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

**ESTRESSE CELULAR E ATIVIDADE DE ENZIMAS BIOMARCADORAS EM
ABELHAS AFRICANIZADAS *Apis mellifera* LINEU, 1758
(HYMENOPTERA, APIDAE) EXPOSTAS AO TIAMETOXAM**

PÂMELA DECIO

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

**Rio Claro - SP
Junho - 2019**

PÂMELA DECIO

**ESTRESSE CELULAR E ATIVIDADE DE ENZIMAS
BIOMARCADORAS EM ABELHAS AFRICANIZADAS
Apis mellifera LINEU, 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE)
EXPOSTAS AO TIAMETOXAM**

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Coorientadora: Prof. Dra. Thaisa C. Roat

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

Rio Claro - SP
2019

D294e Decio, Pâmela
Estresse celular e atividade de enzimas biomarcadoras em abelhas africanizadas *Apis mellifera* LINEU, 1758 (Hymenoptera, Apidae) expostas ao tiametoxam / Pâmela Decio. -- Rio Claro, 2019
92 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina
Coorientadora: Thaisa C. Roat

1. Toxicologia. 2. Abelha. 3. Análise enzimática. 4. Stress, Oxidative. 5. Inseticida. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

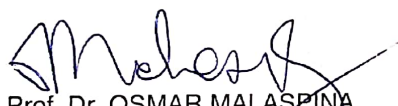
TÍTULO DA TESE: Estresse celular e atividade de enzimas biomarcadoras em abelhas africanizadas *Apis mellifera* Lineu, 1758 (Hymenoptera, Apidae) expostas ao tiametoxam.


AUTORA: PÂMELA DECIO HORST


ORIENTADOR: OSMAR MALASPINA


COORIENTADORA: THAISA CRISTINA ROAT

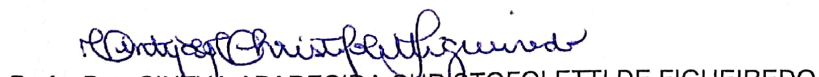
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. OSMAR MALASPINA
CEIS / IB Rio Claro


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


Profa. Dra. GRASIELA DIAS DE CAMPOS SEVERI
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Universidade Estadual de Campinas


Profa. Dra. HELLEN MARIA SOARES LIMA
Pós-Doutoranda do Departamento de Biologia / UFSCar, Campus Sorocaba


Profa. Dra. CINTYA APARECIDA CRISTOFOLETTI DE FIGUEIREDO
x / Fundação Hermínio Ometto, UNIARARAS

Rio Claro, 15 de abril de 2019

*Àquela que me fez renascer,
minha filha Flora.*

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos: 2012/13370-8; 2013/21832-4; 2014/23197-7; 2015/22368-5;) pelo suporte financeiro à pesquisa realizada.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina pela orientação, amizade e confiança nesses cinco anos.

À Profa. Dra. Thaisa Cristina Roat pela amizade, carinho, companheirismo nas tardes no CEIS, por viabilizar meu projeto na Inglaterra, pela orientação, pelos conselhos e por todo o aprendizado que me passou.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA), Priscila Friol e Aline Catae pela grande amizade e por me ajudarem com as coletas e marcações das abelhas; ao Lucas Miotelo e a Ana Luiza Mendes por me ensinarem a dissecar, pelo companheirismo, por toda ajuda durante o projeto; ao Rodrigo Avelaria Barbosa, Jéssica Araújo, Daiana Tavares e Gabriela Tófilo pela ajuda com a atividade enzimática; à Tatiane Grella pela parceria e pelas horas à fio com a imunomarcagem e no microscópio confocal; à Hellen Soares pelas ideias, contribuições e intermináveis áudios trocados; à Adna Dorigo, Isabela Camargo, Annelise Rosa-Fontana, Patricia Azevedo, Nicole Butolo, Elisângela Fernandes, Lais Inoue, pelas risadas e pela convivência no laboratório; ao Caio Domingues por ter se tornado um grande amigo e parceiro no dia a dia no CEIS. À todos vocês pela amizade construída e pelas colaborações no dia a dia.

Agradeço ainda a todo o pessoal do laboratório das formigas do CEIS, com os quais eu pude contar inúmeras vezes durante meu doutorado e com os quais eu sei que pra sempre terei uma ligação especial na pesquisa. Agradeço principalmente à minha grande amiga Manuela Ramalho Sanches, por estar comigo nesta jornada desde a nossa graduação, por dividir comigo também os anseios da tarefa de ser mãe e pesquisadora, por ser a pessoa que não te deixa desanimar diante de resultados ruins, que te incentiva, te apoia e te faz acreditar em todo o seu potencial. Uma verdadeira *Woman in Science*. Obrigada de coração pelos conselhos, sugestões e correções nos capítulos, por tudo, sempre.

Aos técnicos Sérgio Pascon, Priscila Socolowski, Flávia Rodrigues e Bibiana, aos alunos do Laboratório de Evolução Molecular (LEM), Sérgio Kakazu, Milene Ferro e Renata Aquino, pela disponibilidade em ajudar e pela gentileza com que sempre se propuseram a me atender. À Necis Miranda pela doçura e eficiência diária na secretaria do CEIS.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales e a todo o pessoal do Laboratório de Mutagênese Ambiental (LMA), especialmente ao Franco Pereira por ter sido essencial na realização desse projeto, pela convivência, amizade, auxílio, discussões e apoio.

Ao Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro e ao Centro de Estudos de Insetos Sociais, por onde percorri toda minha trajetória acadêmica.

À University of Birmingham, School of Bioscience, ao professor e supervisor Matthias Soller e seu grupo de alunos e também ao professor Reinhard Stöger, pela parceria no projeto BEPE e pela oportunidade de me ensinarem como a pesquisa é feita no Reino Unido. À todos os meus amigos de Birmingham, principalmente os brasileiros, por me ajudarem a atravessar esse período longe de casa. Um agradecimento especial à querida Suzana Ulian Benitez, pela companhia, pelo apoio, por compartilhar a diversão e as dificuldades, por ser uma inspiração para mim no mundo científico. Uma amizade que levarei para sempre.

Aos meus amigos da universidade, da pós-graduação e da vida, mas principalmente à Clara Belchior e Naiara Büll, mulheres que eu admiro muito, por estarem sempre próximas e terem um papel imprescindível na minha vida muito antes de eu entrar na universidade. À Larissa Benites, por embora ter chegado só mais recentemente, caminha sempre comigo, não importando a nossa distância física e também por ser um modelo de ser humano e inspiração na vida de professora universitária pra mim. Às amigas da graduação Monizze Vanucci, Vanelize Janei e Eliziane Garcia, pelos anos de amizade que sobreviveram após a UNESP, pelas problematizações e pelos desabafos acadêmicos trocados.

Agradeço à toda minha família, minhas irmãs Paloma e Tamires, meu irmão Junior, meus cunhados e sobrinhos pela nossa bonita união, por fazerem parte tão intensamente da minha vida e estarem sempre torcendo e vibrando por mim. Ao meu pai e minha mãe, pelo amor incondicional, por tantas vezes se sacrificarem por nós, pela fé em Deus inabalável, pelas orações que sempre me levam avante. À toda minha família, por serem a minha base, meu porto seguro, por se revezarem nos cuidados com a Flora para que eu conseguisse escrever a tese na reta final.

Ao meu amigo e marido, companheiro da vida, Sherman, pela parceria, pelo amor, pela paciência, por toda ajuda direta e indireta na realização desse trabalho, por em muitas etapas, cuidar de tudo sozinho em casa para que eu pudesse me dedicar ao projeto do doutorado. Por me incentivar e nunca me deixar desistir. Por nossa maior riqueza e sonho realizado, nossa Flora.

À minha filha Flora, por fazer tudo ganhar um novo sentido. Por me arrancar sorrisos diários, por fazer a vida ficar mais leve e colorida, mas ao mesmo tempo por fazer crescer em

mim uma vontade de lutar por um mundo melhor e mais justo. Por fazer todo sacrifício valer à pena.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, que me ajudaram e estiveram comigo nessa longa jornada. Sem a ajuda de cada um de vocês não teria sido possível. Em todos esses anos dentro da universidade, pude compreender que gentileza gera gentileza e que vamos mais longe com uma forte rede de colaboração mútua.

Agradeço acima de tudo a Deus, sem o qual eu não teria conseguido trilhar meu caminho até aqui.

*“Eu fui ensinada que o caminho do progresso não
é nem rápido, nem fácil”*

(Marie Curie)

ESTRESSE CELULAR E ATIVIDADE DE ENZIMAS BIOMARCADORAS EM ABELHAS AFRICANIZADAS *Apis mellifera* LINEU, 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE) EXPOSTAS AO TIAMETOXAM

Resumo

As abelhas *Apis mellifera* africanizadas são consideradas importantes polinizadores no Brasil, uma vez que muitas culturas de alimentos dependem da polinização promovida por esses insetos. No entanto, com o crescimento da produtividade agrícola houve aumento do uso de agrotóxicos para o controle de pragas, os quais podem atingir também insetos não-alvo. Com a ação dos inseticidas como uma das possíveis causadoras da morte massiva desses polinizadores, pesquisas sobre o impacto dos agrotóxicos em abelhas receberam destaque. Diante do exposto, o presente estudo propôs investigar os efeitos de uma dose subletal de tiametoxam (TMX) (0,0227 ng de ingrediente ativo/ μ l de alimento), importante inseticida da classe dos neonicotinóides, no cérebro e no intestino de *Apis mellifera* africanizadas, por meio da avaliação da atividade de biomarcadores enzimáticos de exposição e de estresse oxidativo e pela ocorrência de peroxidação lipídica. O nível de estresse celular também foi investigado pela imunomarcagem das proteínas de choque térmico HSP70 e HSP90 em conjunto com a detecção de morte celular pelo ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). Os dados mostraram que, no cérebro, o TMX aumentou a atividade de acetilcolinesterase (AChE) em 1, 3 e 5 dias de exposição, enquanto a carboxilesterase (CaE) diminuiu no primeiro dia e a glutatona s-transferase (GST) aumentou no quinto dia. Por sua vez, as enzimas antioxidantes foram menos atuantes no cérebro, sendo que somente a glutatona peroxidase (GPX) apresentou aumento da atividade no primeiro dia de exposição. No intestino, não houve resposta da fosfatase alcalina (FAL) e da GST, mas houve declínio da atividade de CaE no primeiro e no quinto dia de contaminação. Diferentemente do cérebro, as enzimas antioxidantes foram mais afetadas no intestino ocorrendo aumento da superóxido dismutase (SOD) no quinto dia e da GPX no terceiro. O teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) só apresentou aumento da determinação da peroxidação lipídica no intestino, após 5 dias de exposição. Adicionalmente, foi possível observar imunomarcagem aumentada de HSP70 e HSP90 no cérebro e no intestino em praticamente todos os tempos analisados (com exceção da HSP90 no cérebro nas primeiras 24hrs de exposição), mas não foi detectada presença de morte celular em nenhum dos grupos avaliados. Os dados gerados

indicam que, de uma forma geral, o TMX induziu alteração das enzimas biomarcadoras de exposição, principalmente no tecido nervoso, enquanto que as enzimas antioxidantes foram moduladas principalmente no intestino. Além disso, os resultados evidenciam que a alta expressão das HSPs 70 e 90 tem efeito protetivo, evitando a morte celular no cérebro e no tecido epitelial do intestino das abelhas expostas a dose subletal do neonicotinóide. Portanto, embora o TMX tenha provocado a resposta do sistema antioxidante, ativado enzimas biomarcadoras para detoxificação e as HSPs de maneiras diferentes entre o cérebro e o intestino, a dose subletal utilizada e o tempo de exposição de até 5 dias não foram suficientes para causar danos celulares mais extensos como o processo de morte celular com quebra de DNA, por exemplo. Uma segunda parte do estudo foi realizada na University of Birmingham (UK) e mostrou que doses subletais de pesticidas como o TMX, o fungicida carbendazim (CAB) e o herbicida glifosato (GLF) não foram suficientes para causar alteração no padrão de splicing alternativo dos genes *Dscam* e *elav*, envolvidos com a formação da rede de neurônios do sistema nervoso, assim como não foram observadas alterações para o gene *Xbp1*, que à partir de um tipo diferente de splicing, desencadeia uma resposta que evita o acúmulo de proteínas mal dobradas (UPR) sob condições de estresse. Esses resultados sugerem que as doses subletais utilizadas e o tempo de exposição (1 dia) não foram suficientes para induzir respostas nesses 3 genes como biomarcadores em *A. mellifera*. Por meio de ensaios enzimáticos, da imunomarcagem de HSPs e morte celular e de técnicas de biologia molecular para detecção de splicing alternativo, esse estudo contribui com diversos dados que caracterizam os efeitos do neonicotinóide TMX nas abelhas *A. mellifera*, fornecendo assim informações que podem embasar argumentos para conduzir a discussão sobre as leis regulamentadoras do uso desses agrotóxicos e o manejo destes polinizadores em áreas agrícolas.

Palavras-chave: neonicotinóide, estresse oxidativo, morte celular, HSPs, splicing alternativo, cérebro, intestino.

CELL STRESS AND ACTIVITY OF BIOMARKERS ENZYMES IN AFRICANIZED BEES *Apis mellifera* LINEU, 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE) EXPOSED TO THIAMETHOXAM

Abstract

Africanized *Apis mellifera* bees are considered important pollinators in Brazil, since many food crops depend on the pollination by these insects. However, with the growth of agricultural productivity there has been an increase in the use of insecticides for pest control, which also can reach non-target insects. With the action of insecticides as one of the possible causes of the massive death of these pollinators, the studies of the effects of pesticides on bees were highlighted. Given the context, the present study aimed to investigate the effects of a sub lethal dose of thiamethoxam - TMX (0.0227 ng of active ingredient / μ l of food), a insecticide of the class of neonicotinoids, in the brain and intestine of Africanized *Apis mellifera*, through the evaluation of the activity of enzymatic biomarkers of exposure and of oxidative stress and by the occurrence of lipid peroxidation. The level of cell stress was also investigated by the immunostaining of the HSP70 and HSP90 proteins together with the detection of cell death by the TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) assay. The data showed that, in the brain, TMX increased acetylcholinesterase activity (AChE) at 1, 3 and 5 days of exposure, while carboxylesterase (CaE) decreased on the first day and glutathione s-transferase (GST) increased in the fifth day. On the other hand, antioxidant enzymes were less active in the brain, and only glutathione peroxidase (GPX) showed increased activity on the first day of exposure. In the intestine, there was no alkaline phosphatase (FAL) or GST response. But there was a decline in CaE activity on the first and fifth day of contamination. Differently from the brain, antioxidant enzymes were most affected in the intestine with increased superoxide dismutase (SOD) on the fifth and GPX in the third day. The TBARS test only showed an increase in the determination of lipid peroxidation in the intestine after 5 days of exposure. In addition to that, it was possible to observe positive immunoblotting of HSP70 and HSP90 in the brain and intestine in almost every analyzed time (except for HSP90 in the brain in the first 24 hours of exposure), but no cell death was detected in any of the evaluated groups. The generated data indicates that, in general, TMX induces alteration on biomarkers of exposure mainly in nerve tissue while antioxidant enzymes were modulated mostly in the intestine. Furthermore, the results show that the high expression of HSPs 70 and 90 has a protective effect, preventing cell death in the brain and in the intestinal epithelial tissue of bees exposed to the sub lethal dose of neonicotinoid. A second part of the study was conducted at

the University of Birmingham (UK) and showed that sub lethal doses of pesticides such as thiametoxam, fungicide carbendazim (CAB) and herbicide glyphosate (GLF) were not sufficient to cause alteration in the alternative splicing pattern of the Dscam and elav genes involved with the formation of the neurons network of the nervous system, as well as no changes were observed for the Xbp1 gene, which, from a different type of splicing, triggers a response that avoids the accumulation of Unfolded Protein Response (UPR) under conditions of stress. These results suggest that the sublethal doses used and the exposure time (1 day) were not sufficient to indicate responses in these 3 genes as biomarkers in *A. mellifera*. By means of enzymatic assays, HSPs immunostaining and cell death, and molecular biology techniques for the detection of alternative splicing, this study contributes with several data characterizing the effects of neonicotinoid TMX on *A. mellifera* bees, thus providing information that can support arguments to lead the discussion on the laws regulating the use of these pesticides and the management of these pollinators in agricultural areas.

Keywords: neonicotinoid, oxidative stress, cell death, HSPs, alternative splicing, brain, intestine.

