckingham, S.D., Lapied, B., Le Corronec, H., Grolleau, F., Sattelle, D.B., 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J. Exp. Biol.* 200(21), 2685-2692.
- Buzzard, K.A., Giaccia A.J., Killender, M., Anderson, R.L., 1998. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 17147–17153. doi: 10.1074/jbc.273.27.17147
- Bykhovskaia, M., 2011. Synapsin regulation of vesicle organization and functional pools. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22(4), 387-392. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.07.003
- Carlson, S.D., Saint Marie, R.L., 1990. Structure and function of insect glia. *Annu. Rev. Entomol.* 35, 597-621. doi: 10.1146/annurev.en.35.010190.003121
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D., Pettis, J.S., 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J. Insect Physiol.* 58, 1090-1095. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.04.016
- Chen, Y.F., Chiang, H.M., Tan, T.W., Lai, J.S., Tsai, H.Y., 2002. The influence of noise stress-induced pain-threshold increase on central monoaminergic neurons. *Mid-Taiwan J. Med.* 7, 135-145. doi: 10.6558/MTJM.2002.7(3).1
- Cintra-Socolowski, P., Roat, T.C., Nocelli, R.C.F., Nunes, P.H., Ferreira, R.A.C., Malaspina, O., Bueno, O.C., 2015. Sublethal doses of fipronil intensify synapsin immunostaining in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) brains. *Pest Manag. Sci.* 72, 907-912. doi: 10.1002/ps.4065
- Creagh E.M., Carmody R.J., Cotter T.G., 2000. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp. Cell Res.* 257, 58–66. doi: 10.1006/excr.2000.4856
- Cresswell, J.E., 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology* 20(1), 149-157. doi: 10.1007/s10646-010-0566-0
- Cruz-Landim, C., 2009. Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: 1st ed. Unesp press, São Paulo. ISBN: 9788571399273
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., Pham-Delègue, M.H., 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and

- laboratory conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57(3), 410-419. doi: 10.1016/j.ecoenv.2003.08.001
- Dively, G.P., Kamel, A., 2012. Insecticide residues in pollen and nectar of a Cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *J. Agric. Food Chem.* 60(18), 4449–4456. doi: 10.1021/jf205393x
- Fahrbach, S.E., 2006. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. *Ann. Rev. Entomol.* 51, 209-232. doi: 10.1146/annurev.ento.51.110104.150954
- Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T., Fellk, R., 2014. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environ. Toxicol. Chem.* 33(4), 719-731. doi: 10.1002/etc.2527
- Farris, S.M., Robinson, G.E., Davis, R.L., Fahrbach, S. E., 1999. Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 414, 97-113. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19991108)414:1<97::AID-CNE8>3.0.CO;2-Q
- Farris, S.M., Sinakevitch, I., 2003. Development and evolution of the insect mushroom bodies: towards the understanding of conserved developmental mechanisms in a higher brain center. *Arthropod Struct. Dev.* 32(1), 79-101. doi: 10.1016/S1467-8039(03)00009-4
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Ann. Rev. Physiol.* 61, 243-282. doi: 10.1146/annurev.physiol.61.1.243
- Gartner, L.P., Hiatt, J.L., 2007. *Tratado de histologia em cores*, 3rd ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O., Raine, N.E., 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature* 491, 105-109. doi: 10.1038/nature11585
- Gisder, S., Möckel, N., Linde, A., Genersch, E., 2011. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environ. Microbiol.* 13(2), 404-413. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x
- Godenschewege, T.A., Reisch, D., Diegelmann, S., Eberle, K., Funk, N., Heisenberg, M., Hoppe, V., Hoppe, J., Klagges, B.R.E., Matin, J.R., Nikitina, E.A., Putz, G., Reifegerste, R., Reisch, N., Rister, J., Schaupp, M., Scholz, H., Schwarzel, M., Werner, U., Zars, T.D., Buchner, S., Buchner, E., 2004. Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behavior. *Eur. J. Neurosci.* 20, 611-622. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03527.x
- Gregorc, A., Bowen I.D., 1998. Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Cell Biol. Int.* 22, 137-144. doi: 10.1006/cbir.1998.0232
- Gregorc, A., Bowen I.D., 1999. In situ localization of heat-shock and histone proteins in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae infected with *Paenibacillus larvae*. *Cell Biol. Int.* 23, 211-218. doi: 10.1006/cbir.1999.0344
- Gregorc, A., Silva-Zacarin, E.C.M., Carvalho, S.M., Karamberger, D., Teixeira E.W., Malaspina, O., 2016. Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. *Chemosphere* 147, 328-336. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.12.030

- Gupta, S.C., Siddique, H.R., Mathur, N., Vishwakarma, A.L., Mishra, R.K., Saxena, D.K., Chowdhuri, D.K., 2007. Induction of hsp70, alterations in oxidative stress markers and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila melanogaster*: Modulation by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta., Gen. Subj.* 1770(9), 1382-1394. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.05.010
- Guzhova, I., Kislyakova, K., Moskaliyova, O., Fridlanskaya, I., Tytell, M., Cheetham, M., Margulis, B., 2001. In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res.* 914(1-2), 66-73. doi: 10.1016/S0006-8993(01)02774-3
- Guzmán-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., McGowan, J., Kelly, P.G., Correa-Benítez, A., 2010. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie* 41, 433-450. doi: 10.1051/apido/2009076
- Hahnlein, I., Bicker, G., 1996. Morphology of neuroglia in the antennal lobes and mushroom bodies of the brain of the honeybee. *J. Comp. Neurol.* 376, 235-245. 10.1002/(SICI)1096-9861(19960401)367:2<235::AID-CNE6>3.0.CO;2-6
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 211-217. doi: 10.1016/j.jip.2006.11.001
- Hilfiker, S., Pieribone, V.A., Czernik, A.J., Kao, H., Augustine, G.J., Greengard, P., 1999. Synapsin as regulators of neurotransmitter release. *Philos. Trans. T. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 354, 269-279. doi: 10.1098/rstb.1999.0378
- Hranitz, J.M., Barthell, J.F., Abramson, C.I., Brubaker, K.D., Wells, H., 2009. Stress protein responses in honey bees: is it useful to measure stress responses of individual bees in the hive? *Uludag Bee J.* 9(2), 60-71.
- Humeau, Y., Candiani, S., Ghirardi, M., Poulain, B., Montarolo, P., 2011. Functional roles of Synapsins: lessons from invertebrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22(4), 425-433. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.07.018
- Huttner, W.B., Schiebler, W., Greengard, P., De Camilli, P., 1983. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J. Cell Bio.* 96(5), 1374-1388. PMID: PMC2112660
- Jacob, C.R.O., Soares, H.M., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2015. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. *Pest Manag. Sci.* 71(1), 114-122. doi: 10.1002/ps.3776
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2012. *Biologia celular e molecular*. Ninth ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Kabakov, A.E., Budagova, K.R., Latchman, D.S., Kampinga, H.H., 2002. Stressful preconditioning and HSP70 overexpression attenuate proteotoxicity of cellular ATP depletion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C521-C534. doi: 10.1152/ajpcell.00503.2001
- Kato, K., Awasaki, T., Ito, K., 2009. Neuronal programmed cell death induces glial cell division in the adult *Drosophila* brain. *Development* 136, 51-59. doi:10.1242/dev.023366
- Kerr, W.E., Carvalho, G.A., Silva, A.C., Assis, M.G.P., 2001. *Parcerias Estratégicas*. 12: 20-41.

- Kiya, T., Kunieda, T., Kubo, T., 2007. Increased neural activity of a mushroom body neuron subtype in the brains of forager honeybees. *Plos One*. 2(4), 371. doi: 10.1371/journal.pone.0000371
- Köhler, Heinz-R., Eckwert, H., Triebkorn, R., Bengtsson, G., 1999. Interaction between tolerance and 70 kDa stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution. *Appl. Soil Ecol.* 11, 43-52. doi: 10.1016/S0929-1393(98)00127-9
- Komischke, B., Sandoz, J-C., Malun, D., Giurfa, M., 2005. Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. *Eur. J. Neurosci.* 21(2), 477-485. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03879.x
- Kretschmar, D., Pflugfelder, G.O., 2002. Glia in development, function, and neurodegeneration of adult insect brain. *Brain Res. Bull.* 57(1), 121-131. doi: 10.1016/S0361-9230(01)00643-8
- Llinás, R., McGuinness, T.L., Leonard, C.S., Sugimori, M., Greengard, P., 1985. Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 3035-3039.
- Mallon, E.B., Brockmann, A., Schmid-Hempel, P., 2003. P. Immune response inhibits associative learning in insects. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 2471-2473. doi: 10.1098/rspb.2003.2456
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6
- McDonnell, C.M., Alaux, C., Parrinello, H., Desvignes, J.P., Crauser, D., Durbesson, E., Beslay, D., Le Conte, Y., 2013. Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *BMC ecol.* 13, 1-25. doi: 10.1186/1472-6785-13-25
- Menzel, R., 1983. Neurobiology of learning and memory: the honeybee as a model system. *Naturwissenschaften* 70, 504-511. doi:10.1007/BF00394056
- Menzel, R., 2001. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn. Mem.* 8, 53-62. doi:10.1101/lm.38801
- Michels, B., Diegelmann, S., Tanimoto, H., Schwenkert, I., Buchener, E., Gerber, B., 2005. A role for synapsin in associative learning: The *Drosophila* larva as a study case. *Learn. Mem.* 12, 224-231. doi: 10.1101/lm.92805
- Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Denis-Larose, C., Massie, B., 1997. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17(9), 5317-5327. doi: 10.1128/MCB.17.9.5317
- Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Meriin, A.B., Sherman, M.Y., Morimoto, R.I., Massie, B., 2000. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 20(10), 7146-7159. doi: 10.1128/MCB.20.19.7146-7159.2000
- Neumann, H., Kotter, M.R., Franklin, R.J.M., 2009. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132, 288-295. doi: 10.1093/brain/awn109

- Peng, Y.C., Yang, E.C., 2016. Sublethal dosage of imidacloprido reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Sci. Rep.* 6, 1-13. doi: 10.1038/srep19298
- Pentreath, V.W., 1989. Invertebrate glial cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 93A(1), 77-83. doi: 10.1016/0300-9629(89)90194-1
- Pham-Delègue, M.-H., Decourtye, A., Kaiser, L., Devillers, J., 2002. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie* 33(5), 425-432. doi: 10.1051/apido:2002033
- Porrini, M.P., Sarlo, E.G., Medici, S.K., Garrido, P.M., Porrini, D.P., Damiani, N., Eguaras, M.J., 2011. *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. *J. Apic. Res.* 50(1), 35-41. doi: 10.3896/IBRA.1.50.1.04
- Rasband, W.S., 1997-2016. ImageJ, U.S. Natl. Inst. Health. <https://imagej.nih.gov/ij>
- Rybak, J., Menzel, R., 1993. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. *J. Comp. Neurol.* 334(3), 444-465. doi: 10.1002/cne.903340309
- Sánchez-Bayo, F., Desneux, N., 2015. Neonicotinoids and the prevalence of parasites and disease in bees. *Bee World* 92(2), 30-55.
- Silva, E.C.M., 2002. Glândulas salivares larvais das abelhas, in: Cruz-Landim C., Abdalla F.C. (Eds.), Glândulas exócrinas das abelhas. Funpec, Ribeirão Preto/Brasil, pp. 21-49.
- Silva-Zacarin, E.C.M., Gregorc, A., Silva de Mores, R.L.M., 2006. In situ localisation of heat-shock proteins and cell death labelling in the salivary gland of acaricide-treated honeybee larvae. *Apidologie* 37, 507-517. doi: 0.1051/apido:2006030
- Soares, H.M., 2012. Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências - UNESP, Rio Claro.
- Soares-Lima, H.M., Carvalho, S.M., Dorigo, A.S., Silva-Zacarin, E.C.M., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2017a. Larvae are more tolerant to imidacloprid than adult honeybees. Submetido para Environmental Toxicology Chemistry. Capítulo 01 dessa Tese.
- Soares-Lima, H.M., Grella, T.C., Silva-Zacarin, E.C.M., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2017b. Exposição à *Nosema ceranae* e ao imidacloprido causam estresse e morte celular no intestino e túbulos de Malpighi de abelhas *Apis mellifera* africanizada. Elaborado para submissão à Plos One. Capítulo 02 dessa tese.
- Suchail, S., Debrauwer, L., Belzunces, L.P., 2004. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest. Manag. Sci.* 60(3), 291-296. doi: 10.1002/ps.772
- Systat Software, San Jose, CA, USA. www.sigmaplot.com
- Takayama, S., Reed, J.C., Homma, S., 2003. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 22, 9041-9047. doi: 10.1038/sj.onc.1207114
- Treherne, J.E., Shofield, P.K., 1981. Mechanisms of ionic homeostasis in the central nervous system of an insect. *J. Exp. Biol.* 95, 61-73.
- Tsacopoulos, M., Magistretti, P.J., 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* 16(3), 877-885.

Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D., 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336(6079), 351-352. doi: 10.1126/science.1215025

Williamson, S.M., Wright, G.A., 2013. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *J. Exp. Biol.* 216, 1799-1807. doi: 10.1242/jeb.083931

Williamson, S.M., Willis, S.J., Wright, G.A., 2014. Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. *Ecotoxicology* 23, 1409-1418. doi: 10.1007/s10646-014-1283-x

Wong, H.R., Menendez, I.Y., Ryan, M.A., Denenberg, A.G., Wispe, J.R., 1998. Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia. *Am. J. Physiol.* 275, 836-841.