Lista de abreviaturas

AcHE: Acetilcolinesterase

B.O.D.: *Biochemical Oxygen Demand*

CAB: Carbendazim

CaE: Carboxilesterase

CCD: *Colony Collapse Disorder*

CL₅₀: Concentração letal média

DEPC: *Diethylpyrocarbonate*

dH₂O: *Deionized water* (água deionizada)

DL₅₀: Dose letal média

dNTPs: *Deoxynucleotide triphosphates*

Dscam: *Down syndrome cell adhesion molecule* (Molécula de adesão celular da Síndrome de Down)

DTT: *Dithiothreitol*

dUTP: *Deoxyuridine triphosphate*

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

Elav: *Embryonic lethal abnormal visual system* (Sistema visual anormal letal embrionário)

ERO: Espécies reativas de oxigênio

FAL: Fosfatase alcalina

GLF: Glifosato

GPX: Glutathione peroxidase

GST: Glutathione S-transferase

HSP: *Heat shock proteins* (Proteínas de choque térmico)

MDA: malondialdeído

SOD: Superóxido dismutase

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBE: Tris/Borate/EDTA

TMX: Tiametoxam

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

UPR: *Unfolded protein response* (resposta à proteínas mal enoveladas)

Xbp1: *X-box binding protein 1*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. OBJETIVOS	19
3. CAPÍTULO 1	20
Avaliação da resposta enzimática na cabeça e no intestino de <i>Apis mellifera</i> africanizadas expostas a uma dose subletal de TMX	
Resumo	21
Introdução	22
Materiais e Métodos	25
Resultados	30
Discussão	34
Agradecimentos	37
Referências Bibliográficas.....	37
4. CAPÍTULO 2	43
Função protetora das HSP70 e HSP90 em abelhas africanizadas expostas ao TMX	
Resumo	44
Introdução	45
Materiais e Métodos	47
Resultados	51
Discussão	58
Agradecimentos	61
Referências Bibliográficas.....	61
5. CAPÍTULO 3	65
Acute thiamethoxam exposure in <i>Apis mellifera</i>: Absence of both stress-induced RNA splicing and synergistic effects of common fungicide and herbicide	
Resumo	66
Abstract	67
Introduction	68
Material and Methods	71
Results	75
Discussion	80
Acknowledgment	81
References	81

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1- INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, as abelhas africanizadas em conjunto com mais de 1500 espécies de abelhas nativas, distribuídas em quase 300 gêneros (SILVEIRA et al., 2002) são responsáveis pela polinização de 30 a 90% da flora nativa dependendo do ecossistema considerado (KERR, et al., 2001). Um estudo recente que analisou 141 cultivos do país, revelou que 85 deles dependem de polinizadores, sendo que para quase um terço destas culturas esses agentes são essenciais, gerando uma contribuição econômica que totaliza quase 30% (aproximadamente US\$12 bilhões) do valor total da produção agrícola anual das culturas dependentes (GIANINNI et al., 2015).

No entanto, a expansão das áreas cultiváveis que regem o modelo agrícola brasileiro formado por extensas áreas de monocultura, promoveu o crescimento do mercado de agrotóxicos na busca por combater pragas e, aliado ao uso da tecnologia das máquinas do campo, melhorar a qualidade e a quantidade da produção das culturas (FIRPO et al., 2012). Somente no ano de 2017, foram comercializados 539.944,95 toneladas de produtos fitossanitários (IBAMA, 2018). A questão gerada pelo amplo uso de agrotóxicos é que muitas vezes esses produtos não afetam somente pragas e patógenos agrícolas, mas acabam atingindo insetos benéficos associados aos cultivos, como os polinizadores, por exemplo (BLACQUIÈRE et al., 2012; GILL; GARG, 2014)

Dessa maneira, há duas vias de intoxicação pelas quais as abelhas ficam expostas aos inseticidas. Uma é por contato, uma vez que as abelhas, devido ao seu comportamento de forrageamento para coletar néctar e pólen ficam vulneráveis aos produtos químicos pulverizados no campo, pois numerosas partículas de substâncias tóxicas suspensas no ar podem ficar aderidas aos pêlos superficiais de seu corpo, sendo então retidas em seu sistema respiratório ou armazenadas em sua vesícula melífera e no pólen coletados. (THOMPSON, 2003; DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; WOLFF; REIS; SANTOS, 2008). A outra maneira é a contaminação via oral por inseticidas sistêmicos. As plantas absorvem estes produtos químicos através de suas raízes ou folhas e os tecidos vasculares o transportam para os caules, folhas, flores e frutos. Com isso, resíduos destes inseticidas podem ser encontrados no pólen e néctar, que são consumidos pelos polinizadores, como as abelhas (HOPWOOD et al., 2012). Assim, toda a colônia fica exposta, pois os demais indivíduos se alimentam do material coletado contaminado com o agrotóxico. (PHAM-DELÈGUE et al., 2002; WOLFF; REIS; SANTOS, 2008).

Desde 2006, muitos países noticiaram uma perda acentuada no número de suas colônias de abelhas melíferas, fenômeno que ficou conhecido como “*Colony Collapse Disorder*” (CCD) e trouxe preocupações ecológicas e econômicas com as perdas na biodiversidade e na produtividade agrícola (FAO, 2004; OLDROYD, 2007; JACOB, 2012; BRODSCHNEIDER et al., 2018). No Brasil, os relatos de apicultores sobre perda de colônias têm se tornado cada vez mais frequentes e, embora as causas dessas perdas não tenham sido efetivamente esclarecidas, acredita-se que a origem do problema seja multifatorial, sendo uma das causas a aplicação de agrotóxicos feita de maneira incorreta nas áreas próximas aos apiários (PIRES et al., 2016).

Diante desse panorama e do prejuízo econômico gerado em decorrência da crescente perda de colônias, a atenção se voltou para o debate sobre os efeitos dos agrotóxicos em abelhas (JOHNSON, 2015; PIRES et al., 2016; ROSA et al., 2019). Os inseticidas neonicotinóides, como o tiametoxam (TMX), apresentam ação neurotóxica e atuam como agonistas, mimetizando o neurotransmissor acetilcolina e competindo com ela pelos seus receptores nicotinérgicos que medeiam o impulso nervoso. No entanto, ao contrário da ligação natural da acetilcolina com o seu receptor, a ligação com o inseticida é persistente, uma vez que os neonicotinóides são insensíveis a ação da acetilcolinesterase, enzima que degrada as moléculas neurotransmissoras após a ligação com o receptor. Com a ativação dos receptores prolongada de modo anormal, ocorre hiperexcitabilidade devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos. Os sintomas resultantes da intoxicação pelo TMX incluem tremores, falhas na coordenação e, eventualmente, colapso do sistema nervoso central e morte (ISHAAYA et al., 2007; LIMA; ROCHA, 2012). Outra característica dos neonicotinóides é que eles são sistêmicos nas plantas, sendo rapidamente absorvidos e difundidos ao longo de todos os tecidos vegetais, promovendo assim um efeito de longa duração contra insetos-pragas (FORD; CASIDA, 2008; HOPWOOD et al., 2012).

No Brasil, o TMX é um neonicotinóide de segunda geração utilizado em diversas culturas, como: citros, café, cana-de-açúcar, arroz, abacaxi entre outros (ANVISA, 2018). Estudos tem revelado seus efeitos sob abelhas, como Oliveira e colaboradores (2013) que observaram que mesmo em subdoses, o TMX demonstrou-se tóxico para *Apis mellifera*, diminuindo o número de células regenerativas do intestino e provocando danos para o cérebro. Outra pesquisa revelou a presença de TMX em abelhas mortas coletadas em cidades do interior de São Paulo, após o declínio de diversas colônias (MALASPINA et al., 2010). Além dos efeitos provocados por neonicotinóides como o TMX, a combinação desses inseticidas com outros agrotóxicos comumente utilizados nos cultivos, como o herbicida glifosato (GLF) e o fungicida carbendazim (CAB), também tem sido estudados na busca por possíveis efeitos

sinérgicos (ZHU, et al. 2017; SGOLASTRA, et al. 2018; TOSI; NIEH, 2019). Assim, a busca por informações sobre o impacto dos neonicotinóides e da sua combinação com outros agrotóxicos em polinizadores é de grande importância visando contribuir com o debate para o manejo apropriado destes polinizadores em áreas agrícolas e também para conduzir a discussão sobre as leis regulamentadoras de comercialização e uso desses agrotóxicos.

A definição dos órgãos para os estudos de toxicidade, além de avaliar os efeitos do TMX no cérebro das abelhas, devido ao fato do neonicotinóide ser neurotóxico, a análise do intestino é importante, pois apesar de não se tratar de um tecido alvo do inseticida, é atingido durante a rota de metabolização deste composto, uma vez que é o órgão responsável pela absorção de nutrientes e acaba entrando em contato com o inseticida, quando este é ingerido (THIBOLDEAUX et al., 1998; SOROUR, 2001; MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006).

Uma das maneiras de verificar os efeitos do TMX em *A. mellifera* africanizada é a análise aprofundada sobre a toxicidade deste composto, por meio da investigação da alteração da atividade de enzimas biomarcadoras de exposição e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo. Estudos ecotoxicológicos demonstraram que os padrões de respostas enzimática em *A. mellifera* podem ser alterados quando as mesmas são expostas a vários tipos de xenobióticos, incluindo inseticidas (BADIOU-BENETEAU et al., 2012; CARVALHO et al., 2013). De acordo com Hyne e Maher (2003) diversas enzimas apresentam potencial para uso em programas de monitoramento ambiental, podendo ser utilizadas como biomarcadores de exposição como a Acetilcolinesterase (AChE), a Carboxilesterase (CaE), a Glutathione S-Transferase (GST), as metalotioneínas e as Cyp450, e outras envolvidas com sistemas oxidativos, como a Catalase (CAT), a Glutathione Peroxidase (GPX)/redutase e a Superóxido dismutase (SOD).

O estudo da atividade das enzimas antioxidantes pode indicar as respostas celulares das abelhas decorrentes da instalação do processo de estresse oxidativo, o qual decorre da existência de um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres (espécies reativas de oxigênio - ERO) ou em detrimento da velocidade de remoção desses (BARBOSA et al. 2010). Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas, causando potencial dano oxidativo contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; FAROOQUI, 2014). Para minimizar o dano oxidativo aos componentes celulares após exposição à agrotóxicos, o sistema de defesa antioxidante procura manter o processo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos se amplifiquem culminando em danos sistêmicos irreparáveis (BARBOSA et al. 2010).

Algumas das enzimas responsáveis pelas defesas antioxidantes, como a SOD e a GPX agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres (COGO et al. 2009; BARBOSA et al. 2010). Já as CaEs são consideradas biomarcadoras de exposição e estão envolvidas em diversos processos metabólicos, sendo classificadas como enzimas de fase I que reagem com compostos não-polares, por meio de hidrólise. Os metabólitos resultantes são ainda processados por enzimas de fase II ou excretados (STONE; JEPSON; LASKOWSK, 2002). Por sua vez, a GST é uma enzima de fase II, responsável por catalisar a conjugação da glutatona reduzida com alguns xenobiontes a fim de torná-los menos tóxicos e mais fáceis de serem degradados, desempenhando um papel central no processo de detoxificação celular e correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos como drogas, herbicidas, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais (STONE; JEPSON; LASKOWSKI, 2002; COGO et al. 2009; BADIOU-BÉNÉTEAU et al. 2012).

Por sua vez, a FAL é uma enzima digestiva envolvida nos mecanismos de adsorção e transporte por meio da hidrólise de grupos fosfatos (MOSS, 1992), constituindo uma valiosa ferramenta de diagnóstico de determinadas doenças humanas, além de poder ser utilizada como uma enzima biomarcadora de exposição no intestino de abelhas (BOUNIAS et al., 1996; VLAHOVIC et al., 2009; BADIOU-BÉNÉTEAU et al. 2012). Já a AChE é responsável por mediar a transmissão do impulso nervoso, hidrolisando a acetilcolina em sinapses colinérgicas (BADIOU et al., 2007), estando assim diretamente relacionada ao mecanismo de ação dos neonicotinóides como o TMX (BADIOU et al., 2008).

Além disso, um outro caminho para caracterizar os efeitos do TMX em abelhas, é a avaliação da expressão das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein*, HSP), também incluídas entre os biomarcadores bioquímicos para avaliação de contaminação. Gregorc e Bowen (1999) e Silva-Zacarin e Malaspina (2006) sugeriram que a utilização de técnicas para detecção de HSP, associada com a análise de células em processo de morte celular, podem ajudar a diagnosticar infecções e avaliar os efeitos das aplicações de inseticidas em abelhas.

As HSPs são classificadas em quatro famílias, baseadas em sua massa molecular, sendo a família HSP 70 a classe mais frequente e mais bem estudada (LINDQUIST; CRAIG, 1988). Sob várias condições de estresse, a indução da síntese de HSP 70, pode inibir a morte celular e, assim, aumentar a sobrevivência das células expostas a uma variedade de estímulos letais. A super-expressão de HSP 70 suprime o dano mitocondrial e a fragmentação nuclear (BUZZARD et al, 1998) e, portanto, funciona como uma potente proteína anti-apoptótica (GARRIDO et al., 2001). Já a HSP90 tem um papel chave na maturação e estabilidade conformacional de

proteínas denominadas proteínas clientes HSP90, que são fatores de transcrição e quinases envolvidas com a transdução de sinal do processo apoptótico (PARCELLIER et al., 2003). Em conjunto com a análise da expressão das HSPs, a detecção de células em processo de morte celular, verificada pela fragmentação do DNA através da Reação de TUNEL, fornece uma indicação do nível de estresse celular, uma vez que a alta expressão das HSPs decorre da tentativa de proteger as células de uma possível morte celular (BIERKENS, 2000).

Finalmente, para investigar a toxicidade de agrotóxicos em abelhas em um nível molecular, o estudo da interferência de xenobióticos na regulação do splicing alternativo é uma maneira inédita na literatura para tentar entender como os agrotóxicos podem afetar esses organismos. Os padrões de splicing alternativos são encontrados em todos os tipos de genes, mas são particularmente abundantes no sistema nervoso (GRABOWSKI; BLACK, 2001; BLACK; GRABOWSKI, 2003), onde isoformas específicas desempenham papéis nos processos de aprendizagem, memorização de células neuronais, reconhecimento, neurotransmissão, função do canal iônico e especificidade do receptor (GRABOWSKI; BLACK, 2001). O estudo de mecanismos de processamento alternativo de pré-mRNAs em neurônios, por meio da expressão dos genes *elav* e *Dscam*, envolvidos na formação da complexa rede do sistema nervoso (YAO; WHITE, 1994; ZHAN et al., 2004; MATTHEWS et al., 2007), pode indicar se os pesticidas afetam a neuroplasticidade de *A. mellifera*. Além disso, o gene *Xbp1*, por meio de um tipo de splicing não convencional independente do spliceossomo, desencadeia a resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês *unfolded protein response*) em condições de estresse, evitando o acúmulo de proteínas com conformação defeituosa no retículo endoplasmático (LAFLEUR et al., 2013), sendo este um outro tipo de resposta que pode ser medida para avaliar a toxicidade dos pesticidas em abelhas.

Tendo em vista as informações aqui reunidas, fica clara a importância do papel econômico e ecológico de *A. mellifera* africanizada como agente polinizador, e a grande relevância do presente estudo na geração de conhecimento para a melhor compreensão dos efeitos toxicológicos do TMX no cérebro e no intestino das abelhas, e se sua combinação com GLF e CAB pode afetar o sistema nervoso em um nível molecular, alterando o padrão de splicing alternativo. Desta forma, esta pesquisa contribui para o melhor entendimento da ação do neonicotinóide, amplamente utilizado nas culturas agrícolas brasileiras, e sua capacidade de induzir alterações bioquímicas, celulares e moleculares nas abelhas contaminadas com agrotóxicos. Contudo, os dados obtidos com este estudo também fornecem subsídios para o debate que visa melhorar as práticas de cultivo e incentivar a elaboração de planos adequados de manejo para esses polinizadores.

2- OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos de uma concentração subletal de TMX (0,0227 ng de ingrediente ativo/ μ L de alimento) no cérebro e no intestino de abelhas forrageiras *A. mellifera* africanizadas, após 1, 3 e 5 dias de exposição oral. Os objetivos específicos foram:

- Analisar as possíveis alterações na atividade das enzimas CaE, GST, SOD e GPX (no cérebro e no intestino).
- Analisar a atividade da enzima AChE, responsável pela transmissão do impulso nervoso em sinapses colinérgicas, nos cérebros das abelhas.
- Analisar a atividade da enzima digestiva FAL no intestino das abelhas.
- Verificar a ocorrência de peroxidação lipídica por meio do ensaio de TBARS (no cérebro e no intestino).
- Analisar as possíveis alterações na expressão de HSP70 e HSP90 por meio de imunomarcagem (no cérebro e no intestino).
- Verificar a marcação de morte celular pela reação de TUNEL (no cérebro e no intestino).
- Verificar possíveis alterações no padrão de regulação de splicing alternativo para os genes Dscam e elav no cérebro de abelhas expostas por 24h ao TMX e a uma combinação de TMX, GLF e CAB.
- Verificar a ocorrência de splicing no gene Xbp1, mecanismo desencadeador da *Unfolded Protein Response* (UPR), no cérebro de abelhas expostas por 24h ao TMX e a uma combinação de TMX, GLF e CAB.

3. CAPÍTULO 1

O artigo referente a este capítulo será submetido para publicação na **Archives of Toxicology** e, portanto, está editado conforme as normas da revista.

**Avaliação da resposta enzimática na cabeça e no intestino de
Apis mellifera africanizadas expostas a uma dose subletal de tiametoxam**

Pâmela Decio¹, Franco Dani Pereira¹, Thaisa Cristina Roat¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹, Osmar Malaspina¹.

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Campus de Rio Claro.

Resumo

O crescente uso de inseticidas, promovido pela intensificação da agricultura, tem mostrado a sua influência no declínio de colônias de abelhas, que desempenham um papel fundamental na polinização, fazendo com que a busca por informações sobre os efeitos dos inseticidas nesses insetos seja fundamental. As enzimas carboxilesterase (CaE), glutathione S-transferase (GST), acetilcolinesterase (AChE), fosfatase alcalina (FAL), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) podem ser considerados bons biomarcadores, pois o conjunto dessas análises enzimáticas consiste em uma ferramenta promissora para caracterizar a exposição de abelhas aos inseticidas. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os possíveis danos causados por uma dose subletal do tiametoxam - TMX (0,0227 ng/μl de alimento) na cabeça e no intestino de abelhas *A. mellifera* africanizada por meio da análise de biomarcadores enzimáticos de exposição, estresse oxidativo e pela ocorrência de peroxidação lipídica. Os dados mostraram que na cabeça, o inseticida aumentou a atividade de AChE em 1, 3 e 5 dias de exposição, enquanto que a CaE diminuiu no primeiro dia e a GST aumentou no quinto dia. Os resultados obtidos indicam que as enzimas antioxidantes foram menos atuantes na cabeça, com exceção da GPX que apresentou aumento da atividade no primeiro dia de exposição com posterior queda no terceiro dia em relação ao grupo controle. No intestino, não houve resposta da FAL e da GST em nenhum dos 3 períodos avaliados. A atividade da CaE por sua vez, decresceu no primeiro e no quinto dia. Diferentemente da cabeça, as enzimas antioxidantes tiveram aumento de atividade no intestino, onde a SOD aumentou no quinto dia e GPX no terceiro. O teste de TBARS só apresentou diferença no intestino, após 5 dias de exposição. Embora o TMX tenha modulado a atividade de algumas enzimas em determinados períodos, em grande parte das análises ele não foi capaz de induzir respostas enzimáticas na cabeça e no intestino com a dose de inseticida utilizada dentro dos 5 dias de avaliação.

Palavras-chave: abelhas, neonicotinóide, biomarcadores, estresse oxidativo, peroxidação lipídica

1- INTRODUÇÃO

Dentre os principais insetos polinizadores, as abelhas desempenham um papel fundamental na reprodução da maior parte das angiospermas além de serem essenciais para grande parte das culturas agrícolas (Morse and Calderone 2000; Gallai et al. 2009). De acordo com Tautz (2008), as abelhas exercem um papel fundamental na polinização, já que 90% das plantas frutíferas dependem diretamente da polinização realizada por estes insetos para o seu sucesso reprodutivo e das 170 mil espécies de plantas polinizadas por abelhas, 40 mil dependem de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758.

No Brasil, as abelhas *A. mellifera* africanizadas são de grande importância na economia do país, uma vez que muitas culturas como café, citros, soja, girassol e tomate, dependem da polinização promovida por esses insetos para potencializar a produção agrícola (Inácio et al. 2003; Malerbo-souza et al 2003a; Malerbo-souza;2003b; Chiari et al. 2005; Souza et al. 2007). No entanto, devido ao modelo agrícola brasileiro formado por extensas áreas de monocultura, cresceu o mercado de agrotóxicos por produtos que combatam as pragas e melhorarem a qualidade e a quantidade da produção das culturas. No Brasil, só no ano de 2017, foram comercializados 539.944,95 toneladas de produtos fitossanitários (Ibama 2018).

O crescente uso de inseticidas na agricultura moderna tem levantado suspeitas sobre a influência dos agrotóxicos no declínio de colônias de abelhas, relatado em diversos países à partir de 2006 e que gerou grandes prejuízos econômicos (Oldroyd 2007; Kulhanek et al. 2017; Brodschneider et al. 2018). No Brasil, relatos de apicultores sobre perda de colônias se tornaram cada vez mais frequentes, sendo que nos últimos 10 anos, foram registradas perdas de dezenas de milhares de colônias de abelhas africanizadas no Estado de São Paulo. A aplicação de agrotóxicos feita de maneira incorreta nas áreas próximas aos apiários é uma das causas levantadas para a mortalidade em massa desses insetos (Pires et al. 2016).

Os neonicotinóides, como o TMX, representam uma das classes de inseticidas mais amplamente utilizadas em culturas agrícolas fora da União Européia (Bass and Field 2018). Esses compostos apresentam ação neurotóxica e atuam como agonistas da acetilcolina, competindo com ela pelos seus receptores nicotinérgicos que medeiam o impulso nervoso (Ishaaya et al. 2007; Lima and Rocha 2012). Por terem ação sistêmica nas plantas, alcançam os recursos coletados pelas abelhas, o que expõe toda a colônia ao material contaminado (Wolff et al. 2008; Hopwood et al. 2012).

Diante do exposto, a busca por informações a respeito dos efeitos de inseticidas como o TMX sobre as abelhas é de grande importância, visando conduzir a discussão sobre quais são

os fatores ameaçadores à sanidade apícola e, conseqüentemente, melhorar o manejo destes polinizadores em áreas agrícolas.

Uma das maneiras de analisar a toxicidade de compostos como o TMX é a investigação da alteração da atividade de enzimas relacionadas a detoxificação chamadas de biomarcadoras (Badiou-Bénéteau et al. 2012). Estudos ecotoxicológicos demonstraram que os padrões de respostas enzimática em *A. mellifera* podem ser alterados quando as mesmas são expostas a vários tipos de xenobióticos, incluindo inseticidas (Yu et al. 1984; Kostaropoulos et al. 2001; Badiou et al. 2008; Badiou-Bénéteau et al. 2012; Carvalho et al. 2013). De acordo com Hyne e Maher (2003) diversas enzimas apresentam potencial para uso em programas de monitoramento ambiental, podendo ser utilizadas como biomarcadores como a Acetilcolinesterase (AChE), a Carboxilesterase (CaE), a Glutathione S-Transferase (GST), as metalotioneínas e as Cyp450.

As enzimas biomarcadoras de exposição estão incluídas no processo de biotransformação de xenobióticos, processo dividido em fases que tem como objetivo formar derivados mais polares e solúveis em água, resultando na diminuição de sua toxicidade e facilitando a excreção (Azevedo and Chasin 2003). As CaEs que são enzimas de Fase I, por exemplo, reagem com compostos não-polares, por meio de hidrólise. Os metabólitos resultantes são ainda processados por enzimas de Fase II ou excretados (Stone et al. 2002). Por sua vez, a GST pertence a uma família de enzimas de Fase II responsável por catalisar a conjugação da glutathione reduzida com alguns xenobiontes a fim de torná-los menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem degradados e removidos do organismo. A GST desempenha um papel central no processo de detoxificação celular e correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos como drogas, agrotóxicos, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais (Weirich et al. 2002; Stone et al. 2002; Cogo et al. 2009; Badiou-Bénéteau et al. 2012).

Outra enzima que pode ser utilizada como uma biomarcadora em abelhas é a Fosfatase Alcalina (FAL) que consiste em uma enzima digestiva envolvida nos mecanismos de adsorção e transporte por meio da hidrólise de grupos fosfatos (Moss 1992), sendo considerada também como uma valiosa ferramenta de diagnóstico de determinadas doenças humanas (Bounias et al. 1996; Vlahovic et al. 2009; Badiou-Bénéteau et al. 2012)

Há ainda o estudo da atividade da AchE, enzima que está presente principalmente na cabeça de abelhas, responsável por mediar a transmissão do impulso nervoso, hidrolisando a acetilcolina em sinapses colinérgicas (Badiou et al. 2008). Uma vez que o TMX atua sobre os receptores de acetilcolina e nicotina existentes no sistema nervoso, o papel desta enzima pode

ser comprometido sob os efeitos deste inseticida, podendo causar problemas futuros sobre a viabilidade das abelhas (Badiou et al. 2008).

Contudo, o estudo da atividade enzimática no processo de estresse oxidativo também é um outro caminho que pode indicar respostas celulares das abelhas ao dano causado pela exposição do inseticida (Dussaubat et al. 2012; Balieira et al. 2018). A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres (espécies reativas de oxigênio - ERO) ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas, causando potencial dano oxidativo contra células e tecidos (Halliwell and Whiteman 2004; Barbosa et al. 2010; Farooqui 2014).

Algumas das enzimas responsáveis pelas defesas antioxidantes, como a Superóxido Dismutase (SOD) e a Glutathione Peroxidase (GPX) agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres (Cogo et al. 2009; Barbosa et al. 2010). A enzima SOD, excelente marcadora do estresse oxidativo, age por meio da reação de dismutação, catalisando a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do radical superóxido O_2^- . Concomitantemente, enzimas como a Catalase (CAT) e a GPX agem de forma integrada para impedir o acúmulo de H_2O_2 que, apesar de não ser um radical livre, é igualmente reativo e capaz de promover danos potenciais (Cogo et al. 2009; Barbosa et al. 2010).

Por fim, quando o organismo não consegue combater o desequilíbrio causado pelas EROs, os danos podem se estender à membrana celular que estará sujeita à peroxidação lipídica, processo responsável por provocar alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas, comprometendo o metabolismo celular (Gaschler and Stockwell 2017). Uma das consequências da peroxidação lipídica é a formação de produtos citotóxicos como, por exemplo, o malondialdeído (MDA), substância que pode ser utilizada como uma medida indireta do dano celular pelo teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) procedimento amplamente utilizado para esse fim. (Ghani et al. 2017).

Diante do exposto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos de uma concentração subletal de TMX (0,0227 ng de ingrediente ativo/ μ l de alimento) em abelhas campeiras *A. mellifera* africanizadas, por meio da análise da atividade de enzimas biomarcadoras de exposição, CaE, e GST, e enzimas antioxidantes, SOD e a GPX, na cabeça e no intestino desses insetos, além da análise da AChE na cabeça, da FAL no intestino e a determinação de peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS em ambos os órgãos. A

combinação de diferentes biomarcadores constitui uma ferramenta promissora para avaliar a saúde desses polinizadores e contribui para descrever os efeitos toxicológicos dos inseticidas neonicotinóides e outros agrotóxicos nesses insetos.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Obtenção do material biológico

Foram utilizadas abelhas *A. mellifera* africanizadas coletadas no apiário do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, São Paulo. Para a coleta, foram consideradas as colônias saudáveis que apresentavam rainha em plena postura, estoque de alimento e atividade de forrageamento constante (OECD 1998).

Foi utilizado um “pool” de abelhas de três diferentes colônias, considerando-se a variabilidade genética intra e inter-colonial. De cada uma delas foi retirado um quadro de ninho contendo adultos emergindo, os quais foram transferidos para uma gaiola e mantidos em estufa B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*). a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$ na ausência de luz. Após a emergência das operárias na estufa (idade de 0 a 24h), as abelhas foram transferidas para uma bandeja plástica onde foi realizada a marcação dos indivíduos com tinta especial atóxica, o que permitiu, posteriormente, a identificação desses espécimes no momento da coleta.

As abelhas recém-emergidas marcadas foram transferidas para uma gaiola de introdução, evitando assim comportamentos agressivos e/ou rejeição por parte das demais abelhas (Couto e Couto 2002). Para realização dos experimentos e padronização da idade, as abelhas identificadas com a marcação colorida foram coletadas 20 dias após a introdução na colônia, sendo imediatamente utilizadas para a realização dos ensaios de exposição oral.

Para permitir o manuseio das abelhas forrageiras foi feita a anestesia por resfriamento, antes da realização dos ensaios.

2.2- Bioensaios de intoxicação oral

Os experimentos de exposição foram realizados via alimento contaminado com o inseticida levando-se em consideração o fato do TMX ser um inseticida sistêmico, podendo ser ingerido pelas abelhas quando consomem pólen e néctar contaminados.

Após os ensaios para determinação da CL_{50} realizados por nosso grupo de pesquisa (ROAT et al., informação pessoal – Processo FAPESP: 2012/13370-8), foi preparada uma solução mãe de TMX adicionando-se água destilada como solvente (1000 ng de ingrediente ativo TMX/ μL). A partir desta solução foram feitas outras diluições, utilizando-se uma solução

composta de sacarose + água (1:1), até se obter um alimento com concentração subletal 100 vezes inferior a CL_{50} ($CL_{50}/100$: 0,0227 ng TMX/ μ l de alimento).

Os bioensaios foram realizados utilizando-se potes plásticos descartáveis (250 mL), previamente forrados com papel-filtro e furados nas laterais. O grupo controle e o grupo exposto ao TMX receberam 20 abelhas por pote, mantendo-se seis repetições (potes) por grupo.

Em todos os casos, o alimento foi fornecido em microtubos de 2 mL com furos na lateral que permitiam a alimentação *ad libitum*. O grupo experimental recebeu a dieta contaminada com TMX na dose equivalente à $CL_{50}/100$ e para o grupo controle foi fornecido somente a solução de sacarose + água (1:1). Os potes foram mantidos em estufa B.O.D. à temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$.

2.3 Coleta dos indivíduos para os ensaios enzimáticos

A coleta dos indivíduos para a avaliação das atividades enzimáticas foi definida levando-se em consideração o tempo letal médio (TL_{50}) de abelhas africanizadas expostas a dose $CL_{50}/100$ do TMX, (ROAT et al., informação pessoal - experimentos já realizados em nosso laboratório – Processo FAPESP: 2012/13370-8). A TL_{50} representa o período de tempo em que 50% das abelhas estão mortas, quando alimentadas com dieta contaminada pela dose subletal de TMX. Sendo assim, foram utilizados os seguintes tempos para coleta: TL_{50} (120h ou 5 dias), $TL_{50}/50$ (60h ou aproximadamente 3 dias) e logo após um dia da contaminação (24h) a fim de detectar possíveis alterações bioquímicas decorrentes de uma curta exposição. Nos mesmos períodos foram coletadas abelhas do grupo controle.

2.4- Obtenção dos extratos da cabeça e do intestino

Para cada grupo experimental, o controle e o grupo exposto ao TMX, 9 abelhas tiveram suas cabeças extirpadas e agrupadas em 3 microtubos (3 cabeças por amostra), sendo os seus intestinos coletados e separados da mesma maneira, em cada um dos 3 períodos definidos para coleta.

O procedimento para a extração das proteínas foi feito de acordo com o descrito por Dussaubat et al. (2012), com a diferença de não terem sido usados inibidores de proteases. Cada amostra foi adicionada uma quantidade específica de solução de extração enzimática (tampão fosfato de sódio 40 mM, pH = 7,4, cloreto de sódio 10 mM e 1% de Triton X100) contendo 10% (m/v) para a realização da maceração. Os órgãos foram macerados com a ajuda de um homogeneizador de amostras elétrico (Omni) durante 1min. Os extratos brutos foram

centrifugados a 15.000 g, durante 20min, a 4°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes contendo os extratos proteicos foram coletados para as análises.

2.5- Plaqueamento para os ensaios enzimáticos

Para cada experimento foram preparadas duas microplacas de 96 poços adicionando-se em cada poço 5 µL de extrato proteico de cada amostra, em triplicatas, para os ensaios de AChE, CaE e GST; 10 µL de extrato para FAL e SOD, 25 µL de extrato para GPX e 50 µL de extrato para TBARS. Após o preparo das placas com as amostras, foi adicionado em cada poço o volume do meio de reação da dosagem da enzima a ser avaliada suficiente para completar 200 µL e a leitura das densidades ópticas ajustada para a faixa de comprimento de onda adequada de cada ensaio. A de solução de tampão de extração foi utilizada como branco.

Todas as análises foram realizadas em leitora de placas Tecan Infinite M200 Pro a 25°C (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos métodos utilizados para a determinação das atividades enzimáticas realizada na leitora de placas.

Ensaio	CaE, FAL, AChE, GST	SOD	GPX	TBARS
Método utilizado	Absorbância	Absorbância	Fluorescência	Absorbância
Tipo de Leitura	Cinética enzimática (por 5min)	<i>Endpoint*</i>	<i>Endpoint*</i>	<i>Endpoint*</i>
Unidade apresentada nos resultados	(mUA x min ⁻¹)** / mg de tecido	mUA / mg de tecido	mUA / mg de tecido	mUA / mg de tecido

* A leitura é realizada uma vez só, dado um único intervalo de tempo.

** mUA: mili Unidade de Absorbância.

2.6- Ensaio das atividades enzimáticas

2.6.1- Carboxilesterase (CaE) - avaliada na cabeça e no intestino

A atividade da CaE foi adaptada de Badiou-Bénéteau et al. (2012). A determinação foi feita em um meio reacional contendo acetato de p-nitrofenila 0,1 mM, 1,5- bis(4-allyldimethylammonium-phenyl)pentan-3-one-dibromide (BW284C51) 0,01 mM e tampão fosfato de sódio 100 mM (pH = 7,0). As leituras das densidades ópticas foram realizadas na faixa de comprimento de onda de 412 nm.

2.6.2- Acetilcolinesterase (AChE) - avaliada somente na cabeça

A determinação da atividade da AChE foi feita em uma solução de dosagem composta 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), com leituras realizadas a 412 nm. O protocolo foi realizado de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961) com modificações feitas por Belzunces et al. (1988).

2.6.3- Fosfatase Alcalina (FAL) - avaliada somente no intestino

A análise da FAL foi realizada utilizando o método proposto por Bessey et al. (1946) e Bounias et al. (1996). A reação foi analisada a 410 nm, contendo 20 μ M de $MgCl_2$, 2 mM de p-NPP (*nitrophenyl phosphate*) como substrato e 100 mM Tris-HCl, pH 8,5.

2.6.4- Glutathione S-Transferase (GST) - avaliada na cabeça e no intestino

A atividade da GST foi avaliada segundo o trabalho de Badiou-Bénéteau e colaboradores (2012). A leitura foi feita a 340 nm num meio contendo 1 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 2,5 mM de GSH (glutathione reduzida), 1 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno como o substrato e 100 mM de fosfato de sódio a pH 7,4.

2.6.5- Superóxido dismutase (SOD) - avaliada na cabeça e no intestino

Para o meio da reação da SOD foi utilizado o método proposto por Dussaubat et al. (2012) em meio com carbonato de sódio 50 mM diluído em fosfato de sódio 50 mM (pH 7.8), EDTA 0,1 mM, Xantina 0,1 mM, nitroazul de tetrazólio (NBT) 0,025 mM e Xantina oxidase 0,008 U/mL. A leitura no espectrofotômetro foi realizada em 560 nm, 10min após o início da reação.

2.6.6- Glutathione peroxidase (GPX) - avaliada na cabeça e no intestino

Para a determinação da GPX, os extratos protéicos foram submetidos ao kit enzimático: Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen, cat. A22188), conforme as orientações do fabricante. A leitura foi feita pelo método de fluorescência a 560nm, após 30min de incubação da reação.