Xu, L., Voloboueva, L.A., Ouyang, YiB., Emery, J.F., Giffard, R.G., 2009. Overexpression of mitochondrial Hsp70/Hsp75 in rat brain protects mitochondria, reduces oxidative stress, and protects from focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29(2), 365-374. doi:10.1038/jcbfm.2008.125.

Yenari, M.A., Gilffard, R.G., Sapolsky, R.M., Steiberg, G.K., 1999. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Trends Mol. Med.* 5(12), 525-531. doi: 10.1016/S1357-4310(99)01599-3

7. CAPÍTULO 4

Este capítulo foi confeccionado para publicação na **Journal of Invertebrate Pathology** e, portanto, está editado conforme as regras da revista.

Expressão gênica e atividade enzimática em *Apis mellifera* africanizada após infecção por *Nosema ceranae* e exposição ao imidacloprido

Hellen Maria Soares Lima^a; Franco Dani Campos Pereira^a; Jéssica Freitas Araújo^b; Elaine Cristina Mathias Silva Zacarin^c; Maria Aparecida Marin Morales^a; Roberta Cornélio Ferreira Nocelli^b; Osmar Malaspina^a.

^a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

^b Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Araras, São Paulo, Brasil.

^c Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Humanas e Biológicas, Departamento de Biologia, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

HIGHLIGHTS

- *N. ceranae* e imidacloprido levam à imunossupressão em *Apis mellifera* africanizada;
- Os estressores não alteraram a atividade da GST no intestino e causaram subexpressão da caspase-3;
- Atividade enzimática de AChE e CaE na cabeça refletem o mecanismo de ação do imidacloprido.

Resumo

A alta densidade de abelhas sociais em uma colônia e a grande interação entre elas pela trofalaxis e limpeza uma das outras, são hábitos com potencial para a rápida propagação de doenças. O exoesqueleto constitui importante barreira de defesa do organismo dos insetos, que, caso seja ultrapassada, ativa o sistema imune por meio das respostas celular ou humoral. A resposta imune celular é decorrente da ação dos hemócitos que fagocitam, regeneram o tegumento ou sintetizam peptídeos relacionados à resposta humoral. O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de expressão de genes relacionados à resposta imune humoral e dos genes caspase 1 e 3, envolvidas na apoptose, em abelhas infectadas pelo microsporídio *Nosema ceranae*, causador da nosebose, e/ou expostas ao imidacloprido, inseticida neonicotinoide amplamente utilizado nas áreas de cultivo. Além disso, foram mensuradas as atividades teciduais das enzimas acetilcolinesterase (AChE), carboxilesterase-3 (CaE) e glutathione-S-transferase (GST), assim como foi feita a contagem de hemócitos circulantes na hemolinfa. Os resultados mostraram diminuição no número de hemócitos e subexpressão da abaecina, apidaecina, defensina 1, defensina 2, himenoptaecina e glucose desidrogenase, indicando que a infecção por *N. ceranae*, associada à exposição ao imidacloprido, ocasionou comprometimento na imunidade individual e social das abelhas. Não foram observadas alterações na atividade da GST no intestino, porém a atividade aumentada das enzimas AChE e CaE na cabeça das abelhas infectadas pelo microsporídio e expostas ao inseticida, simultaneamente, refletem a neurotoxicidade do imidacloprido e o processo de biotransformação deste, respectivamente. A diminuição da expressão da caspase-3 indica que as possíveis mortes celulares observadas no organismo das abelhas expostas aos neonicotinoides e infectadas por *N. ceranae* seriam independentes de caspases.

Palavras-chave: qPCR, sistema imune, biotransformação, morte celular.

Introdução

Os hábitos de vida dos insetos sociais, particularmente das abelhas, são potencialmente propagadores de doenças, uma vez que estes apresentam uma alta densidade populacional, com homogeneidade genética, estocam alimento e possuem interações entre os indivíduos como a trofalaxis, cuidado e alimentação da cria e autolimpeza ou limpeza das outras abelhas (Schmid-Hempel, 1998).

Como estratégia para o controle de patógenos e da transmissão de doenças, as abelhas possuem comportamentos chamados de imunidade social (Cremer et al., 2007), dos quais o comportamento higiênico é o mais conhecido (Spivak e Reuter, 2001). Além dos comportamentos de imunidade social, algumas substâncias estocadas nas colônias, como o mel e, principalmente, a própolis, têm propriedades antimicrobianas (Spivak e Gilliam, 1998; Simone et al., 2009).

Com relação à imunidade individual, barreiras exercidas pelo exoesqueleto, o sistema digestório e as vias respiratórias, constituem a primeira linha de defesa dos insetos (Dunn, 1986; Bulet et al., 1999) e, caso estas barreiras sejam ultrapassadas, mecanismos de respostas imunes são ativados no combate ao agente infeccioso. O sistema imune das abelhas é inato e confere a imunidade individual ao organismo, por meio das respostas celular e humoral (Medzhitov e Janeway, 1997).

Os hemócitos são os responsáveis pela resposta imunitária celular e ficam aderidos aos órgãos ou circulantes na hemolinfa. Suas principais funções na defesa do organismo são: fagocitose, nodulação, encapsulação, regeneração do tegumento e coagulação da hemolinfa (Dimarcq et al., 1994; Lavine e Strand, 2002; Cruz-Landim, 2009). Seis tipos de hemócitos podem ser encontrados no organismo das abelhas, são eles: pró-hemócitos, granulócitos, plasmócitos, esferulócitos, encitóides e adipohemócitos. Os pró-hemócitos são pluripotentes e originam os plasmócitos e, posteriormente, os granulócitos que, por sua vez, podem, ainda, se diferenciar em qualquer outro tipo de hemócito (Gupta, 1969; Cruz-Landim, 2009).

Embora os hemócitos possam sintetizar e secretar peptídeos antimicrobianos relacionados à resposta humoral, o corpo gorduroso é tido como principal local de síntese destes. Dependendo do peptídeo, as glândulas mandibulares hipofaríngeas e as glândulas torácicas também os sintetizam (Ilyasov et al., 2012).

Estudos mostraram que a nosemose, doença provocada pelos microsporídios *Nosema apis* e *N. ceranae*, alteraram a transcrição de genes envolvidos com o sistema imune das abelhas, como o da defensina, abaecina, apidaecina, himenoptaecina, glucose desidrogenase e

lisozima (Antúnez et al., 2009; Chaimanee et al., 2012; McDonnell et al., 2013; Aufauvre et al., 2014).

Os microsporídios *Nosema* sp. são endoparasitas das células intestinais das abelhas, sendo seus esporos os responsáveis pela disseminação da doença. A nosebose ocorre na idade adulta das abelhas e sua principal via de transmissão é oral-fecal (Watanabe, 2008).

No Brasil, a doença causada pela *N. apis* praticamente desapareceu com o avanço da africanização das abelhas e, desta forma, os casos de nosebose identificados no país são atribuídos à *N. ceranae*. As abelhas *A. mellifera* africanizada têm sido infectadas pelo microsporídio há 34 anos, porém sintomas da doença pouco são notados, sugerindo uma maior tolerância à nosebose deste híbrido em comparação com as subespécies europeias (Teixeira et al., 2013).

Para *A. mellifera* europeia, foi relatado que a infecção por *Nosema* sp. causa distúrbios digestórios, comprometem a longevidade, diminuem a população das colônias e reduzem as atividades de polinização e a produção de mel (Malone et al., 1995; Chen et al., 2008; Higes et al., 2008). Tais sintomas têm feito com que a nosebose seja, frequentemente, associada ao fenômeno do desaparecimento das abelhas (Higes et al., 2008; Higes et al., 2009), juntamente com outros fatores, como o uso indiscriminado de inseticidas neonicotinoides (Chauzat et al., 2006; Ho e Cummins, 2007; Oldroyd, 2007; Yang et al., 2008).

As abelhas podem entrar em contato com esses inseticidas durante o forrageamento ou no interior das colônias pelo consumo de pólen e néctar potencialmente contaminados, uma vez que muitos deles são sistêmicos e podem ser encontrados em todas as partes da planta (Schmuck et al., 2001; Bonmatin et al., 2003; Tomizawa e Casida, 2003; Schmuck et al., 2003; Rortais et al., 2005).

As atividades de algumas enzimas no organismo das abelhas foram descritas como biomarcadoras da exposição a agrotóxicos, refletindo a integridade do sistema nervoso no caso da acetilcolinesterase (AChE) e das carboxilesterases 1, 2 e 3 (CaEs) e a desintoxicação, principalmente, no intestino, no caso da glutathione-S-transferase (GST) (Diao et al., 2006; Badiou-Bénéteau et al., 2012; Carvalho et al., 2013). A GST tem ainda importante papel antioxidante (Weirich et al., 2002).

Badiou-Bénéteau et al. (2012) e Carvalho et al. (2013) observaram aumento na atividade da GST no intestino de abelhas melíferas expostas ao tiametoxam e espinosade e modulação das carboxilesterases na cabeça de acordo com o composto, tempo de exposição e dose administrada. Entretanto, os autores não identificaram alteração na atividade de AChE, após exposição a deltametrina, fipronil, tiametoxam ou espinosade.

Concentrações subletais do neonicotinoide imidacloprido potencializam os efeitos da infecção por *N. ceranae*, diminuindo o tempo de sobrevivência das abelhas quando expostas à ambos os estressores (Pettis et al., 2012). Além disso, em estudos anteriores, foi demonstrado que esse inseticida e a infecção pelo microsporídio, isoladamente ou em conjunto, levaram a alterações nas atividades sinápticas, assim como provocaram estresse, danos e morte celular no epitélio do intestino médio e morte das células dos túbulos de Malpighi (Soares-Lima et al., 2017a; Soares-Lima et al., 2017b).

São raros os estudos que exploraram a expressão de genes que conferem imunidade e a atividade enzimática em abelhas *A. mellifera* infectadas por *Nosema* sp. e expostas à inseticidas, simultaneamente, sendo que os poucos existentes não foram realizados com o híbrido africanizado (Antúnez et al., 2009; Alaux et al., 2010; Dussaubat et al., 2012; Aufauvre et al., 2014).

Visto que as subespécies e o híbrido respondem à infecção e aos efeitos subletais dos inseticidas de forma diferentes (Gregorc et al., 2016), este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de genes relacionados à resposta imune humoral, bem como o número de hemócitos na hemolinfa, em abelhas *A. mellifera* africanizada expostas ao imidacloprido e infectadas por *N. ceranae*, de forma isolada ou conjunta. Adicionalmente, o presente estudo avaliou a expressão gênica das caspases 1 e 3 e a atividade das enzimas biomarcadoras da exposição aos neonicotinoides AChE, CaE-3 e GST.

Materiais e Métodos

Obtenção e manutenção das abelhas

Favos de cria operculados, provenientes de três colônias não parentais, foram coletados no apiário do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da UNESP, campus de Rio Claro, e transferidos para estufa de demanda bioquímica de oxigênio (32 ± 2 °C, 70% de umidade relativa) para monitoramento da emergência das abelhas. Abelhas recém-emergidas da espécie *A. mellifera* Africanizada, saudáveis e livres de *Nosema* spp., com 1 dia de idade, passaram pelo bioensaio de infecção por *N. ceranae* e/ou exposição ao imidacloprido.

Infecção por *N. ceranae* e exposição ao imidacloprido

Os esporos de *N. ceranae* foram isolados e a identificação da espécie dos mesmos foi confirmada de acordo com o protocolo desenvolvido por Higes et al. (2007). Foi preparada

uma solução de sacarose a 50% contendo cerca de 60.000 esporos por abelha, cuja concentração foi determinada usando câmara de Neubauer.

Foi oferecida as abelhas recém-emergidas uma gota (2 μL) de solução de sacarose contendo ou não esporos de *N. ceranae*. Posteriormente, essas abelhas foram acondicionadas em potes plásticos descartáveis de 250 mL (gaiolas experimentais), previamente furados e forrados com papel-filtro, e mantidas em estufa BOD (32 ± 1 °C e umidade relativa de 70%).

O inseticida imidacloprido (Sigma-Aldrich) foi solubilizado em acetona e água e, posteriormente, sucessivas diluições foram realizadas no alimento (açúcar invertido e água 1:1, v:v) para atingir as concentrações oferecidas às abelhas: o valor da concentração letal média (CL_{50}), estabelecido por Soares-Lima et al. (2017c), dividido por cem ($CL_{50}/100$ correspondente a 0,075 ng de imidacloprido/ μL de dieta) e a concentração letal média dividida por mil ($CL_{50}/1000$ correspondente a 0,0075 ng de imidacloprido/ μL de dieta).

As concentrações de 0,075 ng/ μL e 0,0075, correspondem a 61,02 ppb e 6,10 ppb, respectivamente, considerando que o alimento possuía densidade de 1,2290 g/mL e, assim, são compatíveis às concentrações residuais encontradas no pólen e néctar (Dively e Kamel, 2012).

As concentrações subletais do inseticida imidacloprido, diluídas no alimento, foram oferecidas *ad libitum* às abelhas, durante todo o período do experimento. O alimento ficou disponível nas gaiolas experimentais por meio de um microtubo plástico de 1,5 mL, furado e fixado na tampa dos potes plásticos. As abelhas do grupo controle e do grupo que passaram apenas por infecção com *N. ceranae* receberam alimento sem inseticida.