2.7- Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) - avaliada na cabeça e no intestino

Os procedimentos para a determinação de TBARS seguiram o protocolo do TBARS Assay Kit (Cayman Chemical, cat. 10009050), respeitando-se as orientações do fabricante. O reagente quantifica colorimetricamente a peroxidação lipídica e a formação de grupos como o malondialdeído (MDA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

2.8- Forma de análise dos resultados

Todos os resultados obtidos a partir da leitora de placas, foram analisados pelo software SigmaPlot® 14.0. A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. As comparações foram feitas sempre entre o grupo controle e o grupo exposto à dose subletal de TMX, com a variável do tempo de exposição:

- controle 1 dia (C1) versus TMX 1 dia (T1);
- controle 3 dias (C3) versus TMX 3 dias (T3);
- controle 5 dias (C5) versus TMX 5 dias (T5).

Os valores que passaram no teste de normalidade foram submetidos ao Teste-T, enquanto que valores que não passaram no teste de normalidade foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Os experimentos de atividade enzimática foram feitos em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin-Morales e sua equipe no Laboratório de Mutagênese Ambiental (LMA) do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro. Todo o procedimento experimental foi repetido 3 vezes, para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

3- RESULTADOS

Os resultados aqui obtidos mostraram que somente as enzimas CaE e GPX tiveram a atividade significativamente no grupo exposto ao TMX, tanto na cabeça quanto no intestino (Figs 1A, 2A, 1E, 2E e Tab 2).

No caso da CaE, houve diminuição da atividade no primeiro dia de exposição ao TMX tanto na cabeça quanto no intestino, além de diminuir novamente no intestino no quinto dia de experimento (Figs 1A e 2A). A GST, foi menos afetada pelo inseticida, tendo um considerável aumento de sua atividade na cabeça no dia 5 (Figs 1C e 2C).

Em relação as enzimas marcadoras de estresse oxidativo, a dose subletal de TMX somente provocou aumento da atividade da SOD após 5 dias de exposição no intestino (Fig 2D). Nos demais períodos avaliados e na cabeça não foram observadas diferenças significativas para esta enzima (Figs 1D e 2D). No entanto, na cabeça a GPX aumentou no dia 1, mas houve uma queda de atividade no terceiro dia de exposição (Fig 1E). No intestino, a atividade da GPX aumentou no grupo exposto por 3 dias (Fig 2E). Por sua vez, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) não apresentaram alteração na cabeça em nenhum dos 3 tempos avaliados (Fig 1F), porém houve aumento no intestino após 5 dias de exposição ao neonicotinóide (Fig. 2F).

Finalmente, a atividade da AChE, diretamente envolvida com o mecanismo de ação do TMX e exclusivamente analisada na cabeça, teve sua atividade aumentada nos 1º, 3º e 5º dias de contaminação (Fig. 1B). Contrariamente, a FAL, avaliada no intestino, não apresentou diferença significativa de atividade em nenhum dos períodos avaliados (2B). Na tabela 2 está apresentado um resumo dos resultados das atividades enzimáticas e da determinação de TBARS na cabeça e no intestino das abelhas.

Figura 1. Box plots representando a atividade tecidual das enzimas de exposição e antioxidantes e determinação dos níveis de TBARS presentes na cabeça de *A. mellifera* africanizadas dos grupos avaliados.

(A) CaE, (B) AChE, (C) GST, (D) SOD, (E) GPX e (F) determinação de TBARS. C1: grupo controle 1 dia; T1: grupo exposto ao TMX 1 dia; C3: grupo controle 3 dias; T3: grupo exposto ao TMX 3 dias; C5: grupo controle 5 dias; T5: grupo exposto ao TMX 5 dias. A presença de um asterisco (*) indica onde houve diferença significativa ($p < 0,05$) da atividade enzimática entre o grupo controle e o grupo exposto ao TMX analisados em 1, 3 e 5 dias.

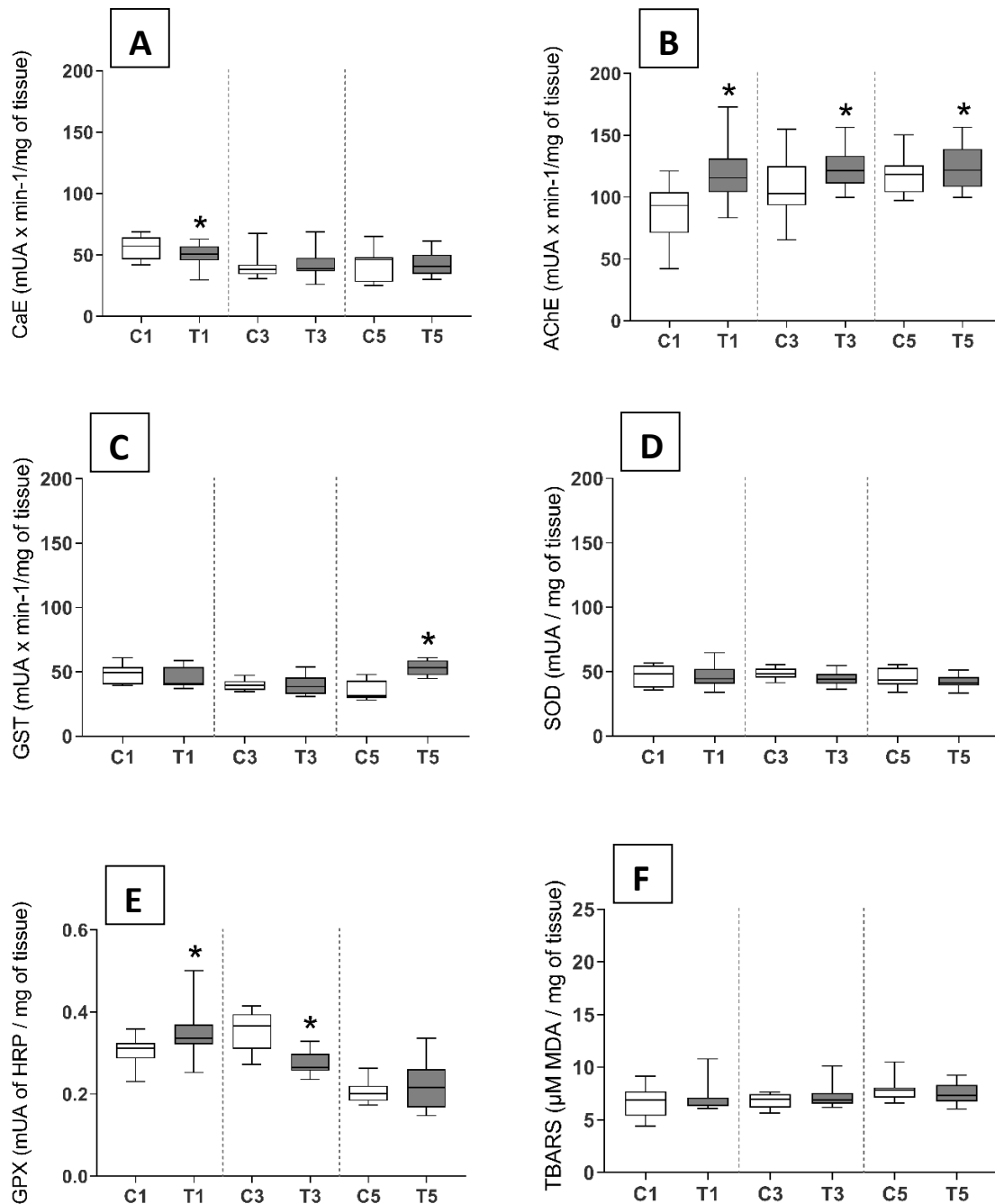


Figura 2. Box plots representando a atividade tecidual das enzimas de exposição e antioxidantes e determinação dos níveis de TBARS presentes no intestino de *A. mellifera* africanizadas dos grupos avaliados.

(A) CaE, (B) FAL, (C) GST, (D) SOD, (E) GPX e (F) determinação de TBARS. C1: grupo controle 1 dia; T1: grupo exposto ao TMX 1 dia; C3: grupo controle 3 dias; T3: grupo exposto ao TMX 3 dias; C5: grupo controle 5 dias; T5: grupo exposto ao TMX 5 dias. A presença de um asterisco (*) indica onde houve diferença significativa ($p < 0,05$) da atividade enzimática entre o grupo controle e o grupo exposto ao TMX analisados em 1, 3 e 5 dias.

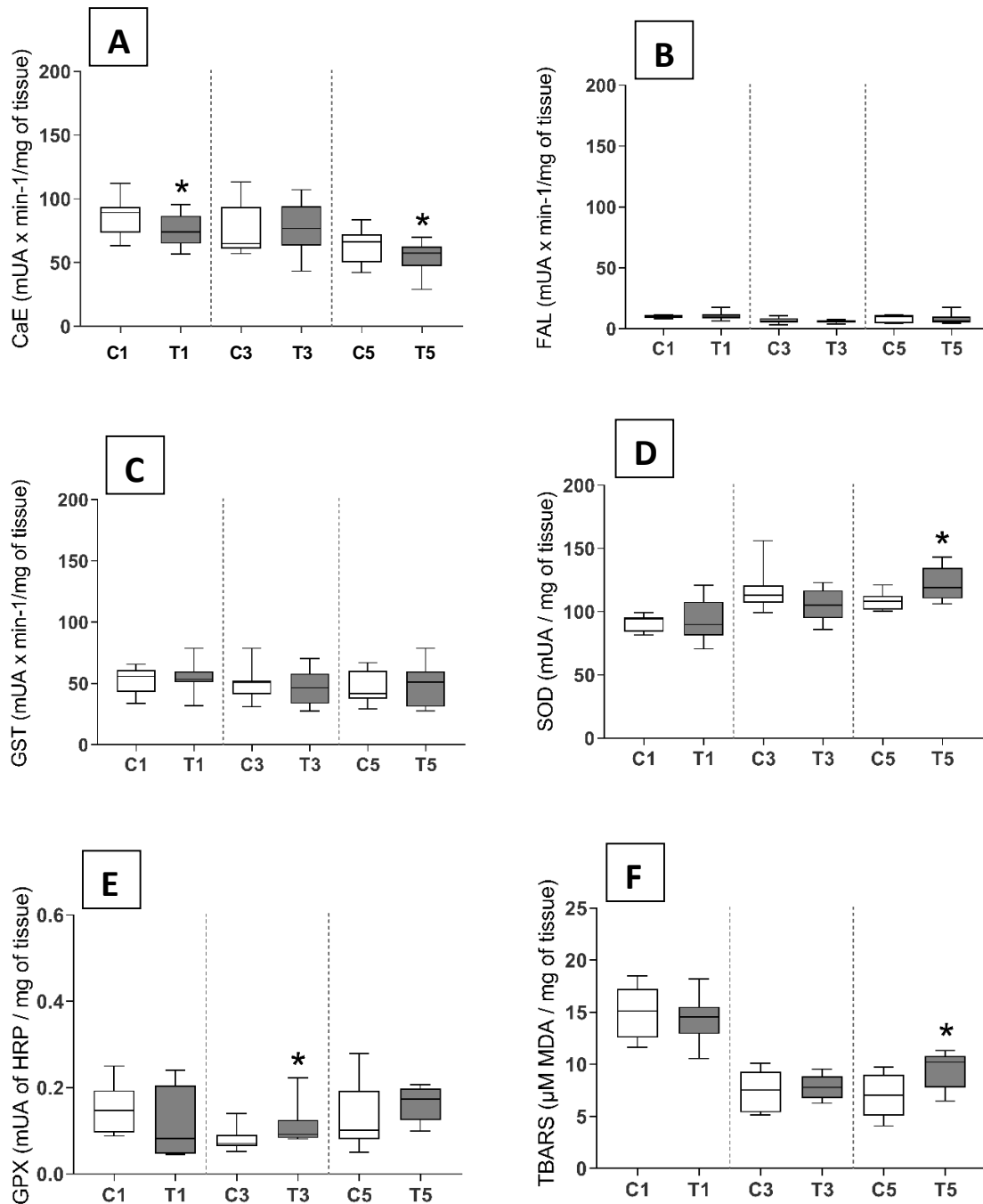


Tabela 2. Resultados da atividade das enzimas CaE, GST, FAL, AChE, SOD, GPX e do teste de TBARS na cabeça e no intestino de *A. mellifera* exposta a dose subletal de TMX.

Setas verdes indicam aumento da atividade enzimática no grupo exposto em relação ao grupo controle; setas vermelhas indicam diminuição da atividade enzimática no grupo exposto em relação ao grupo controle; travessão (–) indica que não houve diferença estatisticamente significativa na atividade; Ø indica que a enzima não foi avaliada no órgão.

	ENZIMA	PERÍODO	ÓRGÃOS AVALIADOS		
			Cabeça	Intestino	
BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO	CaE	1 dia	↓	↓	
		3 dias	–	–	
		5 dias	–	↓	
	AChE	1 dia	↑	Ø	
		3 dias	↑	Ø	
		5 dias	↑	Ø	
	FAL	1 dia	Ø	–	
		3 dias	Ø	–	
		5 dias	Ø	–	
	GST	1 dia	–	–	
		3 dias	–	–	
		5 dias	↑	–	
	ANTIOXIDANTES	SOD	1 dia	–	–
			3 dias	–	–
			5 dias	–	↑
GPX		1 dia	↑	–	
		3 dias	↓	↑	
		5 dias	–	–	
MARCADOR DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	TBARS	1 dia	–	–	
		3 dias	–	–	
		5 dias	–	↑	

4- DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que o inseticida foi capaz de induzir inibição e aumento da atividade de parte das enzimas analisadas, dependendo do tempo de exposição e do órgão avaliado. Porém, também foi possível verificar que o TMX não causou nenhum efeito em algumas das análises realizadas.

Os dados aqui reunidos mostraram que após 1 dia de exposição ao TMX, houve diminuição da atividade da CaE tanto na cabeça como no intestino de *A. mellifera* africanizada, voltando a cair somente no quinto dia no intestino. Esses resultados são semelhantes aos encontrados na literatura que demonstram um padrão de inibição de CaEs em abelhas frente a exposição de diferentes inseticidas. Barbosa (2015) também observou a diminuição da atividade desta enzima em intestinos de operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada 5 dias após a exposição ao Dimetoato. Yu e colaboradores (1984) verificaram queda na atividade da CaE em abelhas contaminadas por *malathion*, assim como os resultados de Li et al. (2017) apontaram o mesmo para *A. mellifera* expostas por 48h ao imidacloprido, inseticida com o mesmo modo de ação que o TMX. No processo de desintoxicação, as CaEs são enzimas de fase I que reagem com compostos não polares por hidrólise e os metabolitos resultantes são transformados por enzimas de fase II ou diretamente excretados (Eaton and Bammler 1999). Os resultados do presente estudo indicam que o efeito inicial da contaminação por dose subletal de tiametoxam inibe os mecanismos de detoxificação representado por enzimas de fase I tanto na cabeça quanto no intestino. Porém, com a passagem do tempo, no terceiro dia a atividade da enzima é normalizada, demonstrando uma recuperação, só voltando a cair no quinto dia no intestino, provavelmente pela contaminação oral prolongada indicando uma possível depleção enzimática da CaE que é incapaz de proteger a célula à partir desse momento.

No entanto, a GST, que é uma enzima de fase II, apresentou aumento de atividade significativo na cabeça de abelhas expostas ao TMX, mas somente no quinto dia de experimento. Da mesma maneira, a GST teve a atividade aumentada em intestinos de abelhas *A. mellifera* expostas a dose subletal de TMX por Badiou-Bénéteau e colaboradores (2012), em abelhas expostas a ação do inseticida spinosad (Carvalho et al. 2013), à permetrina (Yu et al 1984) e ao imidacloprido (Li et al. 2016). A GST é responsável por catalisar a conjugação de compostos eletrofílicos com a glutatona reduzida (GSH), desempenhando um importante papel na desintoxicação e contribuindo para a proteção celular contra danos oxidativos (Barata et al. 2005). Embora a concentração de TMX utilizada neste estudo tenha sido relativamente baixa, não provocando resposta da GST contra a intoxicação no intestino, a exposição contínua por 5 dias do cérebro ao inseticida neurotóxico foi suficiente para provocar aumento da atividade da

enzima, o que sugere uma tentativa de proteção do sistema nervoso ou de degradação da molécula do inseticida com o prolongamento da contaminação, mostrando assim um possível efeito cumulativo da dose subletal do TMX, conforme discutem Sanchez-Bayo and Goka (2014) sobre os riscos de exposição crônica aos neonicotinóides.

A análise de FAL confirmou que o TMX utilizado na concentração subletal $CL_{50}/100$ não foi tóxico para o intestino. Os dados aqui apresentados indicam que não houve comprometimento do processo digestivo, visto que essa enzima apresenta papel fundamental na manutenção da homeostase do intestino médio de abelhas, e é representante de uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise em processos digestivos, pela sinalização celular, e pelo transporte de metabólitos (Moss 1992; Lalles 2010). Os resultados do presente trabalho diferem dos resultados apresentados na literatura por Bounias et al. (1996) e Badiou-Bénéteau et al. (2012) que indicam, respectivamente, um aumento na atividade da FAL em *A. mellifera* após exposição ao cobre e a doses mais altas de TMX. Carvalho e colaboradores (2013) também demonstraram que em abelhas tratadas com fipronil ocorreu um decréscimo significativo na atividade de FAL, enquanto que uma baixa dose de spinosad foi capaz de induzir ao aumento da atividade dessa enzima. Esses dados demonstram que diferentes inseticidas e substâncias como metais são capazes de modular a atividade da FAL, indicando a utilização dessa enzima como uma boa biomarcadora de exposição, sendo o seu uso pertinente para avaliação dos danos causados por agrotóxicos em abelhas. No entanto, não foram observadas alterações significativas nas condições de dose e tempos avaliados, evidenciando que a atividade desta enzima não foi afetada como outros biomarcadores utilizados no presente estudo.

Por outro lado, a atividade de AChE apresentou um aumento significativo nos grupos expostos em relação ao controle em todos os intervalos analisados. No entanto, Li (et al, 2017) observou inibição da atividade da AChE na cabeça de abelhas *A. mellifera* expostas a dose letal média de imidacloprido e clotianidina, neonicotinóides como o TMX. Diferentemente, Badiou-Bénéteau e colaboradores (2012) não constataram alteração da atividade da AChE em abelhas expostas cronicamente ao TMX, assim como Gauthier (et al. 2018) constatou para o TMX e o imidacloprido. A AChE é uma enzima diretamente relacionada ao modo de ação dos neonicotinóides, pois é responsável pela hidrólise rápida da acetilcolina nas sinapses colinérgica, que permite um controle preciso da modulação da transmissão neuronal (Badiou et al 2008). Os resultados do presente estudo indicam que, com os receptores nicotínicos ocupados por moléculas do TMX, o qual mimetiza a molécula de acetilcolina, a AChE não consegue agir por não reconhecer o inseticida. Consequentemente, há um aumento da atividade enzimática na tentativa de degradar a ligação com o receptor e assim restabelecer o repouso do

neurônio. O sistema nervoso é então afetado, pois ao atingir seu órgão-alvo, o neonicotinóide provoca a ativação prolongada dos receptores pós-sinápticos de modo anormal (Ishaaya et al 2004). Conclui-se também que a atividade da AChE é modulada de maneiras diferentes conforme as concentrações e os inseticidas utilizados.

Em relação as enzimas antioxidantes, os resultados demonstraram que a dose subletal de TMX induziu o aumento da atividade da GPX na cabeça, após 1 dia de exposição, seguida de uma redução significativa no terceiro dia, sugerindo que nas primeiras 24h a agressão do inseticida é maior no tecido cerebral, fazendo com que o sistema antioxidante aumente a resposta via GPX. A redução observada no terceiro dia é decorrente do início do esgotamento da atividade enzimática contra a ação do inseticida. Como no quinto dia não há mais diferença significativa da atividade da GPX entre o grupo controle e o grupo exposto, infere-se que o equilíbrio da defesa antioxidante foi restaurado. A atividade da SOD e o teste de TBARS não apresentaram diferença significativa em nenhum dos 3 períodos avaliados, evidenciando que o tecido nervoso foi menos afetado pelo estresse oxidativo.

As enzimas antioxidantes consistem no primeiro mecanismo de defesa celular contra espécies reativas de oxigênio (ERO). A SOD, especializada na remoção do radical O_2^- , catalisa a desmutação do superóxido, convertendo-o em H_2O_2 , que é menos reativo e pode ser degradado pelas enzimas CAT e GPX. A CAT vai degradar o peróxido de hidrogênio em H_2O e O_2 . A outra via antioxidante para quebrar o H_2O_2 é formada pela glutathiona (GSH) que opera alternando sua forma oxidada e sua forma reduzida, por meio da ação da glutathiona peroxidase (GPX) e da glutathiona redutase (GR) na presença de selênio (Halliwell and Gutteridge 2007).

Diferentemente do cabeça, no intestino, foi possível observar aumento da atividade tanto da SOD (quinto dia), quanto da GPX (terceiro dia), além do ensaio de TBARS evidenciar um aumento significativo da presença de MDA, produto citotóxico liberado quando há peroxidação lipídica, no grupo exposto no quinto dia. É importante ressaltar que um dos principais causadores da peroxidação lipídica é o radical hidroxila (OH^\cdot), geralmente formado em reações que resultam da combinação de oxidantes como o peróxido de hidrogênio, com irradiação ultravioleta ou visível e catalisadores, como íons metálicos ou semicondutores (Nogueira et al. 2007). O processo de oxidação que utiliza a ativação de H_2O_2 por sais de ferro é conhecida como Reação de Fenton, a qual ocorre quando o íon ferro²⁺ capta elétron do peróxido de hidrogênio se tornando o íon ferro³⁺ e libera o radical instável OH^\cdot (Neyens and Baeyens 2003). À partir disso, podemos inferir que o aumento da SOD no intestino no quinto dia de avaliação, ao catalisar a dismutação do superóxido, promove o aumento de H_2O_2 , o qual pode estar

gerando o radical hidroxila, na presença de sais de ferro, atacando as membranas biológicas, processo observado na determinação de TBARS.

É possível inferir que, embora o intestino não seja o órgão alvo do inseticida neonicotinóide, a ativação do sistema de defesa antioxidante foi maior nesse órgão do que na cabeça, sugerindo que a contaminação oral deixou o intestino mais vulnerável aos efeitos do estresse oxidativo. Uma vez, que as enzimas antioxidantes não conseguem reverter os prejuízos causados pelo TMX, no quinto dia de exposição nota-se que os danos alcançaram a membrana celular, como pode ser visto pelo teste de TBARS. Embora todos os componentes celulares sejam sensíveis à atuação das EROs, a peroxidação lipídica quando ocorre na membrana celular acarreta em alterações na estrutura e na seletividade que podem levar a morte da célula (Ferreira and Matsubara 1997; Gaschler and Stockwell 2017).

Nossos resultados corroboram os dados encontrados por Gauthier e colaboradores (2018) que evidenciam um efeito pró-oxidante do TMX e do imidacloprido em abelhas *A. mellifera*. Porém, assim como no trabalho de Yu e colaboradores (1984) a exposição a dose subletal de TMX não teve efeito sobre algumas enzimas analisadas (SOD e TBARS na cabeça, FAL e GST no intestino), mostrando que a dose subletal (0,0227 ng TMX/ μ l de alimento) não foi suficiente para induzir determinadas respostas enzimáticas nesses órgãos dentro do período de 5 dias de avaliação. Ainda assim, enzimas como CaE, GST, AChE, FAL, SOD, GPX e o ensaio de TBARS apresentam potencial para serem utilizadas como biomarcadores em abelhas, sendo o conjunto dessas análises enzimáticas uma ferramenta promissora para avaliar a saúde apícola e caracterizar a exposição a inseticidas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2012/13370-8; 2013/21832-4; 2014/23197-7) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Azevedo FA, Chasin AAM (2003) As bases toxicológicas da ecotoxicologia. Rima, São Carlos
- Badiou-Bénéteau A, Carvalho SM, Brunet JL, et al (2012) Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicol Environ Saf* 82:22–31. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.05.005
- Badiou A, Meled M, Belzunces LP (2008) Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase-A

- biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 69:246–253. doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.11.020
- Balieira KVB, Mazzo M, Bizerra PFV, et al (2018) Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. *Apidologie* 49:562–572. doi: 10.1007/s13592-018-0583-1
- Barata C, Lekumberri I, Vila-Escalé M, et al (2005) Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquat Toxicol* 74:3–19. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.04.002
- Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas R de CG, et al (2010) Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. *Reproduction* 23:629–643. doi: 10.1159/000320546
- Barbosa RA (2015) Avaliação dos efeitos de concentrações subletais de dimetoato no cérebro e ventrículo de *Apis mellifera* africanizada. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro
- Bass C, Field LM (2018) Neonicotinoids. *Curr Biol* 28:R772–R773. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.061
- Belzunces LP, Toutant JP, Bounias M (1988) Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by TritonX 114 phase separation. *Biochem.J.* 255:463–470
- Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ (1946) A method for the rapid determination of alkaline phosphatases with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164: 321-329
- Bounias M, Dujin N, Popesković DS (1985) Sublethal effects of a synthetic pyrethroid, deltamethrin, on the glycemia, the lipemia, and the gut alkaline phosphatases of honeybees. *Pestic Biochem Physiol* 24:149–160. doi: 10.1016/0048-3575(85)90124-5
- Bounias M, Kruk I, Nectoux M, Popeskovic D. (1996) Toxicology of crupic salts on honeybees. V. Gluconate and sulfate action on gut alkaline and acid phosphatase. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35:67-76
- Brodshneider R, Gray A, Adjlane N, et al (2018) Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. *J Apic Res* 57:452–457. doi: 10.1080/00218839.2018.1460911
- Carvalho SM, Belzunces LP, Carvalho GA, et al (2013) Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ Toxicol Chem* 32:2117–2124. doi: 10.1002/etc.2288

- Chiari WC, Toledo VAA, Ruvolo-Takasusuki MCC, Oliveira AJB, Sakaguti ES, Attencia VM, Costa FM, Mitsui MH (2005) Pollination of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) by Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48:31-36
- Cogo AJD, Siqueira AF, Ramos AC, Cruz ZMA, Silva AG (2009) Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza on line.* 7:37-42
- Couto RHN, Couto LA. (2002) *Apicultura: Manejo e produtos.* Funep, Jaboticabal
- Dussaubat C, Brunet JL, Higes M, et al (2012) Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One* 7:. doi: 10.1371/journal.pone.0037017
- Eaton DL, Bammler TK (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.* 49:156-164
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM (1961) .A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem.Pharmacol.* 7:88–95
- Fairbrother A, Purdy J, Anderson T, Fell R (2014) Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environ Toxicol Chem* 33:719–731. doi: 10.1002/etc.2527
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) Aspects determining the risk of pesticides to wild bees: risk profiles for focal crops on three continents
- Farooqui T (2014) Oxidative stress and age-related olfactory memory impairment in the honeybee *Apis mellifera*. *Front Genet* 5:1–4. doi: 10.3389/fgene.2014.00060
- Ferreira ALA, Matsubara LS (1997) Radicais Livres: Conceitos E Mecanismo De Lesão. *Rev Ass Med Bras* 43:61–69
- Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissière BE (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ* 68:810–821. doi: 10.1016/j.ecolecon.2008.06.014
- Gaschler MM, Stockwell BR (2017) Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 482:419–425. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086
- Gauthier M, Aras P, Paquin J, Boily M (2018) Chronic exposure to imidacloprid or thiamethoxam neonicotinoid causes oxidative damages and alters carotenoid-retinoid levels in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Sci Rep* 8:1–11. doi: 10.1038/s41598-018-34625-y
- Ghani MA, Barril C, Bedgood DR, Prenzler PD (2017) Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem* 230:195–207. doi:

- 10.1016/j.foodchem.2017.02.127
- Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142:231–255. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford
- Hopwood J, Vaughan M, Shepherd M, et al (2012) Are Neonicotinoids Killing Bees? *Xerces Soc Invertebr Conserv* 1–44
- Hyne RV, Maher WA (2003) Invertebrate biomarkers: links to toxicosis is that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54:366–374
- Ibama (2018) <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>. Accessed 01 March 2018.
- Inácio FR, Marchini LC, Ambrosano GMB, Moreti ACCC (2003) Influência de diferentes espaçamentos de plantio na visitação de *Apis mellifera* L. e na produtividade da cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.). *Magistra*, 15:93-96
- Ishaaya I, Barazani A, Kontsedalov S, Horowitz AR (2007) Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance. *Entomol Res* 37:148–152. doi: 10.1111/j.1748-5967.2007.00104.x
- Kostaropoulos I, Papadopoulos AI, Metaxakis A, et al (2001) Glutathione S – transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem Mol Biol* 31:313–319. doi: 10.1016/S0965-1748(00)00123-5
- Kulhanek K, Steinhauer N, Rennich K, et al (2017) A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. *J Apic Res* 56:328–340. doi: 10.1080/00218839.2017.1344496
- Lalles JP (2010) Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr. Rev.* 68:323-332
- Li Z, Li M, He J, et al (2017) Differential physiological effects of neonicotinoid insecticides on honey bees: A comparison between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Pestic Biochem Physiol* 140:1–8. doi: 10.1016/j.pestbp.2017.06.010
- Lima MC, Rocha SA (2012) Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: Proposta metodológica de acompanhamento. Brasília, Ibama
- Malerbo-souza DT, Nogueira-Couto RH, Couto LA (2003a) Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio), *Braz j. vet. res. anim. sci.* 40:237-242

- Malerbo-souza DT, Nogueira-Couto RH, Couto LA, Souza JC (2003b) Atrativo para as abelhas *Apis mellifera* e polinização em café (*Coffea arabica* L.). Braz. j. vet. res. anim. sci. 40:272-278
- Morse RA, Calderone NW (2000) The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. Bee Cult 128:1–15
- Moss DW (1992) Perspectives in alkaline phosphatase research. Clin. Chem. 38:2486–2492
- Neyens E, Baeyens J (2003) A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. J Hazard Mater 98:33–50. doi: 10.1016/S0304-3894(02)00282-0
- Nogueira RFP, Trovó AG, Renata M, et al (2007) Fundamentos E Aplicações Ambientais Dos Processos Fenton E Foto-Fenton. Quim Nova 30:400–408. doi: 10.1590/S0100-40422007000200030
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. (1998) Guidelines for the testing of chemicals. Honeybee Acute Oral Toxicity Test. 213
- Oldroyd BP (2007) What's killing American honey bees? PLoS Biol 5:1195–1199. doi: 10.1371/journal.pbio.0050168
- Pires CSS, Pereira F de M, Lopes MT do R, et al (2016) Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? Pesqui Agropecuária Bras 51:422–442. doi: 10.1590/s0100-204x2016000500003
- Roubik DW (2014) Pollinator safety in agriculture
- Sanchez-Bayo F, Goka K (2014) Pesticide residues and bees - A risk assessment. PLoS One 9:. doi: 10.1371/journal.pone.0094482
- Souza DL, Evangelista-Rodrigues A, Pinto MSC (2007) As abelhas como agentes polinizadores. Rev Electrónica Vet VIII:1–7
- Stone D, Jepson P, Laskowski R (2002) Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in. Comp Biochem Physiol C-Toxicology Pharmacol 132:105–112. doi: 10.1016/S1532-0456(02)00052-2
- Vlahovic M, Lazarevic J, Peric-Mataruga V, Ilijin L, Mrdakovic M (2009) Plastic responses of larval mass and alkaline phosphatase to cadmium in the gypsy moth larvae. Ecotoxicol. Environ. Saf., 72:1148-1155
- Weirich GF, Collins AM, Williams VP (2002) Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. Apidologie. 33:3-14
- Wolff LF, dos Reis VDA, Santos RSS (2008) Abelhas melíferas: bioindicadores de qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica. 38
- Yu SJ, Robinson FA, Nation JL (1984) Detoxication capacity in the honeybee, *Apis mellifera*

L. Pestic Biochem Physiol. Pestic Biochem Physiol 22:360–368

Zagatto PA, Bertoletti E (2006) Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações. RiMa, São Carlos.

4. CAPÍTULO 2

O artigo referente a este capítulo será submetido para publicação na **Chemosphere** e, portanto, está editado conforme as normas da revista.

Função protetora das HSP70 e HSP90 em abelhas africanizadas expostas ao tiametoxam

Pâmela Decio¹, Tatiane Grella¹, Thaisa C. Roat¹, Osmar Malaspina¹

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Campus Rio Claro

Resumo

Apis mellifera africanizada são consideradas importantes polinizadores no Brasil. No entanto, o crescimento das áreas agrícolas aumentou o uso de inseticidas para o controle de pragas, que também pode afetar insetos não-alvo, como as abelhas, entre outros polinizadores. Entre as classes de inseticidas mais usadas nas culturas agrícolas estão os neonicotinóides, como o tiametoxam (TMX). Pesquisas sobre o impacto desses inseticidas nos polinizadores são cruciais para a condução de discussões sobre a regulamentação do uso desses agrotóxicos. Desta maneira, o presente estudo hipotetizou que a exposição a uma dose subletal do TMX (0,0227 ng de ingrediente ativo/ μ l de alimento) seria capaz de causar morte celular nos corpos pedunculados, importante estrutura responsável pela plasticidade cerebral, e no intestino das abelhas expostas por 1, 3 e 5 dias ao inseticida, ou que as proteínas de choque térmico (HSP70 e HSP90) evitariam danos severos nesses órgãos devido a sua capacidade de proteção, evitando a má conformação proteica. Os resultados mostraram aumento da imunomarcagem de HSP70 e HSP90 nos corpos pedunculados e no intestino em praticamente todos os tempos analisados, mas não foi visualizada marcação para morte celular por quebra de DNA decorrente da exposição das abelhas ao inseticida. Assim, os resultados do presente estudo sustentam a hipótese inicial, uma vez que a alta expressão das HSPs teve efeito protetivo nos corpos pedunculados e do intestino das abelhas, evitando a morte celular, podendo ser consideradas boas biomarcadoras para avaliar os efeitos biológicos de diversos agentes tóxicos em abelhas.

Palavras chave: *Apis mellifera*, neonicotinóides, morte celular, dose subletal, corpo pedunculado, intestino.

1- INTRODUÇÃO

As abelhas possuem um papel ecológico e econômico imprescindível devido ao serviço de polinização de diversas espécies vegetais na natureza e em culturas agrícolas (Klein et al., 2006). Somente no Brasil, quase um terço das lavouras apresentam dependência de polinizadores, contribuindo economicamente com 30% (US \$ 12 bilhões) do total da renda anual das culturas agrícolas dependentes (Giannini et al., 2015). Apesar da notável importância dos polinizadores, a intensificação da produção agrícola provocou o crescimento do mercado de agrotóxicos, os quais, muitas vezes, atingem também insetos não-alvo, como as abelhas por exemplo (Blacquièrre et al., 2012; Gill and Garg, 2014).