Dessa forma, este trabalho contou com os seguintes grupos experimentais: Controle (abelhas não infectadas com esporos de *N. ceranae* e não expostas ao imidacloprido); Nosema (abelhas infectadas com esporos de *N. ceranae*); $CL_{50}/1000$ (abelhas expostas a 0,0075 ng i.a./ μL); $CL_{50}/100$ (abelhas expostas a 0,075 ng i.a./ μL); N+ $CL_{50}/1000$ (abelhas infectadas com esporos de *N. ceranae* e expostas a 0,0075 ng i.a./ μL); e N+ $CL_{50}/100$ (abelhas infectadas com esporos de *N. ceranae* e expostas a 0,075 ng i.a./ μL).

As abelhas infectadas por *N. ceranae* e/ou expostas ao imidacloprido, assim como as do grupo Controle, foram coletadas 12 dias após início dos bioensaios. A confirmação da infecção das abelhas pelo microsporídio e o tempo de coleta foram baseados no trabalho de Soares-Lima et al. (2017a).

Análise quantitativa de hemócitos

Para realização da quantificação dos hemócitos, 30 abelhas de cada grupo experimental foram anestesiadas por resfriamento para extração 5 µL da sua hemolinfa, com auxílio de uma micropipeta, sendo esse volume diluído em 5 µL de solução aquosa de azul de metileno a 0,2%. Os hemócitos presentes na hemolinfa diluída em azul de metileno foram contados nas duas áreas da câmara de Neubauer, totalizando 60 contagens por grupo.

Extração de RNA e perfil de expressão genica por PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)

Para a realização do ensaio, foi extraído o RNA total, individualmente, de 9 abelhas por grupo, utilizando Trizol® Reagent (Invitrogen). O produto da extração foi visualizado em gel de agarose e a quantificação dos RNAs foi determinada utilizando o aparelho Qubit 3.0 Fluorometer e o kit Qubit RNA HS (Molecular Probes). Foi feito um pool dos RNAs extraídos dos 9 indivíduos, de cada grupo, na concentração de 350 ng/µL para a síntese do cDNA.

O cDNA foi sintetizado por meio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem) em um volume final de 20 µL, sendo a quantidade dos reagentes e os ciclos no termociclador ajustados conforme as orientações do fabricante.

As reações de qPCR foram efetuadas em placas de 96 poços usando SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Applied Biosystem) e primers específicos (Invitrogen Custom Primers) (Tabela 1).

As misturas reacionais foram preparadas com 5 µL SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), 0,75 µM de iniciadores direto e reverso, 2 µL de cDNA (1:10), em triplicata para cada grupo experimental. As reações de PCR foram realizadas no aparelho StepOne Plus® System (Applied Biosystems), nas seguintes condições: denaturação inicial e ativação enzimática por 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Como genes de referência foram utilizados a actina e o gene ribossomal RPS5.

Os resultados da amplificação foram expressos pelo número de CT (threshold cycle). Foi realizada uma quantificação relativa, que seguiu a seguinte expressão: $2^{-\Delta CT}$, na qual $\Delta CT = CT$ do gene de interesse - CT do gene de referência (Sperandei et al., 2010).

Análises enzimáticas

Para cada grupo experimental foram utilizadas 18 abelhas que tiveram suas cabeças e intestinos dissecados, após anestesia por congelamento. Os órgãos foram e agrupados de 3 em

3, totalizando 6 amostras para a cabeça e 6 para os intestinos. Cada uma das amostras foi pesada e a elas foi adicionado tampão de extração (tampão fosfato de sódio 40 mM, pH = 7,4, cloreto de sódio 10 mM e 1% de Triton X-100), em volume correspondente à 10% do peso dos órgãos, para maceração. Os órgãos foram macerados com a ajuda de um homogeneizador elétrico durante 1 min. Os extratos brutos foram centrifugados a 15.000 g, durante 20 min, a 4 °C. Após a centrifugação, os sobrenadantes contendo os extratos proteicos foram coletados e preparados para as análises.

Foram preparadas microplacas de 96 poços adicionando-se em cada poço 5 µL de extrato proteico de cada amostra, em triplicatas, e solução de dosagem da enzima avaliada. As absorbâncias foram mensuradas por 5 minutos em leitora de placas VersaMax (Molecular Devices), à 25 °C, respeitando-se o comprimento de onda adequado para cada ensaio enzimático.

Glutathione S-Transferase (avaliada no intestino)

A atividade tecidual da GST foi avaliada em meio contendo 1 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 2,5 mM de GSH (glutathione reduzida), 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e 100 mM de fosfato de sódio (pH 7,4). As leituras foram realizadas a 340 nm.

Carboxilesterase- 3 (avaliada na cabeça)

A atividade tecidual da CaE foi determinada em um meio reacional contendo acetato de p-nitrofenila 10 mM, 1,5- bis(4-allyldimethylammonium-phenyl)pentan-3-one-dibromide (BW284C51) 1 mM e tampão fosfato de sódio 500 mM (pH = 7,0). As leituras das densidades ópticas foram realizadas na faixa de comprimento de onda de 410 nm.

Acetilcolinesterase (avaliada na cabeça)

A determinação da atividade tecidual da AChE foi feita em uma solução de 100 mM tampão fosfato (pH 7,0), 0,3 mM de iodeto de acetiltiocolina, 1,5 mM de ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico). As leituras foram feitas a 412 nm.

Análises estatísticas

Para comparar as contagens de hemócitos, as taxas de variação da absorbância pelo tempo dos ensaios enzimáticos e a expressão gênica entre os diferentes grupos experimentais, os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one way, Kruskal-Wallis, Dunn para os dados não-paramétricos e ANOVA one way, Holm-Sidak para os dados paramétricos,

através do software SigmaPlot 13 (Systat Software). Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Análise quantitativa de hemócitos

O número de hemócitos circulantes na hemolinfa das abelhas diminuiu em todos os grupos experimentais quando comparados ao Controle, porém apenas os grupos infectados com a *N. ceranae* (Nosema, N+CL₅₀/1000 e N+ CL₅₀/100) foram diferiram estatisticamente do Controle (Figura 1 VIII).

Níveis de expressão gênica

O grupo de abelhas que foi infectado com *N. ceranae* (Nosema), em relação ao Controle, apresentou uma diminuição na expressão dos genes abaecina, apidaecina, defensina-1, defensina-2, glucose desidrogenase, himenoptaecina e caspase-3.

Nas abelhas expostas ao imidacloprido na menor concentração (CL₅₀/1000), os genes abaecina, apidaecina, defensina-1, defensina-2, himenoptaecina e caspase-3 apresentaram diminuição nos níveis de expressão quando comparados ao grupo Controle.

A associação entre a *N. ceranae* e o imidacloprido na menor concentração (N+CL₅₀/1000), em comparação com o Controle, levou à diminuição nos níveis de expressão dos genes abaecina, apidaecina, defensina-2, glucose desidrogenase, himenoptaecina, caspase-1 e caspase-3, porém promoveu aumento na expressão da defensina-1.

A maior concentração de imidacloprido (CL₅₀/100), suprimiu a expressão dos genes abaecina, apidaecina, defensina-1, defensina-2, himenoptaecina, caspase-3 e promoveu um aumento nos níveis de expressão dos genes da lisozima e caspase-1, quando comparada ao grupo de abelhas Controle.

O grupo de abelhas infectado por *N. ceranae* e exposto ao imidacloprido na maior concentração (N+CL₅₀/100), em comparação com o Controle, apresentou uma diminuição nos níveis de expressão dos genes abaecina, apidaecina, defensina-1, glucose desidrogenase, himenoptaecina e caspase-3.

Nas Figuras 1 I-VII estão representadas as comparações estatísticas entre os grupos experimentais para a expressão dos diferentes genes relacionados ao sistema imune. A Figura 2 mostra a expressão gênica das caspases 1 e 3.

Análises enzimáticas

As análises estatísticas dos resultados enzimáticos da GST para os intestinos, não mostraram diferenças significativas entre os grupos (Figura 3 III).

A atividade tecidual da acetilcolinesterase aumentou significativamente no grupo infectado a *N. ceranae* e exposto à maior concentração do inseticida (N+CL₅₀/100), em comparação com o Controle e com os demais grupos (Figura 3 I).

A CaE-3 teve sua atividade tecidual aumentada nos grupos N+CL₅₀/1000 e N+CL₅₀/100 em relação ao Controle (Figura 3 II).

Discussão

Os resultados indicam que a infecção das abelhas por *N. ceranae* e/ou o inseticida imidacloprido em concentrações residuais encontradas no pólen e no néctar ocasionaram imunossupressão humoral das abelhas, além de reduzir a contagem do número de hemócitos circulantes na hemolinfa.

Todos os grupos experimentais tiveram uma redução na contagem de hemócitos, porém apenas aqueles que estavam infectados com *N. ceranae* mostraram-se significativos em relação ao Controle. Corroborando esses resultados, a expressão da glucose desidrogenase também foi diminuída apenas nos grupos de abelhas que foram infectadas com esporos de *N. ceranae* isoladamente ou em associação com o imidacloprido. A glucose desidrogenase pode ser utilizada como marcador do início da ativação da resposta imune celular, uma vez que essa enzima foi encontrada nos plasmócitos e participa das reações de encapsulação (Cox-Foster e Stehr, 1994; Lovallo e Cox-Foster, 1999).

A glucose desidrogenase está relacionada, ainda, com a metabolização de carboidratos e seu papel no organismo das abelhas é essencial, visto que a dieta delas é rica desses compostos (Kunieda et al., 2006). A diminuição da expressão gênica dessa enzima, associada a outros efeitos provocados pela *N. ceranae* nas células intestinais, explicaria o fato da nosemose ocasionar estresse nutricional e energético nas abelhas (Mayack e Naug, 2009).

Brandt et al. (2016) sugeriram que os neonicotinoides imidacloprido, tiacloprido e clotianidina reduzem a imunocompetência das abelhas por ocasionarem, até mesmo em concentrações realísticas encontradas em campo, a diminuição do número de hemócitos e da atividade de encapsulação e melanização desses.

Abdalla e Domingues (2015) identificaram hemócitos associados, juntamente com células do corpo gorduroso e pericárdicas, ao vaso dorsal na região do abdômen de abelhas

Bombus morio e discutiram que esse sistema, chamado de hepato-nefrocítico pelos autores, consistiria em importante barreira a xenobióticos.

A redução na contagem de hemócitos circulantes na hemolinfa nem sempre refletem a imunossupressão, uma vez que eles podem ser encontrados também aderidos aos órgãos viscerais e as oscilações em sua quantidade são comuns e devem-se a mobilização dos hemócitos antes aderidos para a hemolinfa. (Cruz-Landim, 2009).

Ao contrário do encontrado no presente estudo, Alaux et al. (2010) não observaram diferenças no número de hemócitos na hemolinfa de abelhas infectadas por *N. apis* e *N. ceranae* e/ou expostas ao imidacloprido. Os autores relatam que até mesmo nas abelhas do grupo controle foram encontrados esporos dos microsporídios, de forma que o sistema imune dessas estaria respondendo à infecção e por isso, não houve diferenças entre os grupos.

Outra diferença entre o trabalho de Alaux et al. (2010) e o presente estudo, é o fato de que, no primeiro, a infecção das abelhas foi realizada com as duas espécies do microsporídio, que ocasionam respostas imunes distintas. A infecção por *N. apis* ativa o sistema imune das abelhas por meio do aumento da expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos e outras enzimas relacionadas com a imunidade. A infecção por *N. ceranae*, em contrapartida, suprime a resposta imune reduzindo a transcrição de alguns destes genes, como o da abaecina, defensina, himenoptaecina e glucose desidrogenase (Antúnez et al., 2009).

Mesmo consistindo em uma técnica limitada, a diminuição do número de hemócitos na hemolinfa corroborou os resultados da expressão dos genes relacionados ao sistema imune humoral que diminuiu nos grupos infectados pelo microsporídio *N. ceranae* e/ou expostos ao imidacloprido, em relação ao controle, comprovando que ambos os estressores provocam a imunossupressão e deixam o organismo das abelhas susceptíveis a outros patógenos.

A diminuição no número de hemócitos na hemolinfa contribuíram, de certa forma, para a diminuição da expressão dos peptídeos antimicrobianos, uma vez que os hemócitos também são responsáveis pela síntese deles (Ilyasov et al., 2012).

Os peptídeos envolvidos na resposta imune humoral atuam destruindo a parede celular e reduzindo a integridade e permeabilidade da membrana plasmática de bactérias, fungos e até mesmo vírus (Casteels et al., 1990; Casteels et al., 1993; Klaudiny et al., 2005; Ilyasov et al., 2012).

Esses peptídeos possuem diferentes especificidades, por exemplo as apidaecinas são eficientes contra bactérias gram-negativas e impedem seu crescimento de forma mais eficaz do que as abaecinas, que, por sua vez, podem combater bactérias gram-negativas e gram-

positivas e atuam contra *Xanthomonas campestris*, bactérias gram-negativas resistentes as apidaecinas (Casteels et al., 1990).

Além do comprometimento da imunidade individual, a *N. ceranae* e o imidacloprido levaram também a alterações na imunidade social das abelhas, indicada pela diminuição da expressão gênica da defensina-1. Esse peptídeo é sintetizado, principalmente, nas glândulas mandibulares hipofaríngeas e torácicas e é liberado na geléia real e no mel (Ilyasov et al., 2012).

Alaux et al. (2010) também mostraram que o microsporídio e o imidacloprido comprometem a imunidade social das abelhas, através da diminuição da atividade da glucose oxidase. Essa enzima é sintetizada pelas glândulas hipofaríngeas e capacita as abelhas na esterilização da colônia e do alimento da cria e, assim, os autores discutem que a diminuição de sua atividade sugere que, a longo prazo, ocorra um aumento da susceptibilidade da colônia aos patógenos.

O estresse agudo do comportamento de “luta ou fuga”, em grilos, promove a rápida mobilização das reservas energéticas do corpo gorduroso pelo hormônio adipocinético, o que momentaneamente ocasiona a imunossupressão pela diminuição da síntese dos peptídeos antimicrobianos (Adamo et al., 2008). Ardia et al. (2012) discutem que as respostas imunes do organismo dos insetos, como a encapsulação, têm elevada demanda energética. Esses estudos relacionaram o metabolismo energético dos insetos ao sistema imune, dessa forma, supõe-se que a imunossupressão das abelhas expostas ao imidacloprido e/ou que tiveram suas células intestinais infectadas por *N. ceranae* seja explicada pelo estresse energético ocasionado por esses fatores (Sawczyn et al., 2012; Mayack et al., 2015).

O aumento na expressão dos genes lisozima e defensina-1 nos grupos CL₅₀/100 e N+CL₅₀/1000, respectivamente, representam uma possível reação do sistema imune das abelhas em combater a infecção pelos microsporídios e a exposição ao inseticida. McDonnell et al. (2013), por meio da análise do transcriptoma de abelhas infectadas por *N. ceranae* mostraram aumento da expressão de 12 genes no cérebro, os quais têm relação com o sistema imunológico e antioxidante, como defensina-1, peroxidase, esterase e glucose-oxidase.

Os níveis de expressão gênica da caspase-1 aumentaram no grupo exposto à CL₅₀/100 e diminuíram no grupo N+CL₅₀/1000. No cérebro de abelhas melíferas expostas ao imidacloprido, Wu et al. (2015) associaram o aumento na expressão de caspase-1 a uma possível ocorrência de morte celular por apoptose. Entretanto, a expressão da caspase-3, proteína efetora da cascata proteolítica que leva à apoptose (Nicholson e Thornberry, 1997), diminuiu em todos os grupos experimentais. Esses resultados indicam que as mortes celulares

nos órgãos das abelhas provocadas pela infecção à *N. ceranae* e/ou pelo imidacloprido (Rossi et al., 2013; Gregorc et al., 2016; Soares-Lima et al., 2017a) seriam, em sua maioria, desencadeadas por vias independentes de caspases, como é o caso da necrose e da autofagia. O estresse energético e nutricional gerado pela infecção do epitélio intestinal pelos esporos de *Nosema* spp. (Mayack e Naug, 2009) e a diminuição da expressão gênica da glucose desidrogenase podem ser decorrentes da menor absorção de glicose do alimento no intestino médio, gerando um sintoma de “starvation”, que ativa autofagia por uma via sinalizadora específica (Chang et al., 2015).

Aos 12 dias, a *N. ceranae* completa seu ciclo (Porrini et al., 2011) e as mortes celulares se intensificam em virtude da liberação dos esporos ou pelos danos provocados pelo inseticida (Soares-Lima et al., 2017a). Dessa forma, outra hipótese para a diminuição da expressão da caspase-3, seria que no 12º dia as células não precisam expressar as caspases, pois isso já teria ocorrido anteriormente, restando a clivagem das caspases existentes para a ocorrência da morte celular.

A glutathione-S-transferase é uma enzima de desintoxicação de fase II e catalisa a conjugação da glutathione reduzida aos xenobiontes para torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradados e removidos do organismo (Weirich et al., 2002; Stone et al., 2002; Badiou-Bénéteau et al., 2012). Embora essa enzima seja utilizada como biomarcadora da exposição aos agrotóxicos (Carvalho et al., 2013), o fato da atividade da mesma não ter sido alterada pode ser reflexo dos danos causados pelo imidacloprido e pela *N. ceranae* ao epitélio ventricular.

Semelhante ao encontrado no presente trabalho, Aufauvre et al. (2014) mostraram que a interação patógeno-inseticida não alterou a expressão dos genes relacionados à desintoxicação, mas levou à supressão de genes ligados à resposta imune.

Dussaubat et al. (2012) mostraram que a infecção por *N. ceranae* aumentou a atividade tecidual de GST no intestino e inibiu a transcrição de genes envolvidos com a homeostase e renovação dos tecidos intestinais 7 dias após o contato das abelhas com o microsporídeo, período no qual a infecção é considerada mediana e poucos esporos são encontrados no intestino das abelhas. A análise da atividade da GST no presente trabalho se deu aos 12 dias, quando milhões de esporos podem ser encontrados nas células intestinais causando rompimento e eliminação celulares (Porrini et al., 2011; Soares-Lima et al., 2017a).

A atividade de CaE-3 aumentou na cabeça, em relação ao Controle, nas duas concentrações do imidacloprido quando associados a infecção por *N. ceranae*. As CaEs são enzimas de fase I e, por meio de hidrólise, reagem com compostos não polares aumentando a

solubilidade deles em água e facilitando sua eliminação (Sogorb e Vilanova, 2002). Supõe-se que devido ao comprometimento das células do epitélio digestório pela infecção, maior quantidade do inseticida chegou a hemolinfa e, por isso, as atividades de biotransformação na cabeça foram notados apenas nos grupos expostos a ambos os fatores.

A maior concentração do imidacloprido e a infecção por *N. ceranae* ocasionaram também aumento da atividade tecidual de AChE na cabeça das abelhas. Essa enzima hidrolisa a acetilcolina e restabelece o repouso do neurônio após transmissão do impulso nervoso. O imidacloprido atua como agonista da acetilcolina e compete com ela pelos receptores nicotínicos. Porém, diferentemente da acetilcolina, as moléculas de imidacloprido não são imediatamente degradadas pela acetilcolinesterase e matam o inseto por hiperexcitação (Buckingham et al., 1997; Suchail et al., 2004). O aumento de AChE indica a reposta do sistema nervoso das abelhas para cessar o impulso nervoso provocado pela ligação de moléculas do imidacloprido nos receptores e, indiretamente, mostra o acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas.

Estudos têm mostrado que a infecção por *N. ceranae* e/ou sua combinação com a exposição aos inseticidas podem alterar significativamente a imunidade, a expressão de proteínas que compõem a cutícula, perturbar o metabolismo de aminoácidos do hospedeiro levando ao estresse energético e aumento da fome, além de ocasionar mudanças no comportamento higiênico mediadas por alterações da função olfatória. Esses impactos ocasionados pelo microsporídio e pelo inseticida prejudicariam a recuperação dessas e as tornariam mais vulneráveis às condições adversas do ambiente (Aufauvre et al., 2014; Badaoui et al., 2017)

Embora as abelhas *A. mellifera* africanizada estejam convivendo com o microsporídio *N. ceranae* há muitos anos, foi mostrado que ele pode ocasionar alterações na imunidade individual e social das abelhas, assim como os inseticidas em concentrações residuais ou a combinação entre eles. Entender melhor os efeitos causados pela associação patógeno-imidacloprido sobre as populações de diferentes espécies e subespécies de abelhas auxilia na proteção destas e na garantia da manutenção dos serviços gratuitos que esses insetos promovem ao meio ambiente, como o aumento da variabilidade genética das plantas e da produção e qualidade dos frutos.

Conclusões

A interação da *N. ceranae* com o imidacloprido e os fatores isolados levaram, em 12 dias, a imunossupressão das abelhas, evidenciada pelo número de hemócitos e pela

subexpressão de genes envolvidos com a respostas imune humoral. Esses fatores podem interferir também na susceptibilidade de toda a colônia aos agentes patogênicos, uma vez que a defensina I, envolvida na imunidade social também apresentou sua expressão diminuída.

A ação do microsporídio e do inseticida no organismo das abelhas não provocou alteração na atividade tecidual da enzima GST no intestino e diminuiu a expressão da caspase-3. Entretanto, as atividades teciduais aumentadas de AChE e CaE-3 apenas para os grupos simultaneamente infectados com *N. ceranae* e expostos ao imidacloprido indicam que maior quantidade do inseticida chegou à cabeça devido ao comprometimento grave do intestino e de suas funções de biotransformação e metabolização.

Apêndices

Tabela 1: Primers utilizados para amplificação dos genes de interesse.

Primer	Sequencia	Referência
Actina-F	5-ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG-3'	YANG; COX-FOSTER (2005); ANTUNEZ et al. (2009); AUFAUVRE et al. (2014)
Actina-R	5-GACCCACCAATCCATACGGA-3'	YANG; COX-FOSTER (2005); ANTUNEZ et al. (2009); AUFAUVRE et al. (2014)
RPS5-F	5'-CCACGACGACATTACCAGTG -3'	deste trabalho
RPS5-R	5'-GGCATAACGTCCAGCAGAAT-3'	deste trabalho
Abaecina-F	5'-CAGCATTCGCGTATGTACCA-3'	deste trabalho
Abaecina-R	5'-TCGGATTGAATGGTCCCTGA-3'	YANG; COX-FOSTER (2005)
Apidaecina-F	5'-GAAGCTGAACCGAAAGCTGA-3'	deste trabalho
Apidaecina-R	5'-GTGGTCTCGGTTGTGGAATA-3'	deste trabalho
Defensina 1-F	5'-TGCGCTGCTAACTGTCTCAG -3'	EVANS (2006)
Defensina 1-R	5'- AATGGCACTTAACCGAAACG - 3'	EVANS (2006)
Defensina 2-F	5'-TTGATGGATTCCAACGAACC-3'	deste trabalho
Defensina 2-R	5'-TAAAACGTCGCACGTTACCC-3'	deste trabalho
Glucose desidrogenase-F	5'-CTGCACAACCACGTCTCGTT-3'	ANTUNEZ et al. (2009); YANG; COX-FOSTER (2005)
Glucose desidrogenase-R	5'-ACCGCCGAAGAAGATTTGG-3'	ANTUNEZ et al. (2009); YANG; COX-FOSTER (2005)
Himenoptaecina-F	5'-CTCTTCTGTGCCGTTGCATA-3'	ANTUNEZ et al. (2009); AUFAUVRE et al. (2014); EVANS (2006)
Himenoptaecina-R	5'-GCGTCTCCTGTCATTCCATT-3'	ANTUNEZ et al. (2009); AUFAUVRE et al. (2014); EVANS (2006)
Lisozima-F	5'-ACACGGTTGGTCACTGGTCC-3'	ANTUNEZ et al. (2009); AUFAUVRE et al. (2014); YANG; COX-FOSTER (2005)
Lisozima-R	5'-GTCCCACGCTTTGAATCCCT-3'	ANTUNEZ et al. (2009); AUFAUVRE et al. (2014); YANG; COX-FOSTER (2005)
Caspase1-F	5'-GTCCTACACTTTCTGGAAAACC-3'	Wu et al. (2015)
Caspase1-R	5'-ATGAACCATGAACCGCGAGTG-3'	Wu et al. (2015)
Caspase3-F	5'-ACGCCAAAAGATTCCCCTAT-3'	deste trabalho
Caspase3-R	5'-GTCCCGTTTCGTTGTGATTC-3'	deste trabalho

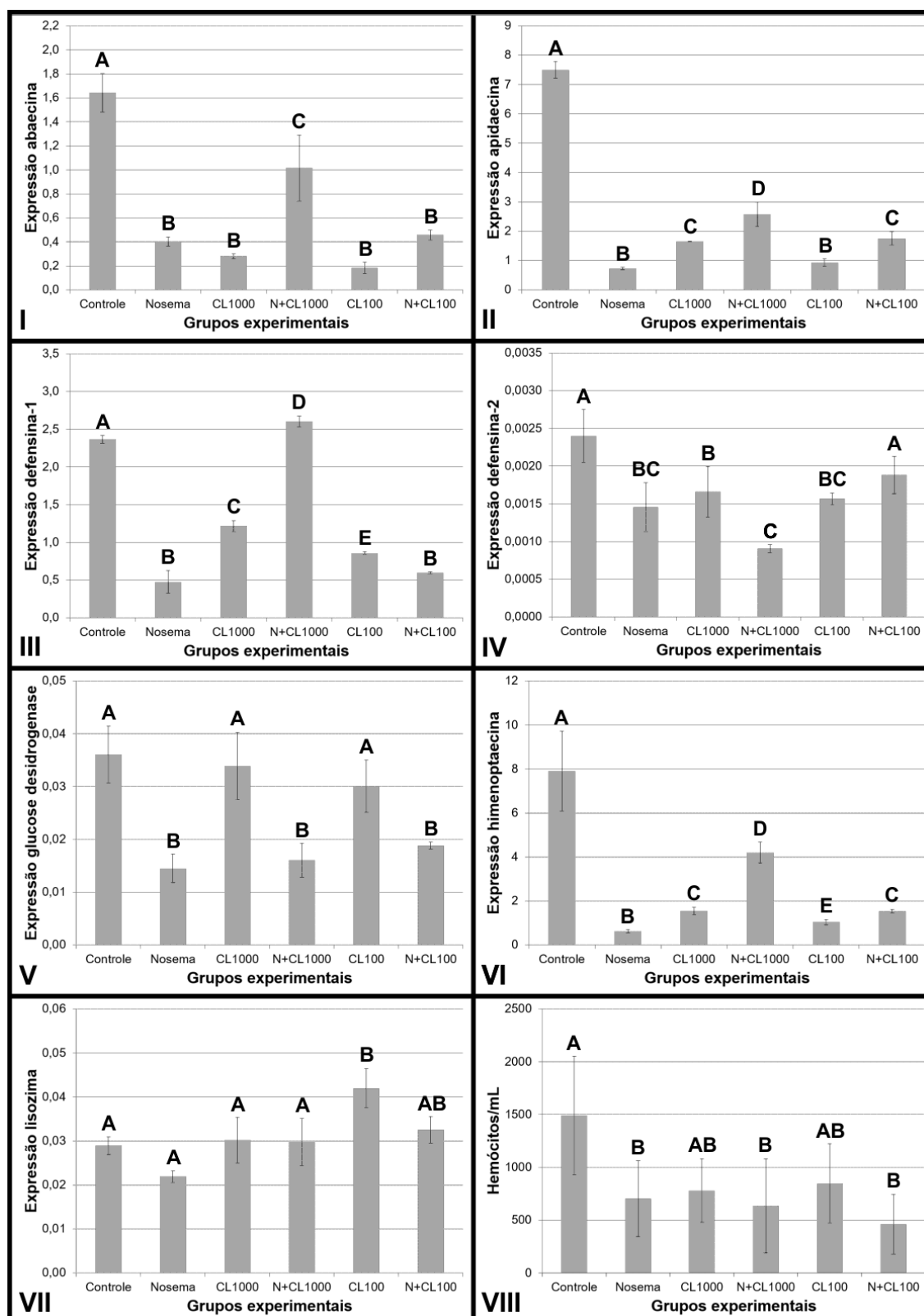


Figura 1: Expressão de genes relacionados a resposta imune, normalizada pela actina, no organismo das abelhas dos diferentes grupos experimentais (I-VII) e contagem no número de hemócitos circulantes na hemolinfa (VIII). As letras acima das barras representam os resultados estatísticos das comparações entre os grupos experimentais, sendo que letras diferentes indicam significância $p < 0,05$ (I-VII-Holm-Sidak e VIII-Kruskal-Wallis; Dunn). As siglas CL1000, N+CL1000, CL100 e N+CL100 correspondem, respectivamente, aos grupos CL₅₀/1000, N+CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100.