Entre os agrotóxicos mais utilizados está inserida a classe dos inseticidas neonicotinóides, dentro da qual, se encontra o tiametoxam (TMX), utilizado principalmente como sistêmico de plantas, sendo rapidamente absorvido e difundido ao longo de todos os tecidos vegetais (Maienfisch et al., 2001). Resíduos desse tipo de inseticida podem ser encontrado no pólen e néctar consumido por polinizadores, como as abelhas (Hopwood et al., 2012), permitindo a contaminação via oral e expondo toda colônia, devido ao comportamento de trofalaxia (Pham-Delègue et al., 2002; Wolff et al., 2008). O TMX, utilizado em diversas culturas no Brasil, como: citros, café, cana-de-açúcar, arroz, abacaxi entre outros (Dinardo-Miranda and Gil, 2007), demonstrou-se tóxico para abelhas *A. mellifera* africanizadas mesmo em subdoses, diminuindo o número de células regenerativas do intestino e provocando danos ao cérebro (De Oliveira et al., 2013). Catae e colaboradores (2014) analisaram abelhas *A. mellifera* recém emergidas e também demonstraram que o TMX é citotóxico para o intestino médio desses insetos. Estudos como esses são importantes, pois buscam informações a respeito do impacto dos inseticidas e a compreensão da sua toxicidade sobre as abelhas.

Uma maneira de verificar o grau da agressão que o neonicotinóide pode causar nesses insetos é a avaliação da expressão de proteínas de choque térmico (HSP70 e HSP90) associada ao estudo da ocorrência de morte celular com fragmentação do DNA, originando extremidades 3'-OH, as quais podem ser detectadas pelo método de TUNEL - *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (Silva-Zacarin et al., 2006).

A expressão das HSPs, que atuam como chaperonas, auxiliando no processo de dobramento correto das proteínas (Garrido et al., 2001; Ritossa, 1962), é um mecanismo praticamente universal em todos os organismos, caracterizando-se como uma resposta celular ao estresse (Jäättelä and Wissing, 1992), que pode ser gerado por uma ampla gama de condições prejudiciais as quais as células podem ser expostas além de choque térmico como, a presença de substâncias nocivas como álcoois, inibidores do metabolismo energético, metais

pesados, agentes que modificam as sulfidrilas protéicas, hipóxia entre outros estressores físicos e químicos, como a exposição a inseticidas (Horowitz and Robinson, 2007; Lindquist, 1986; Piano et al., 2004; Welch, 1992).

Em estudos com mamíferos, as HSPs foram classificadas em cinco famílias, de acordo com o seu tamanho molecular: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e as pequenas HSPs, como a HSP27. (Lanneau et al., 2007). A família HSP70 constitui a mais conservada e melhor estudada classe de HSPs e, sob condições normais, funcionam como dependentes de ATP e sofrem alteração conformacional após a ligação com esta molécula, necessária para facilitar o enovelamento de novos polipeptídeos sintetizados, montagem de multiproteínas complexas e o transporte de proteínas através das membranas celulares (Shi and Thomas, 1992). Diversos estudos demonstram ainda como estímulos pró-apoptóticos abaixo de um limiar, podem provocar respostas de proteção com a super expressão de HSP70, evitando o desencadeamento dos processos que levam à morte celular (Brunet et al., 2006; Jolly and Morimoto, 2000; Parcellier et al., 2003).

Por sua vez, a HSP90, é abundante nas células, representando de 1% a 2% das proteínas citossólicas. Também é ATP-dependente, assim como a HSP70, e tem um papel chave na maturação e estabilidade conformacional de proteínas denominadas proteínas clientes HSP90, como fatores de transcrição e quinases envolvidas com a transdução de sinal do processo apoptótico (Parcellier et al., 2003). Após a ligação, ocorre a hidrólise do ATP que altera a conformação da HSP90. Em decorrência, a proteína cliente, não mais acompanhada da chaperona, fica ubiquitinada e, então, é degradada pelo proteossoma (Lanneau et al., 2008; Sreedhar et al., 2004).

Por estas razões, as HSP70 e HSP90 tem sido usadas como biomarcadoras citotóxicas em estudos com diversos organismos expostos a diferentes agentes estressores, uma vez que a alta expressão dessas proteínas decorre da tentativa de proteger as células da má conformação de proteínas e evitar assim, a indução da morte celular (Bierkens, 2000).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial estresse celular causado por uma concentração subletal de TMX em órgãos de abelhas *A. mellifera* africanizadas, hipotetizando se o mecanismo de defesa gerado pela expressão das proteínas HSP70 e HSP90 seria capaz de proteger as células do processo de morte celular com fragmentação de DNA, detectada pelo método de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). Para essa avaliação foi utilizado os corpos pedunculados, centros mais importantes de processamento, aprendizagem e memória do cérebro, órgão alvo da ação do inseticida neurotóxico (Cruz-Landín, 2009) e o intestino, o qual está diretamente relacionado com a contaminação oral. A

busca por informações a respeito dos efeitos de inseticidas como o TMX sobre as abelhas é de grande importância, visando o manejo destes polinizadores em áreas agrícolas e também para auxiliar na discussão sobre as leis regulamentadoras de comercialização e uso desses agrotóxicos.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Obtenção do material biológico

Foram utilizadas abelhas *A. mellifera* africanizadas oriundas de colmeias do apiário do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro. Considerando-se a variabilidade genética, foram coletadas abelhas de três diferentes colônias. De cada uma delas foi retirado um quadro de ninho contendo adultos emergindo, os quais foram transferidos para uma gaiola e mantidos em câmara climática a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$ na ausência de luz. Após a emergência das operárias na estufa (idade de 0 a 24h), esse “pool” de abelhas foi transferido para uma bandeja plástica para a marcação individual empregando tinta especial atóxica, o que permitiu, posteriormente, a identificação desses espécimes no momento da coleta.

Finalizando essa etapa, as abelhas recém-emergidas marcadas foram transferidas para uma gaiola de introdução, evitando assim comportamentos agressivos e/ou rejeição por parte das demais abelhas (Wiese, 2000; Couto; Couto, 2002). Para realização dos experimentos e padronização da idade, as abelhas identificadas pela presença da marcação colorida foram coletadas 20 dias após a introdução na colônia, sendo imediatamente utilizadas para a realização dos ensaios de contaminação oral (AFPP, 2003). Para permitir o manuseio das abelhas campeiras foi feita a imobilização por resfriamento durante os experimentos.

2.2- Bioensaios de Intoxicação via alimento contaminado

Os experimentos de exposição foram realizados via alimento contaminado com o inseticida levando-se em consideração o fato do TMX ser um inseticida sistêmico, podendo ser ingerido pelas abelhas pelo consumo do pólen e do néctar contaminados.

Após os ensaios para determinação da CL_{50} realizados por nosso grupo de pesquisa (ROAT et al. Informação pessoal, dados ainda não publicados), foi preparada uma solução mãe de TMX (1000 ng/ μL) adicionando-se água destilada como solvente. A partir desta solução foram feitas outras diluições, utilizando-se uma solução composta de sacarose + água (1:1), até se obter um alimento com concentração final proporcional à concentração subletal 100 vezes inferior a concentração letal média ($CL_{50}/100$: 0,0227 ng TMX/ μl de alimento).

Os bioensaios foram realizados utilizando-se potes plásticos descartáveis (250 mL), previamente forrados com papel-filtro e furados nas laterais e na tampa para permitir a ventilação. Todos os grupos receberam 20 abelhas por pote, mantendo-se seis repetições por grupo.

Em todos os casos, o alimento foi fornecido em microtubos de 2 mL com furos na lateral que permitiam a alimentação *ad libitum*. O grupo experimental recebeu a dieta contaminada com TMX na dose equivalente à $CL_{50}/100$ e para o grupo controle foi fornecido somente a solução de sacarose + H_2O (1:1). Os potes foram mantidos em estufa do tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) à temperatura de $32 \pm 2^\circ C$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$.

2.3 Determinação da coleta dos indivíduos para os experimentos de imunohistoquímica

A coleta dos indivíduos foi definida levando-se em consideração o tempo letal 50 (TL_{50}) de abelhas africanizadas expostas a dose $CL_{50}/100$ do TMX, (ROAT et al. Informação pessoal, dados ainda não publicados). A TL_{50} representa o período de tempo em que 50% das abelhas estão mortas, quando alimentadas com dieta contaminada pela dose subletal de TMX. Sendo assim, a concentração subletal de 0,0227 ng TMX/ μl de alimento apresentou TL_{50} de 120h. Os dias estabelecidos para coleta foram: TL_{50} (120h = 5 dias), $TL_{50}/50$ (60h, aproximadamente 3 dias) e logo após um dia da contaminação (24h = 1 dia) a fim de detectar possíveis alterações decorrentes de uma curta exposição. Nos mesmos períodos foram coletadas abelhas do grupo controle.

2.4- Obtenção dos órgãos: cérebro e intestino

Após anestesia por resfriamento, as abelhas foram dissecadas em tampão PBS (tampão fosfato salino pH 7,4) para a retirada dos cérebros e dos intestinos médios. Os órgãos obtidos de 8 indivíduos de cada grupo para cada uma das 3 marcações, foram fixados em paraformaldeído 4% (cérebro por 2h e intestino por 4h) e, posteriormente, lavados e armazenados em tampão PBS para então serem submetidos à imunomarcagem da HSP70, HSP90 e pelo Teste de TUNEL. Para a obtenção de cortes de 100 μm de espessura, os órgãos foram emblocados em agarose (Agarose IITM, Amresco) e seccionados em vibrátomo (Leica VT1000S).

2.5- Imunomarcagem das proteínas HSP70 e HSP90

Os procedimentos para imunomarcagem das proteínas HSP70 e HSP90 foram realizados de maneira idêntica. Primeiramente, foi feita a recuperação antigênica dos cortes utilizando tampão citrato de sódio (0,1 M e pH 6). Os cortes foram, então, incubados com 0,5% de Triton

X-100 (Sigma) por 10min e, posteriormente, com 3% de albumina sérica bovina (Sigma), por 30min. Após 3 lavagens de 5min no tampão PBS, os cortes foram incubados no anticorpo primário monoclonal, anti-HSP70 ou anti-HSP90, ambos produzidos em rato, utilizados na diluição 1:100 em PBS (Invitrogen) por 1h na ausência de luz, à 37°C, em câmara úmida. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS e o anticorpo secundário IgG conjugado com CY5 (1:500 em PBS, Molecular Probes) foi usado na incubação das secções dos órgãos durante 1h30min, à temperatura ambiente no escuro. Finalmente, depois de 3 lavagens em PBS, as lâminas foram montadas utilizando o Prolong® Diamond Antifade (Molecular Probes).

Para se certificar do funcionamento da técnica, foram realizados dois controles negativos para cada um dos órgãos e para cada uma das proteínas, utilizando os mesmos procedimentos já descritos, exceto que em um deles os cortes não foram incubados com anticorpo primário, para verificar se o secundário poderia causar marcação inespecífica, e no outro controle não foi utilizado nem o anticorpo primário nem o secundário, afim de verificar se os órgãos apresentavam auto fluorescência. Também foi feito um controle positivo para verificar a localização da marcação, utilizando para isso abelhas contaminadas com uma dose mais alta de TMX ($CL_{50} = 0,227 \text{ ng}/\mu\text{L}$) e procedendo com o mesmo protocolo, porém adicionando DAPI (1:1000) por 5min após o último passo e, posteriormente, fazendo 3 lavagens de 5min com PBS, afim de demonstrar a forte marcação das HSPs, expressas devido à alta concentração do inseticida, ao redor dos núcleos evidenciados.

2.6- Teste de TUNEL

Para a marcação do teste de TUNEL, os cortes foram incubados com solução de proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 10Mm Tris-HCl, pH 7,5) por 15min, para permeabilização das membranas e, então, lavados em PBS, para dar seguimento ao protocolo do Kit AP “In Situ Cell Death Detection” (Roche). As lâminas, foram montadas com Prolong® Diamond Antifade (Molecular Probes).

Para a validação da reação do Teste de TUNEL, foram realizados um controle positivo da técnica para o cérebro e para o intestino, nos quais foi adicionado a enzima DNase (Invitrogen), para realizar a quebra do DNA, detectada pelo método. Já no controle negativo foi adicionado apenas o anticorpo, sem a prévia exposição à enzima DNase, verificando assim a viabilidade do kit.

2.7- Aquisição das imagens e quantificação

As imunomarcações das proteínas HSP70 e HSP90 e o método de TUNEL foram visualizadas no Centro de Microscopia e Imagem da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-FOP/UNICAMP em um microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SP5). Para a aquisição e quantificação das imagens foi utilizado o software Leica Application Suite-AF.

Tanto para HSP70 quanto para a HSP90, as fotos do intestino foram adquiridas com aumento de 400X com os seguintes parâmetros: Smart Gain: 931.0 V; Smart Offset: -6,8%; Pinhole: 67.97; Line: 4; Frame: 2; Resolution: 1024x1024; Speed: 400 Hz; Lazer 14% Standby; Number of steps: 5 e Z-size = 25 μm . Já para o cérebro, as fotos foram feitas da região dos corpos pedunculados em aumento de 200X nos parâmetros: Smart Gain: 931.0 V; Smart Offset: -6,8%; Pinhole: 67.97; Line: 4; Frame: 2; Resolution: 1024x1024; Speed: 400 Hz; Laser 14% Standby e Number of steps: 1. Para a marcação do DAPI foi utilizado: laser diodo=10%, $\lambda=405$ nm, Gain=730.0 V, Offset=-1.0%, Pinhole=67.90 μm). Para o Teste de TUNEL: laser Argônio=10%, $\lambda=488$ nm, Gain=878.0 V, Offset=-1.0%, Pinhole=67.90 μm .

A quantificação das imunomarcações nas imagens adquiridas foi feita no software Leica Application Suite-AF. Para cada uma das técnicas, HSP70 e HSP90, utilizou-se 3 indivíduos de cada grupo experimental. Foram fotografadas 3 regiões diferentes dos órgãos de cada um dos 3 indivíduos, e cada uma destas regiões foi delimitada por 3 ROIs (áreas demarcadas com dimensões pré-definidas) sendo que seu tamanho foi de 80 μm x 100 μm para o intestino e 30 μm x 30 μm para os corpos pedunculados do cérebro, devido aos diferentes tamanhos dos órgãos. Portanto, foram gerados por grupo analisado, 27 valores de ROIs, dados pela diferença de intensidade de fluorescência emitida em contraste com as regiões escuras e sem marcação.

Não foi necessário fazer a quantificação nas imagens geradas pelo Teste de TUNEL, pois não observamos marcação relevante em nenhum grupo experimental.

2.8- Análises estatísticas e forma de comparação dos resultados

As análises estatísticas dos valores gerados pelas diferenças de intensidade de fluorescência mensuradas nas técnicas de HSP70 e HSP90 para os diferentes grupos experimentais foram efetuadas utilizando o programa SigmaPlot 13. A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para as comparações entre os dois grupos experimentais com a variável do tempo de exposição [controle 1 dia (C1) versus TMX 1 dia (T1); controle 3 dias (C3) versus TMX 3 dias (T3); controle 5 dias (C5) versus TMX 5 dias (T5)], valores que passaram no teste de normalidade foram submetidos ao Teste-T e valores que não passaram no teste de normalidade foram submetidos ao teste Mann-Whitney.

Nas comparações entre o grupo exposto ao TMX por 1, 3 e 5 dias, foi aplicada a análise de variância ANOVA One Way, Kruskal-Wallis; Dunn. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

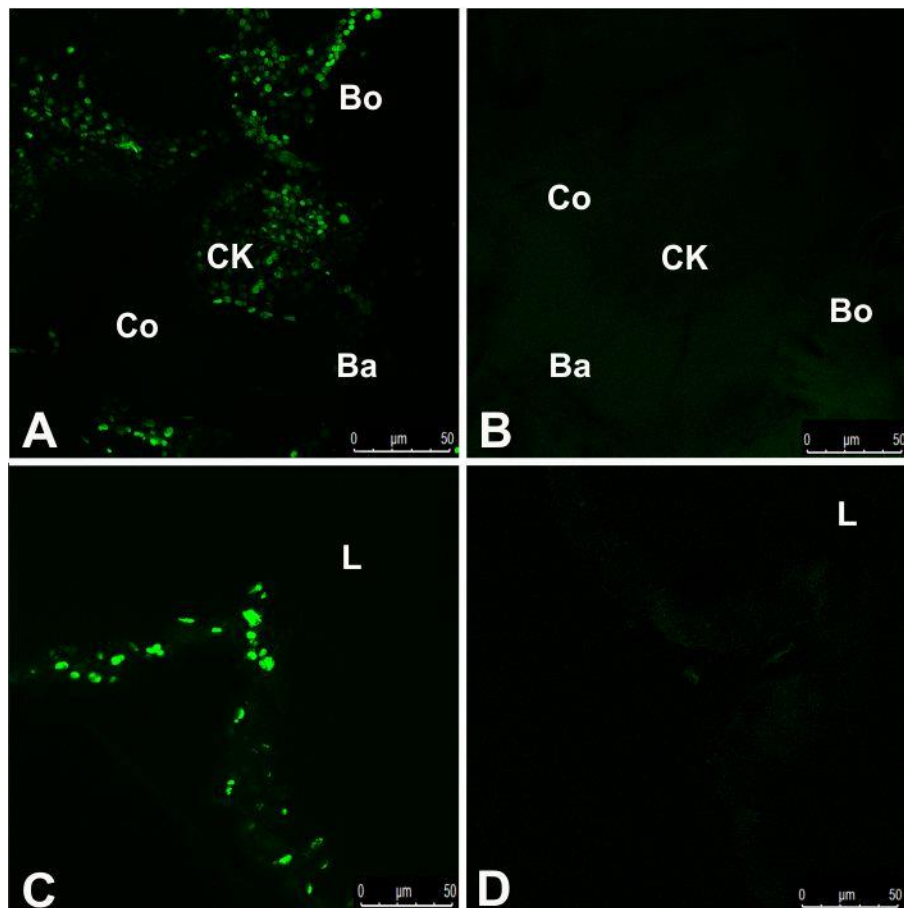
3- RESULTADOS

Os resultados do teste de TUNEL foram negativos para todos os cérebros e intestinos avaliados do grupo controle e do grupo exposto ao TMX nos três tempos de exposição, indicando ausência de morte celular por fragmentação de DNA (Figs 1B e 1D). A técnica foi considerada válida, uma vez que os controles positivos reagiram da forma esperada (Figs 1A e 1C), apresentando marcação da quebra do DNA nos tecidos submetidos à DNase.