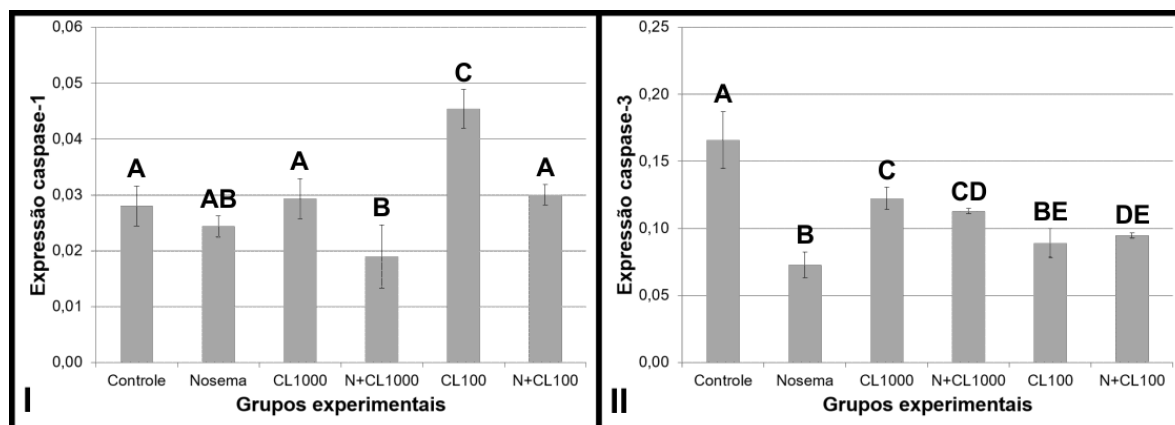


Figura 2: Expressão gênica da caspases-1 (I) e da caspase-3 (II), normalizada pela actina, no organismo das abelhas dos diferentes grupos experimentais. As letras acima das barras representam os resultados estatísticos das comparações entre os grupos experimentais, sendo que letras diferentes indicam significância $p < 0,05$ (Holm-Sidak). As siglas CL1000, N+CL1000, CL100 e N+CL100 correspondem, respectivamente, aos grupos CL₅₀/1000, N+CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100.

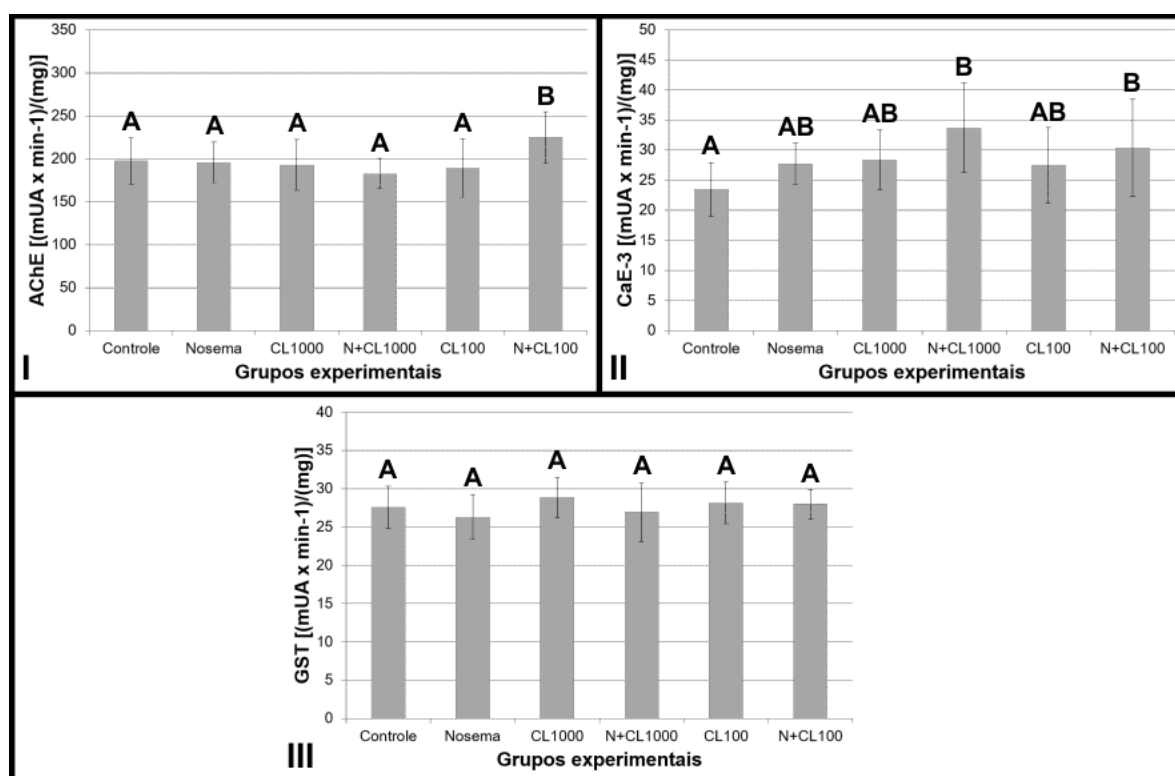


Figura 3: Atividade tecidual das enzimas acetilcolinesterase (AChE) (I) e carboxilesterase-3 (CaE-3) (II) na cabeça e da enzima glutationa-S-transferase (GST) (III) no intestino das abelhas dos diferentes grupos experimentais. As letras acima das barras representam os resultados estatísticos das comparações entre os grupos experimentais, sendo que letras diferentes indicam significância $p < 0,05$ (I-II-Holm-Sidak e III-Kruskal-Wallis; Dunn). As siglas CL1000, N+CL1000, CL100 e N+CL100 correspondem, respectivamente, aos grupos CL₅₀/1000, N+CL₅₀/1000, CL₅₀/100 e N+CL₅₀/100.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Dr^a. Erica Weinstein Teixeira pela identificação da espécie do microsporídeo de trabalho e ao MSc. Caio Eduardo da Costa Domingues pelo auxílio na contagem de hemócitos.

Suporte financeiro: Esse trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP (Processo nº 2013/09555-5).

Referências

- Abdalla, F.C., Domingues, C.E.C., 2015. Hepato-Nephrotoxic System: A Novel Model of Biomarkers for Analysis of the Ecology of Stress in Environmental Biomonitoring. *Plos One*, 10(7): e0132349. doi: 10.1371/journal.pone.0132349
- Adamo, S.A., Roberts, J.L., Easy, R.H., Ross, N.W., 2008. Competition between immune function and lipid transport for the protein apolipoprotein III leads to stress-induced immunosuppression in crickets. *J Exp, Biol.* 211(4), 531-538. doi: 10.1242/jeb.013136
- Alaux, C., Brunet, J.L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchmitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L.P., Le Conte, Y., 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12(3), 774-782. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x
- Antúñez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M., 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* 11(9), 2284-2290. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x
- Ardia, D.R., Gantz, J.E., Brent, C., Strebel, S., 2012. Costs of immunity in insects: an induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. *Functional Ecology*, 26(3), 732-739. doi: 10.1111/j.1365-2435.2012.01989.x
- Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F., Blot, N., 2014. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *Plos One* 9(3), 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0091686
- Badaoui, B., Fougeroux, A., Petit, F., Anselmo, A., Gorni, C., Cucurachi, M., Cersini, A., Granato, A., Cardeti, G., Formato, G., Mutinelli, F., Giuffra, E., Williams, J.L., Botti, S.,

2017. RNA- sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. Plos One 12(3): e0173438. doi: 10.1371/journal.pone.0173438
- Badiou-Bénéteau, A., Carvalho, S.M., Brunet, J-L., Carvalho G.A., Buleté, A., Giroud, B., Belzunces, L.P., 2012. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide. Ecotoxicol. Environ. Saf. 82, 22-31. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.05.005
- Bonmatin, J.M., Moineau, I., Charvet, R., Fleche, C., Colin, M.E., Bengsch, E.R., 2003. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. Anal. Chem. 75(9), 2027-2033. doi: 10.1021/ac020600b
- Brandt, A., Gorenflo, A., Seide, R., Meixner, M., Büchler, R., 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). J. Insect Physiol. 86, 40-47. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.01.001
- Buckingham, S.D., Lapied, B., Le Corrionc, H., Grolleau, F., Sattelle, D.B., 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. J. Exp. Biol. 200, 2685-2692.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L., Hoffmann, D., 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Elmsford 23(4-5), 329-344. doi: 10.1016/S0145-305X(99)00015-4
- Carvalho, S.M., Belzunces, L.P., Carvalho, G.A., Brunet, J-L., Badiou-Beneteau A., 2013. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A study of exposure of the honeybee *Apis mellifera*. Environ. Toxicol. Chem. 32(9), 2117-2124. doi: 10.1002/etc.2288
- Casteels, P., Ampe, C., Rivieri, L., Van Damme, J., Elicone, C., Flemming, M., Jacobs, F., Tempst, P., 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). Eur. J. Biochem. 187(2), 381-386. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15315.x
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Tempst, P., 1993. Functional and Chemical Characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial Polypeptide that is infection-inducible in the Honeybee (*Apis mellifera*). J. Biol. Chem. 268(10), 7044-7054.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D., Pettis, J.S., 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. J. Insect Physiol. 58(8), 1090-1095. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.04.016
- Chang C, Su H, Zhang D, Wang Y, Shen Q, Liu B, Huang R, Zhou T, Peng C, Wong CC, Shen HM, Lippincott-Schwartz J, Liu W., 2015. AMPK-Dependent Phosphorylation of

- GAPDH Triggers Sirt1 Activation and Is Necessary for Autophagy upon Glucose Starvation. *Mol Cell*. 60(6), 930-40. doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.037.
- Chauzat, M., Faucon, J., Martel, A., Lachaize, J., Cougoule, N., Aubert, M., 2006. A survey of pesticides residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econ. Entomol.* 99(2), 253-262. doi: 10.1603/0022-0493-99.2.253
- Chen, Y., Evans, Evans, J.D., Smith, I.B., Pettis, J.S., 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertbr. Pathol.* 97(2), 186-188. doi: 10.1016/j.jip.2007.07.010
- Cox-Foster, D.L., Stehr, J.E., 1994. Induction and localization of FAD–glucose dehydrogenase (GLD) during encapsulation of abiotic implants in *Manduca sexta* larvae. *J. Insect Physiol.* 40(3), 235–249. doi: 10.1016/0022-1910(94)90047-7
- Cremer, S., Armitage, S.A.O., Schmid-Hempel, P., 2007. Social immunity. *Curr. Biol.* 17(16), 693-702. doi: 10.1016/j.cub.2007.06.008
- Cruz-Landim, C., 2009. Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: 1st ed. Unesp press, São Paulo. ISBN: 9788571399273
- Diao, Q., Yuan, K., Liang, P., Gao, X., 2006. Tissue distribution and properties of glutathione S-transferases in *Apis ceranae cerana* Fabricius and *Apis mellifera ligustica* Spinola. *J. Apic. Res.* 45, 145–152. doi: 10.1080/00218839.2006.11101333
- Dimarcq, J.L., Hoffmann, D., Meister, M., Bulet, P., Lanot, R., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1994. Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. *Eur. J. Biochem.* 221(1), 201-209. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18730.x
- Dively, G.P., Kamel, A., 2012. Insecticide residues in pollen and nectar of a *Cucurbit* crop and their potential exposure to pollinators. *J Agric. Food Chem.* 60, 4449-4456. doi: 10.1021/jf205393x
- Dunn, P.E., 1986. Biochemical aspects of insect immunology. *Ann. Rev. Entomol.* 31, 321-339. doi: 10.1146/annurev.en.31.010186.001541
- Dussaubat, C., Brunet, J.L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.H., Hernandez, R.M., Bottias, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L.P., Moritz, R.F.A., Le Conte, Y., Alaux, C., 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema*

ceranae in the honey bee *Apis mellifera*. Plos One 7(5), 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0037017

Gregorc, A., Silva-Zacarin, E.C.M., Carvalho, S.M., Karamberger, D., Teixeira, E.W., Malaspina, O., 2016. Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. Chemosphere 147, 328-336. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.12.030

Gupta, A.P., 1969. Studies of the blood of Meloidae (Coleoptera):I. The haemocytes of *Epicauta cinerea* (Forster), and a synonymy of haemocyte terminologies. Cytologia 34(2), 300-344. doi: 10.1508/cytologia.34.300

Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). J. Invertbr. Pathol. 94, 211-217. Doi: 10.1016/j.jip.2006.11.001

Higes, M., Martín-Hernández R., Botías, C., Garrido-Bailón E., González-Porto, A.V., Barrios, L., del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Palencia, P.G., Meana, A., 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environ. Microbiol. 10(10), 2659-2669. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x

Higes, M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., García-Palencia, P., Meana, A., del Nozal, M.J., Mayo, R., Bernal, J.L., 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. Environ. Microbiol. 1(2), 110-113. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x

Ho, M.W., Cummins, J., 2007. Mystery of disappearing honeybees. Sci. Soc. 34, 35-36.

Ilyasov, R.A., Gaifullina, L.R., Saltykova, E.S., Poskryakov, A.V., Nikolenko, A.G., 2012. Review of the expression of antimicrobial peptide defensin in honey bees *Apis mellifera* L. J. Apic. Sci. 56(1): 115-123. doi: 10.2478/v10289-012-0013-y

Klaudiny, J., Albert, S., Bachanová, K., Kopernicky, J., Šimuth, J., 2005. Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. Insect Biochem. Mol. Biol. 35(1), 11-22. doi: 10.1016/j.ibmb.2004.09.007

Kunieda, T., Fujiyuki, T., Kucharski, R., Foret, S., Ament, S.A., Toth, A.L., Ohashi, K., Takeuchi, H., Kamikouchi, A., Kage, E., Moriola, M., Beye, M., Kubo, T., Robinson, G.E., Maleszka, R., 2006. Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from

- the honey bee genome. *Insect Mol. Biol.* 15(5), 563-576. doi: 10.1111/j.1365-2583.2006.00677.x
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32(10), 1295-1309. doi: 10.1016/S0965-1748(02)00092-9
- Lovallo, N.C., Cox-Foster, D.L., 1999. Alteration in FAD glucose dehydrogenase activity and hemocyte behaviour contribute to initial disruption of *Manduca sexta* immune response to *Cotesia congregata* parasitoids. *J Insect Physiol* 45, 1037–1048. doi: 10.1016/S0022-1910(99)00086-4
- Malone, L.A., Giaccon, H.A., Newton, M.R., 1995. Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L) to *Nosema apis* Z. *Apidologie* 26, 495–502.
- Mayack, C., Naug, D., 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertbr. Pathol.* 100, 185-189. doi: 10.1016/j.jip.2008.12.001
- Mayack, C., Natsopoulou, M.E., McMahon, D.P., 2015. *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees. *Insect Mol. Biol.* 24(6), 662-70. doi: 10.1111/imb.12190.
- McDonnell, C.M., Alaux, C., Parrinello, H., Desvignes, J.P., Crauser, D., Durbesson, E., Beslay, D., Le Conte, Y., 2013. Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *BMC Ecol.* 13, 1-25. doi: 10.1186/1472-6785-13-25
- Medzhitov, R., Janeway, C.A.Jr., 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9(1), 4-9. doi: 10.1016/S0952-7915(97)80152-5
- Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., 1997. Caspases: killer proteases. *Trends biochem sci.* 22(8), 299-306. doi: 10.1016/S0968-0004(97)01085-2
- Oldroyd, B.P., 2007. What's killing American honey bees? *Plos Biol.* 5(6), 1195-1199. doi: 10.1371/journal.pbio.0050168
- Pettis, J.S., Van Engelsdorp, D., Johnson, J., Dively, G., 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased level of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99, 153-158. doi: 10.1007/s00114-011-0881-1

- Porrini, M.P., Sarlo, E.G., Medici, S.K., Garrido, P.M., Porrini, D.P., Damiani, N., Eguaras, M.J., 2011. *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. *J. Apic. Res.* 50(1), 35-41. doi: 10.3896/IBRA.1.50.1.04
- Rortais, A., Arnold, G., Halm, M-P., Touffet-Briens, F., 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* 36, 71-83. doi: 10.1051/apido:2004071
- Rossi, C.A., Roat, T.C., Tavares, D.A., Cintra-Socolowski, P., Malaspina, O., 2013. Brain morphophysiology of africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65(2), 234-243. doi: 10.1007/s00244-013-9897-1
- Sawczyn, T., Dolezych, B., Klosok, M., Augustyniak, M., Stygar, D., Buldak, R. J., Zwirska-Korczala, K., 2012. Alteration of carbohydrates metabolism and midgut glucose absorption in *Gromphadorhina portentosa* after subchronic exposure to imidacloprid and fenitrothion. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(11), 1644-1651. doi: 10.1080/10934529.2012.687181
- Schmid-Hempel, P., 1998. *Parasites in social insects*, 1st ed. Princeton University Press, Princeton. ISBN: 9780691059242
- Schmuck, R., Schoning, R., Stork, A., Schramel, O., 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag. Sci.* 57, 225-238. doi: 10.1002/ps.270
- Schmuck, R., Stadler, T., Schmidt, H-W., 2003. Field relevance of a synergistic effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotinyl insecticide in the honeybee (*Apis mellifera* L, Hymenoptera). *Pest Manag. Sci.* 59(3), 279-286. doi: 10.1002/ps.626
- Simone, M., Evans, J.D., Spivak, M., 2009. Resin collection and social immunity in honey bees. *Evol.* 63(11), 3016-3022. doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00772.x
- Soares-Lima, H.M., Grella, T.C., Silva-Zacarin, E.C.M., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2017a. Exposição à *Nosema ceranae* e ao imidacloprido causam estresse e morte celular no intestino e túbulos de Malpighi de abelhas *Apis mellifera* africanizada. Elaborado para submissão à Plos One. Capítulo 02 dessa Tese.

Soares-Lima H.M., Silva-Zacarin, E.C.M., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2017b. Abelhas tem resposta neural alterada após exposição à *Nosema ceranae* e ao imidacloprido. Elaborado para submissão à Chemosphere. Capítulo 03 dessa Tese.

Soares-Lima, H.M., Carvalho, S.M., Dorigo, A.S., Silva-Zacarin, E.C.M., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2017c. Larvae are more tolerant to imidacloprid than adult honeybees. Submetido para Environ. Toxicol. Chem .Capítulo 01 dessa Tese.

Sogorb, M.A., Vilanova, E., 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. Toxicol. Lett. 128, 215-228. doi: 10.1016/S0378-4274(01)00543-4

Sperandei, S., Ribeiro-Alves, M., Moraes, M.O., 2010. Avaliação de métodos de quantificação relativa de expressão gênica em RT-PCR em tempo real. XXII CBEB, 1279-1282.

Spivak, M., Gilliam, M., 1998. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. Bee World 79(3), 124-134. doi: 10.1080/0005772X.1998.11099394

Spivak, M., Reuter, G.S., 2001. *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. J. Econ. Entomol. 94(2), 326-331. doi: 10.1603/0022-0493-94.2.326

Stone, D. Jepson, P., Laskowski, R., 2002. Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. Comp. Biochem. Physiol. 132, 105–112. doi: 10.1016/S1532-0456(02)00052-2

Suchail, S., Debrauwer, L., Belzunces, L.P., 2004. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. Pest Manag. Sci. 60(3), 291-296. doi: 10.1002/ps.772

Systat Software, San Jose, CA, USA. www.sigmaplot.com

Teixeira, E.W., Santos L.G., Sattler, A., Message, D., Alves, M.L.T.M.F., Martins, M.F., 2013. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. J. Invertbr. Pathol. 114(3), 250-254. doi: 10.1016/j.jip.2013.09.002

Tomizawa, M., Casida, J.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. Ann. Rev. Entomol. 48, 339-364. doi: 10.1146/annurev.ento.48.091801.112731

- Watanabe, M.E., 2008. Colony Collapse Disorder: Many Suspects, No Smoking Gun. *BioScience* 58(5), 384-388. doi: 10.1641/B580503
- Weirich G.F., Collins, A.M., Williams, V.P., 2002. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 33(1), 3-14. doi: 10.1051/apido:2001001
- Wu, Y-Y. Zhou, T., Wang, Q., Dai, P-L. Xu, S-F, Jia, H-R, Wang, X., 2015. Programmed Cell Death in the Honey Bee (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae) Worker Brain Induced by Imidacloprid. *J Econ. Entomol.* 108(4), 1486-1494. doi: 10.1093/jee/tov146
- Yang, E.C., Chuang, Y.C., Chen, Y.L., Chang, L.H., 2008. Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 101(6), 1743-1748. doi: 10.1603/0022-0493-101.6.1743

8. DISCUSSÃO GERAL

A concentração letal média estabelecida para larvas de operárias de *A. mellifera* africanizada expostas oralmente ao imidacloprido foi de 541,89 ng i.a./ μ L de dieta em 72 horas, 304,68 ng/ μ L em 96 horas e 179,98 ng/ μ L em 120 horas, enquanto que para as abelhas recém emergidas, a CL_{50} do imidacloprido foi de 7,48 ng/ μ L em 24 horas e de 4,13 ng/ μ L em 48 horas. Adicionalmente, a menor concentração capaz de provocar alterações no desenvolvimento larval foi 64 ng/ μ L. Esses dados indicam que as larvas são mais tolerantes ao inseticida imidacloprido do que as abelhas adultas. Essa tolerância poderia ser explicada pela grande quantidade de corpo gorduroso presente no organismo das larvas, que pode estocar as substâncias tóxicas (CRUZ-LANDIM, 2009).

As estruturas cerebrais passam por remodelamento durante a metamorfose e, assim, as larvas e pupas não expressam os mesmos subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina encontrados nos neurônios das abelhas adultas (TISSOT; STOCKER, 2000; YANG et al., 2012; THANY et al., 2003; THANY et al., 2005), fato este que também poderia contribuir para a diminuição do potencial neurotóxico do inseticida nessa fase.

As larvas podem ser tolerantes, porém a exposição a concentrações subletais de imidacloprido na fase larval prejudicam a capacidade olfato-associativa dessas quando adultas, que é essencial para a execução da atividade de forrageamento e coleta de pólen e néctar (YANG et al., 2012).

A partir do valor de CL_{50} estabelecido para as operárias recém-emergidas em 24 horas, foram escolhidas duas concentrações, compatíveis com os resíduos do inseticida identificados no pólen e no néctar, para a realização das posteriores etapas desse trabalho: $CL_{50}/100$ - 0,075 ng de imidacloprido/ μ L de dieta ou 61,02 ppb e $CL_{50}/1000$ - 0,0075 ng/ μ L ou 6,10 ppb.

Após a infecção das abelhas com esporos de *N. ceranae* e/ou do oferecimento de alimento *ad libitum* contendo imidacloprido, observou-se que ambos os fatores interferem na sobrevivência das abelhas, sendo que a combinação deles diminuiu ainda mais o tempo de vida das mesmas.

O sistema digestório constitui importante barreira de defesa do organismo das abelhas (DUNN, 1986; BULET et al., 1999) e neste trabalho sua avaliação foi essencial, uma vez que ele é o primeiro órgão a entrar em contato com o inseticida ingerido e é em suas células que o parasita se instala.

O aumento da expressão de HSP 70 no epitélio intestinal das abelhas expostas à menor concentração do imidacloprido auxiliou as células no combate ao estresse e danos provocados pelo inseticida.

As HSPs 70 são chaperonas que auxiliam no redobramento de proteínas danificadas pelo estresse celular ou as destinam a um sistema proteolítico adequado, além de estarem envolvidas na síntese e maturação de novas proteínas (BUKAU; HORWICH, 1998; MEYER; BUKAU, 2005). Elas são consideradas anti-apoptóticas, uma vez que podem controlar ou inibir a ativação de outras proteínas envolvidas nas vias apoptóticas intrínseca e extrínseca (TAKAYAMA et al., 2003). Além disso, as HSPs 70 atuam junto às mitocôndrias protegendo as células da privação de energia e depleção de ATP associados à morte celular (WONG et al. 1998; KABAKOV 2002).

Os altos níveis teciduais de HSP 70 no intestino médio das abelhas expostas à maior concentração do inseticida ou infectadas por *N. ceranae* não impediram o aumento de núcleos com quebra de DNA e este fato, associado à intensa vacuolização das células, indicam ocorrência de morte celular não apoptótica, como a macroautofagia. Tanto o imidacloprido como a *N. ceranae* interferem no metabolismo energético das abelhas (SAWCZYN et al., 2012; MAYACK et al., 2015), o que poderia ativar a via do receptor de insulina, envolvido na regulação da autofagia.

Outro indicativo da ocorrência de tipos de morte celular independentes de caspase, como a autofagia, foi a diminuição da expressão gênica da caspase-3, proteína efetora da cascata proteolítica que leva à morte celular, no organismo das abelhas expostas ao imidacloprido e/ou infectadas por *N. ceranae*.