Figura 1: Teste de TUNEL em cérebro (corpo pedunculado) e intestino médio de abelhas *A. mellifera* africanizadas.

(A) Controle positivo: Corpo pedunculado submetido à DNase. (B) Controle negativo: Corpo pedunculado. (C) Controle Positivo: Intestino submetido à DNase. (D) Controle negativo: Intestino.

CK: células de Kenyon; Bo: Borda do cálice; Ba: Base do cálice; Co: Colar do cálice; L: Lúmen. Núcleos com fragmentação de DNA aparecem em verde.



As imunomarcações das proteínas de choque térmico apresentaram diferenças significativas na maioria das comparações analisadas. Nos cérebros o padrão de expressão da HSP70 (Fig 2) e HSP90 (Fig 3) foi aumentado no grupo exposto ao TMX em relação ao grupo controle em todos os tempos analisados, com exceção apenas da HSP90 no cérebro no grupo exposto por um dia (Fig 3). O mesmo padrão de marcação no citoplasma das células foi observado nos intestinos, tanto para a HSP70 (Fig 4) quanto para a HSP90 (Fig 5).

Figura 2: Imunomarcção e análise estatística da expressão de HSP70 em cérebro (corpo pedunculado) de abelhas *A. mellifera* africanizadas.

(A) Controle positivo. (B) Controle positivo com os núcleos evidenciados em azul pelo DAPI. (C) Grupo Controle 1 dia: C1. (D) Grupo exposto ao Tiametoxam por 1 dia: T1. (E) Grupo Controle 3 dias: C3. (F) Grupo exposto ao Tiametoxam por 3 dias: T3. (G) Grupo Controle 5 dias: C5. (H) Grupo exposto ao Tiametoxam por 5 dias: T5. CK: células de Kenyon; Bo: Borda do cálice; Ba: Base do cálice; Co: Colar do cálice. As setas indicam a marcação de HSP70. No gráfico à direita, um asterisco (*) demonstra onde houve diferença significativa ($p < 0,05$) de intensidade da imunomarcção da HSP70 entre o grupo controle e o grupo exposto ao TMX nos diferentes tempos analisados.

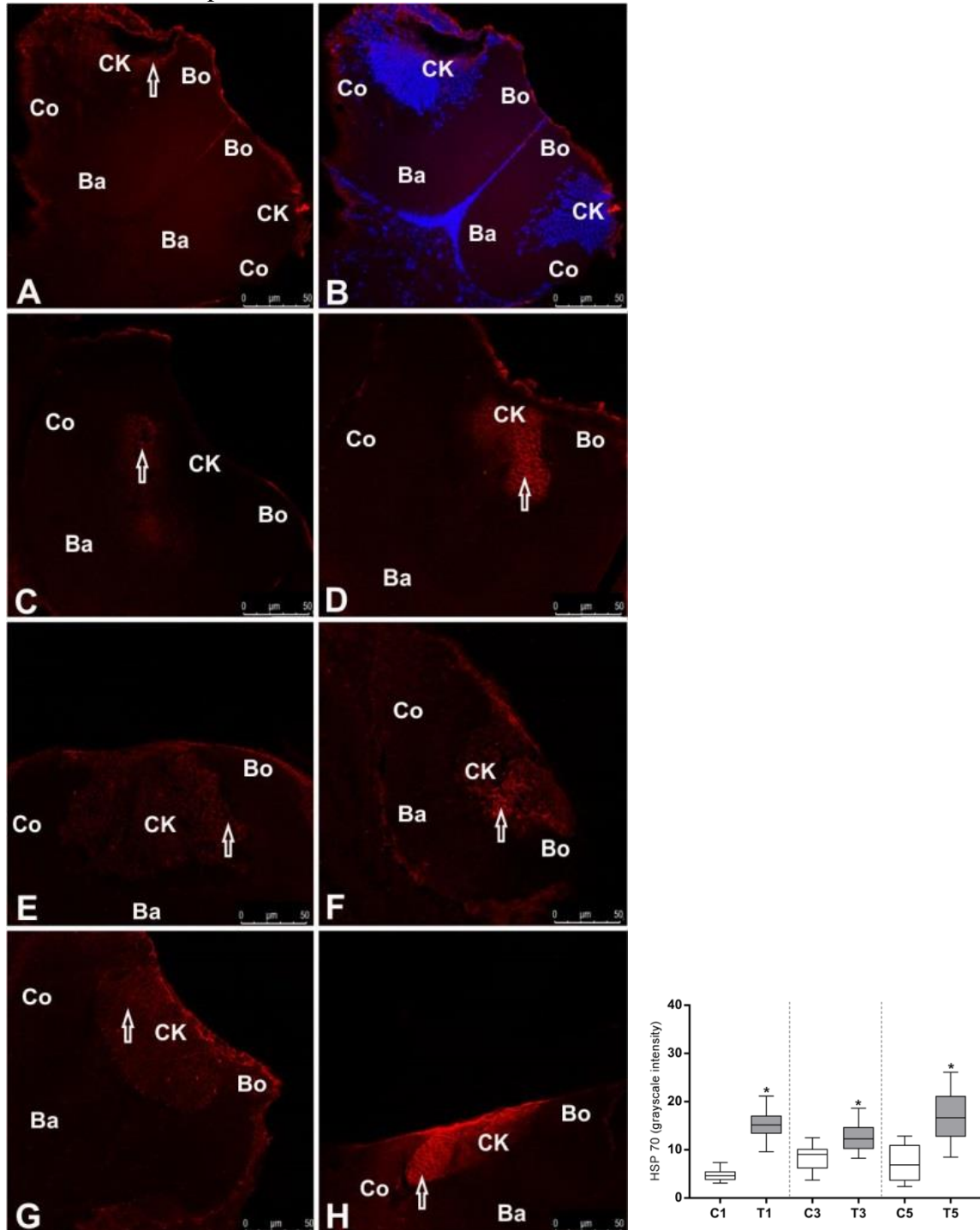


Figura 3: Imunomarcção e análise estatística da expressão de HSP90 em cérebro (corpo pedunculado) de abelhas *A. mellifera* africanizadas.

(A) Controle positivo. (B) Controle positivo com os núcleos evidenciados em azul pelo DAPI. (C) Grupo controle 1 dia: C1. (D) Grupo exposto ao Tiametoxam por 1 dia: T1. (E) Grupo controle 3 dias: C3. (F) Grupo exposto ao Tiametoxam por 3 dias: T3. (G) Grupo controle 5 dias: C5. (H) Grupo exposto ao Tiametoxam por 5 dias: T5. CK: células de Kenyon; Bo: Borda do cálice; Ba: Base do cálice; Co: Colar do cálice. As setas indicam a marcação de HSP90. No gráfico à direita um asterisco (*) demonstra onde houve diferença significativa ($p < 0,05$) de intensidade da imunomarcção da HSP90 entre o grupo controle e o grupo exposto ao TMX nos diferentes tempos analisados.

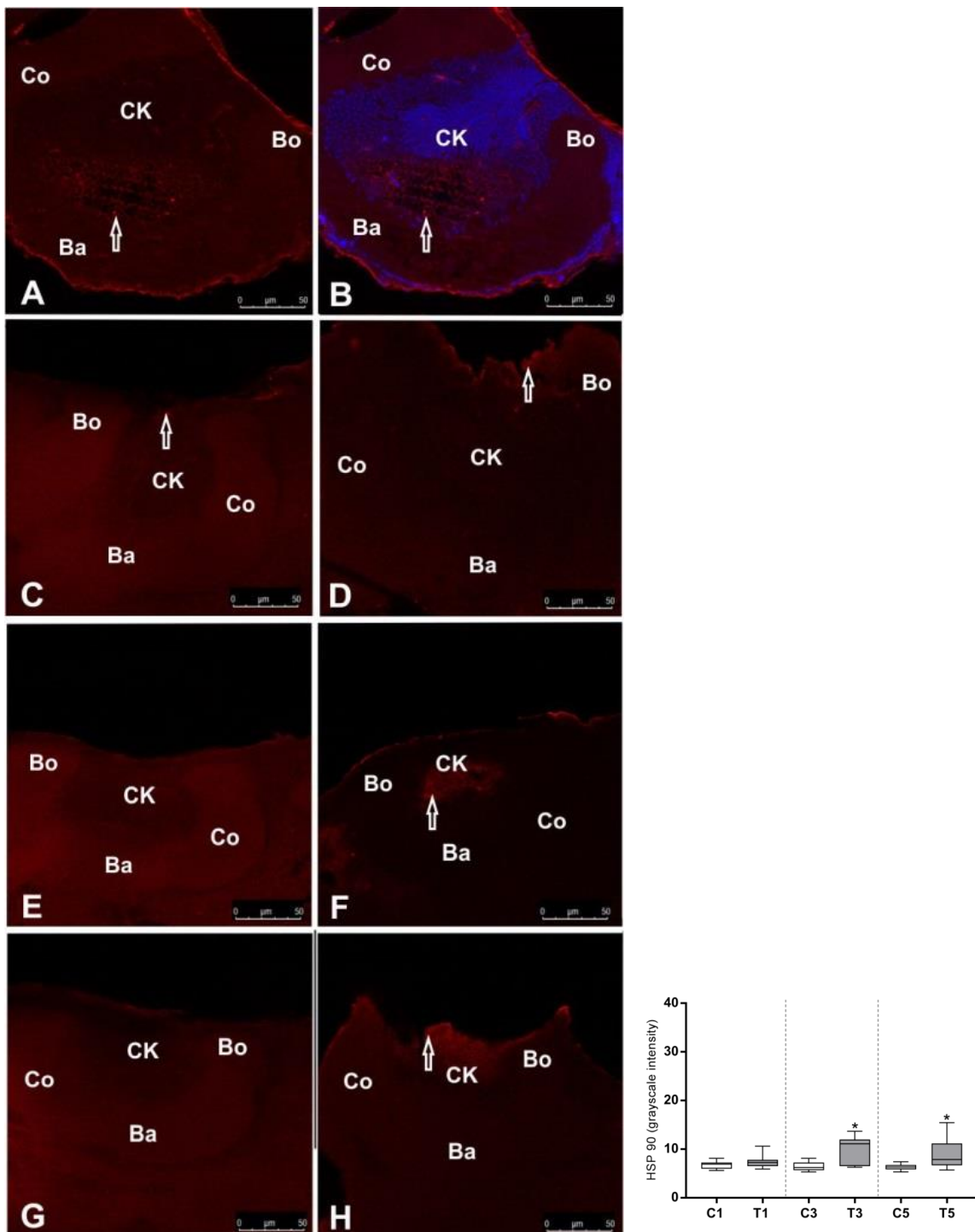


Figura 4: Imunomarcção e análise estatística da expressão de HSP70 em intestino médio de abelhas *A. mellifera* africanizadas.

(A) Controle positivo. (B) Controle positivo com os núcleos evidenciados em azul pelo DAPI. (C) Grupo controle 1 dia: C1. (D) Grupo exposto ao Tiametoxam por 1 dia: T1. (E) Grupo controle 3 dias: C3. (F) Grupo exposto ao Tiametoxam por 3 dias: T3. (G) Grupo controle 5 dias: C5. (H) Grupo exposto ao Tiametoxam por 5 dias: T5. L: Lúmen; n: núcleo. As setas indicam a marcação de HSP70. No gráfico à direita um asterisco (*) demonstra onde houve diferença significativa ($p < 0,05$) de intensidade da imunomarcção da HSP70 entre o grupo controle e o grupo exposto ao TMX nos diferentes tempos analisados.

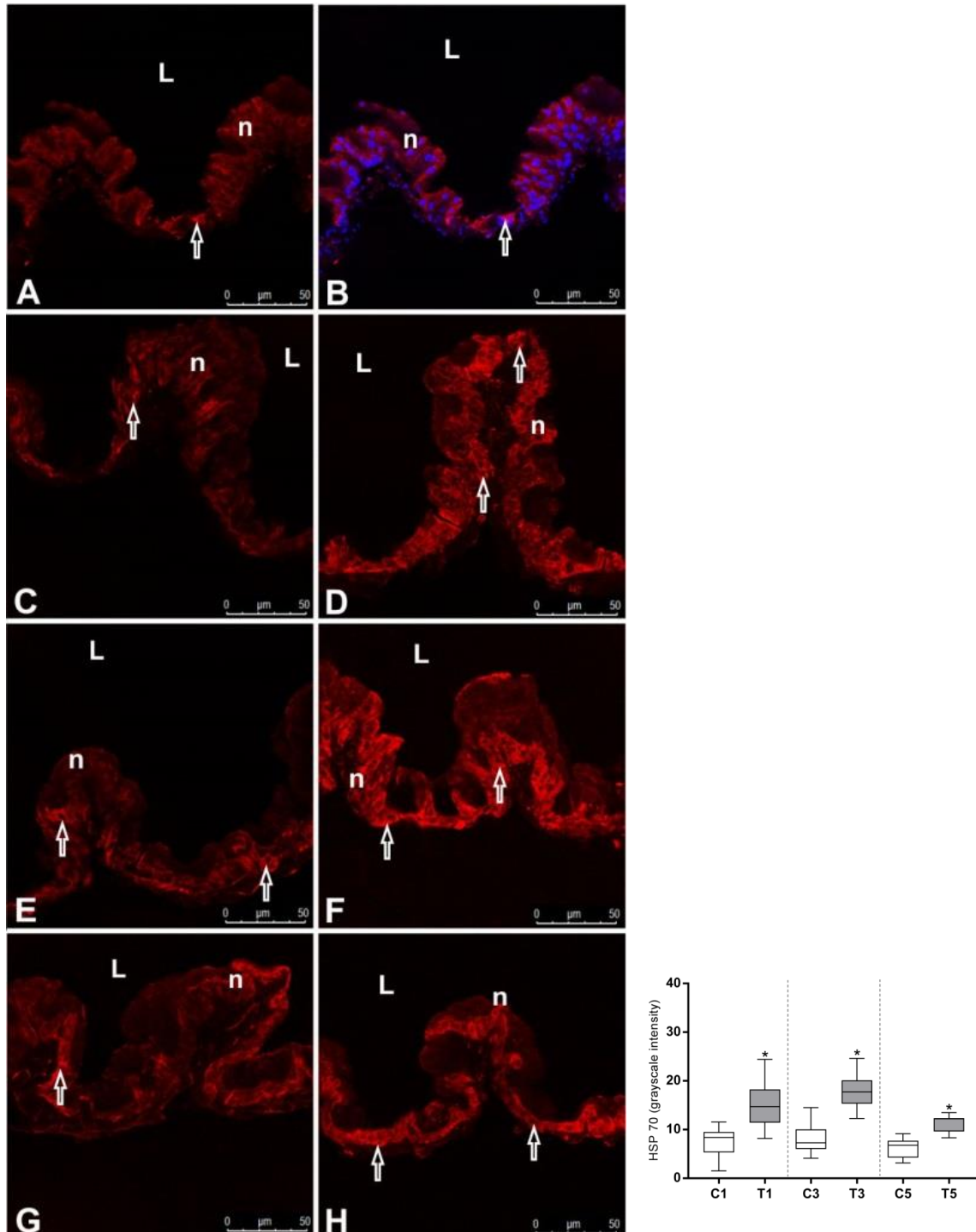
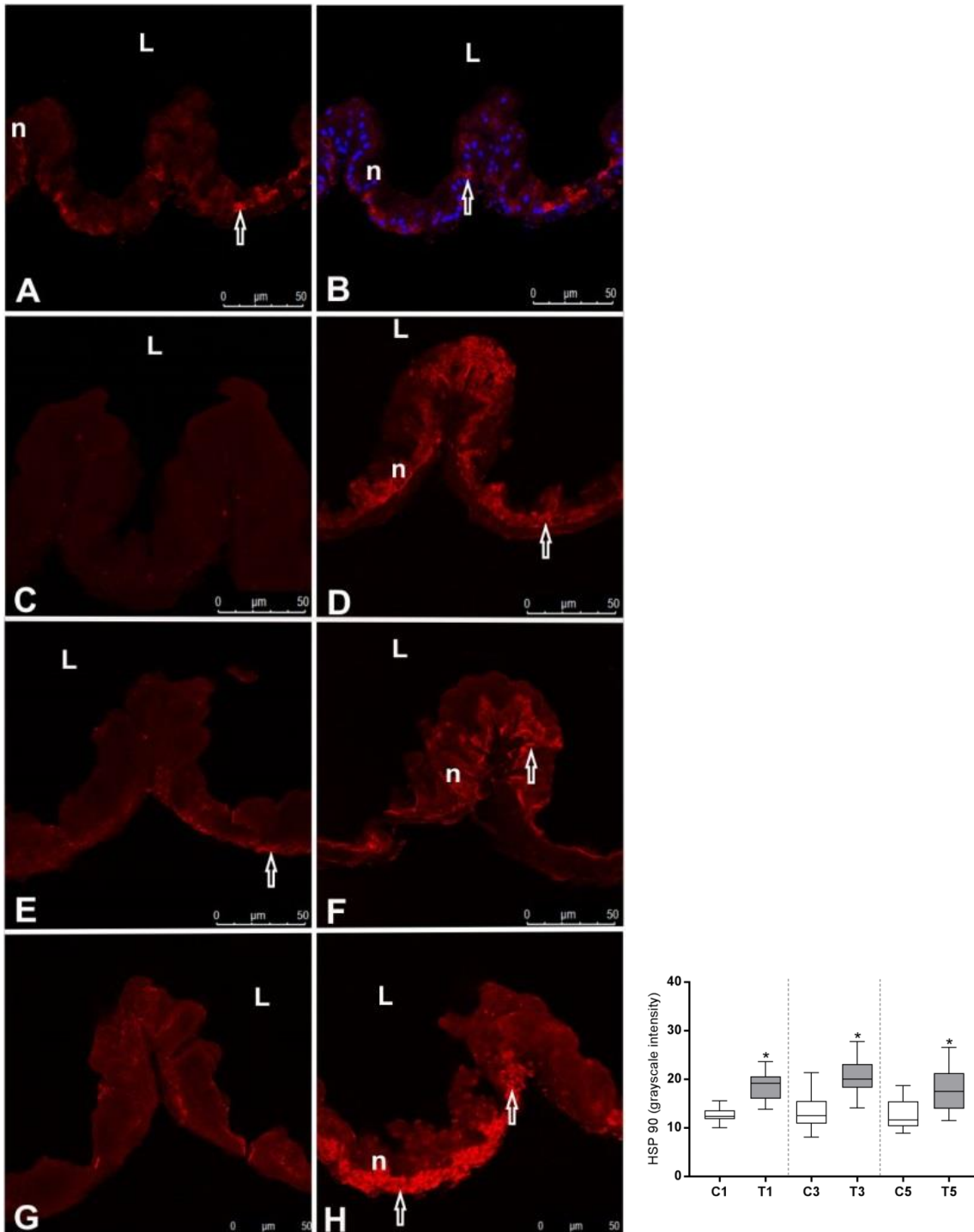


Figura 5: Imunomarcção e análise estatística da expressão de HSP90 em intestino médio de abelhas *A. mellifera* africanizadas.