O maior número de esporos de *N. ceranae* indentificados aos 6 dias no abdomen das abelhas infectadas pelo parasita e expostas ao imidacloprido, simultaneamente, sugerem que o inseticida favoreceu a replicação dos esporos nas células intestinais, fato este que, provavelmente, agravou os danos provocados pelo microsporídeo ao epitélio digestório.

A combinação da maior concentração do inseticida com a infecção levou a cerca de 80% de alterações morfológicas no ventrículo, com degeneração epitelial em 6 dias. Uma vez que o microsporídeo evita ocasionar a morte celular apoptótica antes de completar seu ciclo reprodutivo (HIGES et al., 2013), a degeneração epitelial observada poderia ser decorrente da autofagia. Com o amadurecimento dos esporos e sua liberação no lúmen do intestino aos 12 dias, dois tipos de morte celular (macroautofagia e apoptose) podem ocorrer, evidenciadas pela diminuição da degeneração epitelial e aumento da quebra de DNA. A morte celular de mais de um tipo coexistindo em um mesmo tecido também foi relatada por Gregorc et al. (2016) no ventrículo de abelhas infectadas por *N. ceranae* e expostas ao tiamentoxam e por Gregorc e Bowen (1999) no organismo de larvas infectadas com *Paenibacillus larvae*, bactéria causadora da Cria Pútrida Americana.

A atividade tecidual da glutatona-S-transferase, enzima de desintoxicação de fase II, não foi alterada aos 12 dias no intestino das abelhas, embora essa enzima seja considerada bioindicadora da exposição aos agrotóxicos (CARVALHO et al., 2013). Uma explicação para este fato seria que os danos causados às células teriam comprometido as funções de biotransformação e metabolização do intestino das abelhas.

Uma vez na hemolinfa, o inseticida e até mesmo seus metabólitos chegaram à cabeça e atingiram os corpos pedunculados, estruturas cerebrais responsáveis pela plasticidade comportamental das abelhas.

Como o imidacloprido atua como agonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina e causa hiperexcitação do sistema nervoso do inseto (BUCKINGHAM et al., 1997; SUCHAIL et al., 2004), pode-se supor que o aumento da detecção de sinapsina nos grupos expostos ao inseticida esteja relacionado ao aumento da atividade sináptica.

Provavelmente, o aumento na imunomarcção da sinapsina no cérebro das abelhas infectadas com esporos de *N. ceranae* tenha ocorrido em resposta ao parasitismo. Os danos causados pelo parasita ao sistema digestório podem ter sido refletidos no sistema nervoso desencadeando respostas para que o organismo reagisse aos efeitos nocivos sofridos.

As sinapsinas modulam a atividade neuronal, pois atuam na regulação das vesículas de neurotransmissores dentro dos terminais pré-sinápticos (HILFIKER et al., 1999). A condução do impulso nervoso estimula a fosforilação das sinapsinas que se soltam das vesículas sinápticas deixando-as livres para a exocitose (LLINÁS et al., 1985; GARTNER; HIATT, 2007).

A maior concentração do inseticida isoladamente, assim como, a associação da menor concentração deste com a *N. ceranae* levaram ao aumento de células fortemente coradas nos corpos pedunculados, que indicou proliferação das células gliais. Este fato, associado aos níveis teciduais de HSP 70, mostra que a citoproteção desta proteína não foi suficiente para se evitar injúria no tecido nervoso.

As células gliais têm função de suporte e nutrição dos neurônios (KRETZSCHMAR; PFLUGFELDER, 2002) e em condições de lesões nervosas podem se proliferar ou serem recrutadas para facilitar a reorganização dos circuitos neurais (KATO et al., 2009; NEUMANN et al., 2009).

Além dos aumentos da imunomarcção da HSP 70 e do número de células gliais, aos 12 dias observou-se que a combinação parasita-inseticida diminuiu a detecção da sinapsina clivada e, portanto, ativa. A constante hiperexcitação dos neurônios levaria ao esgotamento

dos conjuntos de vesículas de neurotransmissores, as quais não precisariam mais ser moduladas pela sinapsina e, assim, sua fosforilação seria inibida.

A morte dos neurônios ou a falta de ATP também podem diminuir a quantidade de sinapsinas livres, segundo Huttner et al. (1983). Visto que os inseticidas podem comprometer as funções mitocondriais e a produção de ATP (JACOB et al., 2015; CATAE et al., 2014; SOARES, 2012), a hipótese da redução de sinapsinas pelo déficit de ATP não pode ser descartada.

O comprometimento das funções de metabolização e biotransformação do intestino, principalmente quando houve a interação do microsporídio e do inseticida, fez com que maior quantidade de imidacloprido chegasse ao sistema nervoso pela hemolinfa. Fato este que, além de ser comprovado pela alteração na expressão da sinapsina, foi evidenciado pelo aumento das atividades teciduais das enzimas carboxilesterase e acetilcolinesterase na região da cabeça, aos 12 dias.

A carboxilesterase é uma enzima de detoxificação de fase I (SOGORB; VILANOVA, 2002), e seu aumento reflete o processo de biotransformação do inseticida em excesso na cabeça.

A acetilcolinesterase, por sua vez, é comumente encontrada no sistema nervoso das abelhas e tem como função degradar a acetilcolina e restabelecer o potencial de repouso neuronal (BUCKINGHAM et al., 1997). O aumento de acetilcolinesterase mostra resposta do sistema nervoso para cessar a ligação do imidacloprido com os receptores nicotínicos de acetilcolina.

Adicionalmente, os altos níveis de imidacloprido presentes na hemolinfa ocasionaram a morte celular com quebra de DNA nos túbulos de Malpighi e diminuição da imunomarcagem da HSP70 a partir do 1º dia de exposição das abelhas a este composto. Uma vez que este órgão promove a eliminação das substâncias tóxicas do organismo, seu comprometimento agrava ainda mais o quadro de intoxicação das abelhas.

Além dos danos provocados aos órgãos, a combinação do inseticida com o parasita ou os estressores isolados, causaram imunossupressão, evidenciada pela diminuição da quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa e da expressão dos genes da abaecina, apidaecina, defensina-1, defensina-2, himenoptaecina e glucose desidrogenase. Os hemócitos são responsáveis pela imunidade celular, enquanto que os peptídeos antimicrobianos conferem a imunidade humoral ao organismo (CRUZ-LANDIM, 2009; ILYASOV et al., 2012). A diminuição da imunocompetência torna as abelhas susceptíveis a outros patógenos e às condições adversas do ambiente.

Não só a imunidade individual das abelhas foi comprometida, como também provavelmente a imunidade social, já que o microsporídio e/ou o inseticida ocasionaram a subexpressão da defensina-1, peptídeo utilizado na esterilização do mel e alimento das larvas (ILYASOV et al., 2012).

9. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que:

- Larvas são mais tolerantes ao imidacloprido do que as abelhas recém-emergidas da mesma espécie, provavelmente devido ao corpo gorduroso mais desenvolvido das larvas e/ou a presença de subtipos diferentes de receptores nicotínicos, alvos do inseticida, no cérebro das larvas e das abelhas adultas;
- A exposição das abelhas recém-emergidas ao imidacloprido em concentrações residuais aumentou a infecção desses insetos pela *N. ceranae* e favoreceu a replicação do parasita nas suas células intestinais;
- Em comparação com a infecção por *N. ceranae* ou com a exposição ao imidacloprido, isoladamente, a combinação inseticida-microsporídio agravou os efeitos provocados por esses estressores sobre o intestino, cérebro e túbulos de Malpighi das abelhas e, conseqüentemente, diminuiu ainda mais a sobrevivência das mesmas;
- Ambos os estressores comprometeram a imunidade individual, diminuindo as respostas imune celular e humoral, e provavelmente a imunidade social das abelhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAUX, C.; BRUNET, J. L.; DUSSAUBAT, C.; MONDET, F.; TCHMITCHAN, S.; COUSIN, M.; BRILLARD, J.; BALDY, A.; BELZUNCES, L.P.; LE CONTE, Y. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 774-82, mar. 2010.
- ALLEN-WARDELL, G; BENHARDT, P.; BITNER, R.; BURQUEZ, A.; BUCHMANN, S.; CANE, J.; COX, P.A.; DALTON, V.; FEINSINGER, P.; INGRAM, M.; INOUE, D.; JONES, C. E.; KENNEDY, K.; KEVAN, P.; KOOPOWITZ, H.; MEDELLIN-MORALES, S.; NABHAN, G. P. The potential consequences of pollinator declines of the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 12, n. 1, p. 8-17, feb. 1998.
- AUFAUVRE, J.; BIRON, D. G; VIDAU, C.; FONTBONNE, R.; ROUDEL, M.; DIOGON, M.; VIGUÈS, B.; BELZUNCES, L. P.; DELBAC, F.; BLOT, N. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. **Scientific Reports**, London, v. 2, n. 326, p. 1-7, mar. 2012.
- AUFAUVRE, J.; MISME-AUCOUTURIER, B.; VIGUÈS, B.; TEXIER, C.; DELBAC, F.; BLOT, N. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. 1-12, mar. 2014.
- BERRIDGE, M. J.; OSCHMANN, J. L. A structural basis for fluid secretion by Malpighian tubules. **Tissue and Cell**, Edinburgh, v. 1, n. 2, p. 247-272, 1969.
- BONMATIN, J. M.; MOINEAU, I.; CHARVET, R.; FLECHE, C.; COLIN, M. E.; BENGSCHE, E. R. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 75, n. 9, p. 2027-2033, may 2003.
- BRADLEY, T. J. **The excretory system: structure and physiology**. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. London: Pergamon. 1985. p. 421-465. v. 4.
- BRANDT, R.; ROHLFING, T.; RYBAK, J. R.; KROFCZIK, S.; MAYE, A.; WESTERHOFF, M.; HEGE, H. C.; MENZEL, R. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. **Journal of Comparative Neurology**, New York, v. 492, p. 1-19, nov. 2005.
- BRITTAIN, C.; POTTS, S. G. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 12, n. 4, p. 321 – 331, june 2011.
- BROMENSHENK, J. J.; HENDERSON, C. B.; WICK, C. H.; STANFORD, M. F.; ZULICH, A. W.; JABBOUR, R. E.; DESHPANDE, S. V.; MCCUBBIN, P. E.; SECCOMB, R. A.; WELCH, P. M.; WILLIAMS, T.; FIRTH, D. R.; SKOWRONSKI, E.; LEHMANN, M. M.; BILIMORIA, S. L.; GRESS, J.; WANNER, K. W.; CRAMER JR, R. A. Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. **Plos One**, San Francisco, v. 5, n. 10, p. 1-11, oct. 2010.
- BUCKINGHAM, S. D.; LAPIED, B.; LE CORRONC, H.; GROLLEAU, F.; SATTELLE, D. B. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 200, p. 2685-2692, aug. 1997.
- BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, Cambridge, v. 92, n. 3, p. 351-366, feb. 1998.

- BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J. L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 23, n. 4-5, p. 329-344, june-july 1999.
- BYRNE, F. J.; VISSCHER, P. K.; LEIMKUEHLER, B.; FISCHER, D.; GRAFTON-CARDWELLA, E. E.; MORSEA, J. G. Determination of exposure levels of honey bees foraging on flowers of mature citrus trees previously treated with imidacloprid. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 70, n. 3, p. 470–482, mar. 2014.
- CARVALHO, S. M.; BELZUNCES, L. P.; CARVALHO, G. A.; BRUNET, J.-L.; BADIOU-BENETEAU A. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A study of exposure of the honeybee *Apis mellifera*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Michigan, v. 32, n. 9, p. 2117-2124, sep. 2013.
- CATAE, A. F.; ROAT, T. C.; OLIVEIRA, R. A.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and Malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 77, n. 4, p. 274-281, apr. 2014.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 5.ed. New York: Elsevier Publishing, 1998. 789p.
- CHAUZAT, M.; FAUCON, J.; MARTEL, A.; LACHAIZE, J.; COUGOULE, N.; AUBERT, M. A survey of pesticides residues in pollen loads collected by honey bees in France. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 2, p. 253-262, apr. 2006.
- CHEN, Y.; EVANS, J. D.; SMITH, I. B.; PETTIS, J. S. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 97, n. 2, p. 186–188, feb. 2008.
- CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R. M.; BISWAS, S.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J. G. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 615–636, oct. 2006.
- COLLA, S. R.; OTTERSTATTER, M. C.; GEGEAR, R. J.; THOMSON, J. D. Plight of the bumblebee: Pathogen spillover from commercial to wild populations. **Biological conservation**, Essex, v. 129, n. 4, p. 461-467, may 2006.
- CORNMAN, R. S.; CHEN, Y. P.; SCHATZ, M. C.; STREET, C.; ZHAO, Y.; DESANY, B.; EGHOLM, M.; HUTCHISON, S.; PETTIS, J. S.; LIPKIN, W. I.; EVANS, J. D. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1-14, june 2009.
- CRESSWELL, J.E. A meta-analysis of experiments testing the Effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. **Ecotoxicology**, London, v. 20, n. 1, p. 149-157, jan. 2011.
- CRUZ, A. S.; 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**, Dordrecht, v. 26, n. 2, p. 165-179, apr. 2010.
- CRUZ-LANDIM, C; SILVA DE MORAES, R. L. M.; SERRÃO, E. Ultraestrutural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). **Journal of comparative biology**, São Paulo, v. 1, p. 29-40, 1996.

- CRUZ-LANDIM, C. Specializations of the Malpighi Tubules cells in a stingless bee, *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae). **Acta Microscópica**, Caracas, v. 7, n. 2, p. 26-33, 1998.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, 2009. 416p.
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 52, p. 81–106, jan. 2007.
- DIVELY, G. P.; KAMEL, A. Insecticide residues in pollen and nectar of a *Cucurbit* crop and their potential exposure to pollinators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, n. 18, p. 4449–4456, mar.2012.
- DOW, J. A. T. Ion and water transport in locust alimentary canal: evidence from in vivo electrochemical gradients. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 93, p. 167-179, 1981.
- DUNN, P. E. Biochemical aspects of insect immunology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 31, p. 321-339, jan. 1986.
- DUSSAUBAT, C.; BRUNET, J. L.; HIGES, M.; COLBOURNE, J. K.; LOPEZ, J.; CHOI, J. H.; HERNANDEZ, R. M.; BOTIAS, C.; COUSIN, M.; MCDONNELL, C.; BONNET, M.; BELZUNCES, L. P.; MORITZ, R. F. A.; LE CONTE, Y.; ALAUX, C. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-11, may 2012.
- ELLIS, J. D.; EVANS, J. D.; PETTIS, J. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 49, n. 1, p. 134-136, 2010.
- FAHRBACH, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 209-232, jan. 2006.
- FAIRBROTHER, A.; PURDY, J.; ANDERSON, T.; FELLK, R. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Michigan, v. 33, n. 4, p.7 19-731, apr. 2014.
- 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**, New York, v. 414, n. 1, p. 97-113, nov. 1999.
- FARRIS, S. M.; SINAKEVITCH, I. Development and evolution of the insect mushroom bodies: towards the understanding of conserved developmental mechanisms in a higher brain center. **Arthropod Structure and Development**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 79-101, aug. 2003.
- FRANCOY, T.M.; GONÇALVES, L.S.; DE JONG, D. Rapid morphological changes in populations of hybrids between Africanized and European honey bees. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.11, n.3, p.3349-3356, set. 2012.
- FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Apis)**. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 1980. 79p.
- FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 282–298, mar. 2010.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVEZ, S. B.; VENDRAMIM, J.

D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007. 576p.

GREGORC, A.; BOWEN, I. D. In situ localization of heat-shock and histone proteins in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae infected with *Paenibacillus larvae*. **Cell Biology International**, London, v. 23, n. 3, p. 211-218, mar. 1999.

GREGORC, A.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CARVALHO, S. M.; KARAMBEGER, D.; TEIXEIRA E. W.; MALASPINA, O. Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. **Chemosphere**, Oxford, v. 147, p. 328-336, mar. 2016.

GRONENBERG, W. Subdivisions of hymenopteran mushroom body calyces by their afferent supply. **The Journal of Comparative Neurology**, New York, v. 435, n. 4, p. 474-89, July 2001.

HIGES, M.; MARTIN-FERNANDEZ, R.; BOTIAS, C.; GARRIDO-BAILON, E.; GONZALEZ-PORTO, A. V.; BARRIOS, L.; DEL NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; JIMENEZ, J. J.; PALENCIA, P. G.; MEANA, A. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 10, p. 2659-2669, July 2008.

HIGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; GARRIDO-BAILÓN, E.; GONZÁLEZ-PORTO, A. V.; GARCÍA-PALENCIA, P.; MEANA, A.; DEL NOZAL, M. J.; MAYO, R.; BERNAL, J. L. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. **Environmental Microbiology Reports**, Oxford, v.1, n. 2, p. 110-113, Feb. 2009.

HIGES, M.; JUARRANZ, A.; DIAS-ALMEIDA, J.; LUCENA, S.; BOTIAS, C.; MEANA, A.; GARCÍA-PALENCIA, P.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, p. 530–536, Apr. 2013.

HILFIKER, S.; PIERIBONE, V. A.; CZERNIK, A. J.; KAO, H.; AUGUSTINE, G. J.; GREENGARD, P. Synapsin as regulators of neurotransmitter release. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 354, p. 269-279, Feb. 1999.

HO, M. W.; CUMMINS, J. Mystery of disappearing honeybees. **Science Society**, v. 34, p. 35-36, 2007.

HUTTNER, W. B.; SCHIEBLER, W.; GREENGARD, P.; DE CAMILLI, P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 96, n.5, p. 1374–1388, May 1983.

ILYASOV, R.; GAIFULLINA, L.; SALTYSKOVA, E.; POSKRYAKOV, A.; NIKOLENKO, A. Review of the expression of antimicrobial peptide defensin in honey bees *Apis mellifera* L. **Journal of Apicultural Science**, Puławy, v. 56, n. 1, p. 115-124, Apr. 2012.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A. **Abelhas sociais e flores – análise polínica como método de estudo**. In: PIRANI, J. R.; CORTOPASSI LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP/FAPESP. 1993. p. 17- 30.

- JACOB, C. R. O.; SOARES, H. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 71, n. 1, p. 114–122, jan. 2015.
- JIMENEZ, D. R.; GILLIAM, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honeybee *Apis mellifera* L.: cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase and nonspecific esterase. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 261, n. 3, p. 431–443, may 1990.
- KABAKOV, A. E.; BUDAGOVA, K. R.; LATCHMAN, D. S.; KAMPINGA, H. H. Stressful preconditioning and HSP70 overexpression attenuate proteotoxicity of cellular ATP depletion. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 283, n. 2, p. C521–C534, aug. 2002.
- KAKAMAND, F. A. K. H.; MAHMOUD, T. T.; AMIN, A. B. M. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. **Journal of Duhok University**, Duhok, v. 11, n.1, p.144-151, 2008.
- KATO, K.; AWASAKI, T.; ITO, K. Neuronal programmed cell death induces glial cell division in the adult *Drosophila* brain. **Development**, Cambridge, v. 136, p. 51–59. 2009.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. Much remains to be learned about pollinators and plants. **Bioscience**, Washington, v. 47, n. 5, p. 297–307, may 1997.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; SILVA, A. C.; ASSIS, M. G. P. Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias estratégicas**, Brasília, n. 12, p. 20 - 41, 2001.
- KIYA, T.; KUNIEDA, T.; KUBO, T. Increased neural activity of a mushroom body neuron subtype in the brains of forager honeybees. **Plos One**, San Francisco, v. 2, n. 4, p.e371, abr. 2007.
- KOMISCHKE, B.; SANDOZ, J-C.; MALUN, D.; GIURFA, M. Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. **European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 477–485, jan. 2005.
- KRETZCHMAR, D.; PFLUGFELDER, G. O. Glia in development, function, and neurodegeneration of adult insect brain. **Brain Research Bulletin**, Phoenix, v. 57, n. 1, p. 121–131, jan. 2002.
- LLINÁS, R.; McGUINNESS, T. L.; LEONARD, C. S.; SUGIMORI, M.; GREENGARD, P. Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82, n. 9, p. 3035–3039, may 1985.
- MALLON, E. B.; BROCKMANN, A.; SCHMID-HEMPEL, P. Immune response inhibits associative learning in insects. **Proceedings of the Royal Society of London- Series B-Biological sciences**, London, v. 270, n. 1532, p. 2471–2473, dec. 2003.
- MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 6.ed. São Paulo: Nobel. 1983. 305p. v. 1.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A.; PRIETO, L.; MARTÍNEZ-SALVADOR, A.; GARRIDO-BAILÓN, E.; HIGES, M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 20, p. 6331–6338, oct. 2007.

- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A.; GARCÍA-PALENCIA, P.; MARÍN, P.; BOTÍA, C.; GARRIDO-BAILÓN, E.; BARRIOS, L.; HIGES, M. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 8, p. 2554-2557, abr. 2009.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; BOTÍA, C.; BARRIOS, L.; MARTÍNEZ-SALVADOR, A.; MEANA, A.; MAYACK, C.; HIGES, M. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, n. 3, p. 605-612, mar. 2011.
- MAYACK, C.; NAUG, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 100, n. 3, p.185–188, mar. 2009.
- MAYACK, C.; NATSOPOULOU, M. E.; MCMAHON, D. P. *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 662-70. sep 2015.
- MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular function and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 670, mar. 2005.
- MCDONNELL, C. M.; ALAUX, C.; PARRINELLO, H.; DESVIGNES, J. P.; CRAUSER, D.; DURBESSON, E.; BESLAY, D.; LE CONTE, Y. Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). **BMC Ecology**, London, v. 13, p. 25, july 2013.
- NEUMANN, H.; KOTTER, M. R.; FRANKLIN, R. J. M. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. **Brain**, London, v. 132, n. 2, p. 288-295, june 2009.
- NEUMANN, P.; CARRECK, N. L. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 49, n. 1, p. 1-6, apr. 2010.
- OLDROYD, B. P. What's killing American honey bees? **Plos Biology**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1195-1199, june 2007.
- OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-Effects of Thiamethoxam on the Brain and Midgut of the Africanized Honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, New York, v. 29, n. 10, p. 1122-1133. oct. 2014.
- PETTIS, J. S.; VAN ENGELSDORP, D.; JOHNSON, J.; DIVELY, G. Pesticide exposure in honey bees results in increased level of the gut pathogen *Nosema*. **Naturwissenschaften**, v. 99, p. 153-158, jan. 2012.
- PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; VANENGELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **Plos One**, San Francisco, v. 98, n. 7, p.1-9, july 2013.
- PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, E. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 51, n. 5, p.422-442, maio 2016.
- POHORECKA, K.; SKUBIDA, P.; MISZCZAK, A.; SEMKIW, P.; SIKORSKI, P.; ZAGIBAJLO, K.; TEPER, D.; KOLTOWSKI, Z.; SKUBIDA, M.; ZDAŃSKA, D.; BOBER, A. Residues of neonicotinoid insecticides in bee collected plant materials from oilseed rape

crops and their effect on bee colonies. **Journal of Apicultural Science**, Puławy, v. 56, n. 2, p. 115-134, dec. 2012.

ROAT, T. C.; SANTOS-PINTO, J. R. A.; SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. **Ecotoxicology**, London, v. 23, n. 9, p. 1659–1670, nov. 2014.

RYBAK, J.; MENZEL, R. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. **Journal of Comparative Neurology**, New York, v. 334, n. 3, p. 444-465, aug. 1993.

SAWCZYN, T.; DOŁOZYCH, B.; KŁOSO, M.; AUGUSTYNIAK, M.; STYGAR, D.; BULDAK, R. J.; ZWIRSKA-KORCZALA, K. Alteration of carbohydrates metabolism and midgut glucose absorption in *Gromphadorhina portentosa* after subchronic exposure to imidacloprid and fenitrothion. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, Monticello, v. 47, n. 11, p. 1644-1651. jun. 2012.

SCHMUCK, R.; SCHONING, R.; STORK, A.; SCHRAMEL, O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 57, n. 3, p. 225-238, mar. 2001.

SNODGRASS, R. E. **Principles of Insect Morphology**. New York: McGraw-Hill Co., 1935. p.667.

SOARES, H. M. **Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 87p. 2012.

SOGORB, M. A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.128,, n. 1-3, p. 215-228. mar. 2002.

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

STONER, K. A; EITZER, B. D. Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. 1-5, june 2012.

SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, West Sussex. v. 60, n. 3, p. 291-296, mar. 2004.

SUR, R.; STORK, A. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 56, n.1, p.35-40, 2003.

TAKAYAMA, S.; REED, J. C.; HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, p. 9041-9047, 2003.

TEIXEIRA, E. W.; SANTOS L. G.; SATTTLER, A.; MESSAGE, D.; ALVES, M. L. T. M. F.; MARTINS, M.F. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 114, n. 3, p. 250-254, nov. 2013.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. The physiological role of the peritrophic membrane and trehalose: digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larval of *Rhynchosciara*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 325-331, 1981.

- TERRA, W. R. The origin and function of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 47, n. 2, p. 47-61, june 2001.
- THANY, S. H.; LENAERS, G.; CROZATIER, M.; ARMENGAUD, C.; GAUTHIER, M. Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 255-262, jun. 2003.
- THANY, S. H.; CROZATIER, M.; RAYMOND-DELPECH, V.; GAUTHIER, M.; LENAERS, G. *Apis* α 2, *Apis* α 7-1 and *Apis* α 7-2: three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor α -subunits in the honeybee brain. **Gene**, Amsterdam, v. 344, p. 125-132, 2005.
- TISSOT, M; STOCKER, R.F; Metamorphosis in Drosophila and other insects: the fate of neurons throughout the stages. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v.62, n.1, p.89-111, 2000.
- VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R. M.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony Collapse Disorder: a descriptive study. **Plos One**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. 1-17, ago. 2009.
- VIDAU, C.; DIOGON, M.; AUFAUVRE, J.; FONTBONNE, R.; VIGUÈS, B.; BRUNET, J. L.; TEXIER, C.; BIRON, D. G.; BLOT, N.; ALAOUI, H. E.; BELZUNCES, L. P.; DELBAC, F. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 6, p. 1-8, june 2011.
- WATANABE, M. E. Colony Collapse Disorder: Many Suspects, No Smoking Gun. **BioScience**, Washington, v. 58, n. 5, p. 384-388, may 2008.
- WONG, H. R.; MENENDEZ, I. Y.; RYAN, M. A.; DENENBERG, A. G.; WISPE, J. R. Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 275, n. 4, p. 836-841, oct. 1998.
- YANG, E. C.; CHANG, H. C.; WU, W. Y.; CHEN, Y. W. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 11, nov. 2012.
- YANG, E. C.; CHUANG, Y. C.; CHEN Y. L.; CHANG, L. H. Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 6, p. 1743-1748, dec. 2008.
- ZERBO, A. C. **Diferenciação morfológica e funcional do tubo digestivo de operárias de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 101p. 2003.