(A) Controle positivo. (B) Controle positivo com os núcleos evidenciados em azul pelo DAPI. (C) Grupo controle 1 dia: C1. (D) Grupo exposto ao Tiametoxam por 1 dia: T1. (E) Grupo controle 3 dias: C3. (F) Grupo exposto ao Tiametoxam por 3 dias: T3. (G) Grupo controle 5 dias: C5. (H) Grupo exposto ao Tiametoxam por 5 dias: T5. L: Lúmen; n: núcleo. As setas indicam a marcação de HSP90. No gráfico à direita um asterisco (*) demonstra onde houve diferença significativa ($p < 0,05$) de intensidade da imunomarcção da HSP90 entre o grupo controle e o grupo exposto ao TMX nos diferentes tempos analisados.

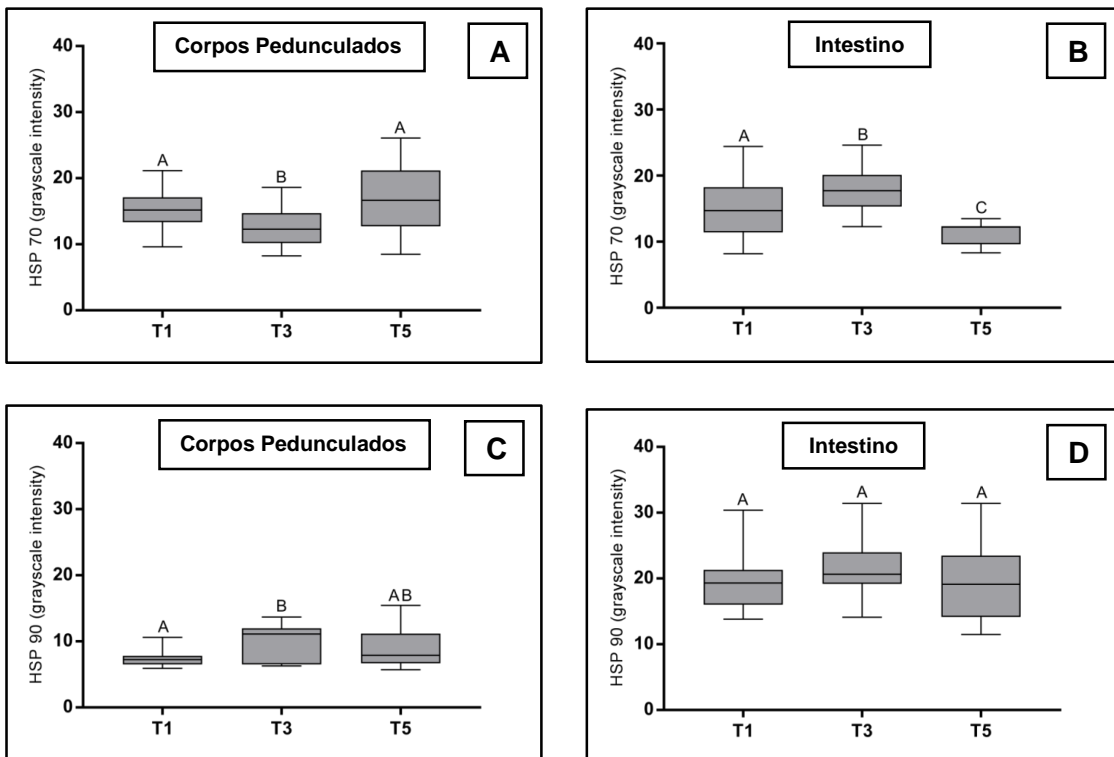


Comparando-se a intensidade de imunomarcação entre o grupo exposto com TMX no decorrer dos tempos analisados, os resultados também indicaram diferenças estatisticamente significativas de intensidade da imunomarcação de HSP70 e HSP90 (Fig 6). Para o cérebro, foi observado aumento da intensidade de HSP70 nas primeiras 24h e 5 dias após a exposição do inseticida (Fig 6A). Já no intestino, houve aumento gradual de marcação da HSP70 no primeiro e no terceiro dia, mas diminuição significativa no dia 5 (Fig 6B). Por sua vez, a marcação de HSP90 apresentou aumento no cérebro do dia 1 para o dia 3 (Fig 6C). Somente a marcação da HSP90 nos intestinos das abelhas expostas ao TMX, não apresentou diferenças entre os tempos avaliados (Fig 6D).

Figura 6: Intensidades da imunomarcação das proteínas HSP70 e HSP90 em cérebros e intestino médio de abelhas *A. mellifera* africanizada expostas ao TMX no decorrer dos tempos avaliados.

(A) HSP70 nos corpos pedunculados. (B) HSP70 em intestino. (C) HSP90 nos corpos pedunculados. (D) HSP90 em intestino.

T1, T3 e T5 representam o grupo de abelhas expostas ao TMX por 1, 3 e 5 dias respectivamente. As letras no topo dos gráficos representam os resultados estatísticos das comparações entre os grupos experimentais, sendo que letras diferentes indicam significância ($p < 0,05$).



4- DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram, primeiramente, não haver marcação para morte celular pelo método de TUNEL em nenhum dos grupos analisados. Este método é comumente utilizado para o estudo e quantificação de morte celular em tecidos, sendo capaz de identificar fragmentação do DNA, utilizando as múltiplas extremidades de DNA livre geradas por endonucleases ativadas para inserir dUTP (*deoxyuridine triphosphate*) que, posteriormente, podem ser detectadas por microscopia de luz ou fluorescência (Kelly et al., 2003).

No entanto, foi possível observar imunomarcação positiva de HSP70 e HSP90, decorrente da exposição das abelhas ao inseticida, nos corpos pedunculados do cérebro e no intestino em praticamente todos os tempos analisados, com exceção da HSP 90 no tecido cerebral após 1 dia de exposição. Houve aumento significativo da expressão das HSPs comparada ao grupo controle em 1, 3 e 5 dias de exposição ao TMX. O principal resultado do presente trabalho foi a verificação da capacidade das HSPs protegerem os tecidos, face ao dano causado pelo TMX, por meio do seu mecanismo de evitar a má conformação proteica. Resultados semelhantes foram encontrados por Grella (2017) ao expor abelhas *Melipona scutellaris* a diferentes doses de TMX e não identificar a presença de morte celular, mas observar aumento de expressão da HSP90.

Porém, Soares-Lima (2017) observou sub expressão da HSP70 e constatou morte celular com fragmentação de DNA pelo método de TUNEL em *A. mellifera* africanizadas infectadas pelo microsporídeo *Nosema ceranae* e expostas ao neonicotinóide imidacloprido, mostrando que a interação desses dois agentes foi capaz de provocar alterações no intestino médio a ponto de culminar em dano irreversível às células. Outros estudos com *A. mellifera* constataram aumento da expressão de HSP 70 e 90 associadas à exposição de imidacloprido, coumafós (Smodiš Škerl and Gregorc, 2009), timol, eucaliptol (Sahebzadeh and Lau, 2017) e nicotina (Rand et al., 2015), demonstrando que o aumento de expressão das HSPs promove a tolerância ao estresse e a sobrevivência das células. Portanto, ao associar o teste de TUNEL e a imunomarcação das HSPs, os nossos dados corroboraram a relação esperada que indica que quanto maior a expressão das HSPs, menor a detecção de morte celular, que estaria sendo evitada devido ao efeito protetivo das chaperonas de choque térmico.

Todavia, ressalta-se que a técnica de TUNEL é utilizada para detectar morte celular com fragmentação das fitas de DNA, evento que pode ocorrer tanto na morte celular por apoptose quanto por necrose (Zhivotovsky and Orrenius, 2001) e e macroautofagia (Malagoli et al., 2010). No caso da apoptose, por exemplo, uma série de processos ocorrem além da quebra de DNA, como modificações bioquímicas, retração da célula, condensação nuclear e formação de

corpos picnóticos (Elmore, 2007; Lockshin and Zakeri, 1990). Por sua vez, as células necróticas podem exibir inchaço nuclear, pulverização da cromatina, degradação da estrutura citoplasmática, entre outras características (Zhivotovsky and Orrenius, 2001). Já a macroautofagia é caracterizada principalmente pelo acúmulo de autofagossomos e autolisossomos no citoplasma (Malagoli et al., 2010). Portanto, embora não tenha sido observada marcações pela técnica de TUNEL, eventualmente pode ter ocorrido morte celular nos órgãos analisados, mas que não estava ainda na fase de fragmentação do DNA, estágio em que ocorre a detecção pelo método.

O único caso onde não foi observada um aumento significativo do padrão de imunomarcção, foi na avaliação da HSP90 no cérebro no grupo contaminado com TMX em relação ao controle analisado após um dia de exposição. Segundo Garrido e colaboradores (2001), quando a HSP90 apresenta atividade anti-apoptótica, aumenta-se a possibilidade de sobrevivência da célula, pois ela evita a ativação da morte celular programada. Mas, uma vez que a célula não está sob ameaça, a expressão de HSP90 não se altera significativamente. Porém, o intestino apresentou maior expressão da HSP90 após as primeiras 24h, sugerindo que, embora o tecido nervoso cerebral não tenha induzido resposta das HSP90 nas horas iniciais da exposição, apesar do intestino médio não se tratar de um tecido alvo do inseticida neurotóxico, promoveu primeiro a resposta da HSP90 por ser atingido durante a rota de metabolização deste composto, uma vez que se trata de um órgão de absorção e entra em contato com o inseticida, quando este é ingerido (Malaspina and Silva-Zacarin, 2006; Sorour, 2001; Thiboldeaux et al., 1998).

Os resultados também indicaram uma diferença de intensidade da imunomarcção de HSP70 e HSP90 no grupo exposto ao TMX conforme o decorrer dos tempos avaliados. Nas análises feitas no cérebro, foi observado aumento significativo da intensidade da HSP70 nas primeiras 24h e 5 dias após a exposição, indicando que logo após um dia de contaminação, o inseticida foi capaz de promover uma queda temporária da atividade protetora da HSP70, mas que conseguiu se recuperar e voltou a aumentar com 5 dias de experimento. Em contrapartida, a marcação de HSP90 aumentou do dia 1 para o dia 3. Justamente no terceiro dia de avaliação, quando houve diminuição de HSP70, nota-se uma espécie de compensação com a resposta da expressão da HSP90 aumentada. De acordo com Wegele e colaboradores (2004), o sistema de dobramento correto de proteínas orquestrado pela HSP70 é um dos mecanismos de defesa mais utilizados pela célula. Embora existam evidências de que a HSP90 é capaz de agir de maneira independente, algumas proteínas são pré-processadas pela HSP70 e depois são transferidas para o sistema da HSP90 (Wegele et al., 2004). Para cumprir sua função, a maquinaria

HSP70/HSP90 atua em conjunto com o sistema de ubiquitina-proteossoma, direcionando proteínas deformadas para degradação de maneira que a HSP70 se liga à cadeia polipeptídica nascente, enquanto a associação com HSP90 ocorre em um estágio posterior do processo de dobramento (Li et al., 2012). Portanto, os dados aqui compilados suportam o papel fundamental que HSPs desempenham em conjunto na proteção das células expostas a agentes estressores.

Por sua vez, o intestino apresentou aumento gradual de marcação da HSP70 do dia 1 para o dia 3, indicando que até o terceiro dia este órgão teve uma reação maior a ingestão do TMX, mas, exibiu uma queda da expressão no quinto dia de exposição, período no qual o cérebro foi mais afetado. A partir desses dados é possível inferir que o tecido nervoso é mais atingido com a exposição prolongada por 5 dias ao inseticida neurotóxico, do que o intestino.

A função citoprotetora das HSPs é em grande parte explicada pela sua interação com proteínas apoptóticas chaves, sendo capazes de bloquear essencialmente todas as vias apoptóticas, envolvendo a ativação de proteases denominadas caspases (Lanneau et al., 2007). Em estudo com mamíferos, a HSP70 foi definida como anti-apoptótica, enquanto que a HSP60 e a HSP10 seriam pró-apoptóticas. No entanto, não estaria bem definido o papel das HSP90 pois, dependendo dos estímulos recebidos para morte celular, as proteínas clientes que se ligam a HSP90 conferem a ela ação pró-apoptótica, mas, outras proteínas indicam ação anti-apoptótica predominantemente (Garrido et al., 2001). Neste contexto, a morte celular em abelhas africanizadas expostas a uma dose subletal de TMX foi evitada devido ao mecanismo anti-apoptótico gerado tanto pela HSP70 quanto pela HSP90. Se o estímulo causado por esse agente citotóxico ultrapassasse o limite de tolerância da célula, teria ocasionado danos celulares que poderiam culminar em morte celular. Isto estaria de acordo com Silva-Zacarin e colaboradores (2006) que observaram que a expressão de HSP 70 poderia ser um mecanismo preventivo da morte celular em larga escala de órgãos de abelhas expostas à agrotóxicos.

É possível encontrar outros estudos na literatura sobre a expressão das HSPs em abelhas expostas a uma diversidade de agentes citotóxicos como substâncias químicas, monoterpenóides, pesticidas e infectadas por patógenos (Chacon-Almeida et al., 2000; Gregorc et al., 2012; Hranitz et al., 2010; Sahebzadeh and Lau, 2017; Smodiš Škerl and Gregorc, 2009). O avanço dessas pesquisas é fundamental para entendermos como esses organismos são afetados e quais os mecanismos de defesa diante da contaminação por esses xenobióticos. Desta forma, nossos dados fortalecem o uso da expressão de HSPs como bom biomarcadores para avaliar os efeitos biológicos de diversas substâncias tóxicas em abelhas, uma vez que comprovamos nossa hipótese demonstrando que a dose subletal do TMX não foi capaz de

induzir morte celular nos órgãos avaliados dentro do período de tempo determinado, devido ao efeito protetor das HSPs.

Os dados aqui obtidos ajudam a caracterizar os efeitos da exposição das abelhas a dose subletal de TMX, contribuindo com a discussão sobre o impacto dos neonicotinóides e os mecanismos de defesa desses polinizadores.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2012/13370-8; 2013/21832-4; 2014/23197-7) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFPP. 2003. Méthode d'évaluation des effets de toxicité aiguë et a court terme des préparations phytopharmaceutiques sur l'abeille domestique *Apis mellifera* L. Commission des Essais Biologiques, 24p.
- Bierkens, J.G.E.A., 2000. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology* 153, 61–72. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00304-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00304-8)
- Blacquièrre, T., Smaghe, G., Van Gestel, C.A.M., Mommaerts, V., 2012. Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973–992. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>
- Brunet, M., Kroemer, G., Schmitt, E., Zermati, Y., Garrido, C., Didelot, C., 2006. Heat Shock Proteins 27 and 70: Anti-Apoptotic Proteins with Tumorigenic Properties. *Cell Cycle* 5, 2592–2601. <https://doi.org/10.4161/cc.5.22.3448>
- Catae, A.F., Roat, T.C., De Oliveira, R.A., Ferreira Nocelli, R.C., Malaspina, O., 2014. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc. Res. Tech.* 77, 274–281. <https://doi.org/10.1002/jemt.22339>
- Chacon-Almeida, V.M.L., Simões, Z.L.P., Bitondi, M.M.G., 2000. Induction of heat shock proteins in the larval fat body of *Apis mellifera* L. bees. *Apidologie* 31, 487–501.
- Couto, R. H. N.; Couto, L. A. 2002. Apicultura: Manejo e produtos. 3 ed. Jaboticabal: Funep. 191p.
- Cruz-Landim, C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Ed. UNESP. 416p. 2009.
- De Oliveira, R.A., Roat, T.C., Carvalho, S.M., Malaspina, O., 2013. Side-Effects os Thiamethoxam on the Brais and Midgut of the Africanized Honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Wiley Period. Inc.* 24, 296–303. <https://doi.org/10.1002/tox>
- Dinardo-Miranda, L.L., Gil, M.A., 2007. Estimativa do nível de dano econômico de *mahanarva fimbriolata* (STÅL) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. *Bragantia* 66, 81–88.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., Kroemer, G., 2001. Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 433–442. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5427>
- Giannini, T.C., Cordeiro, G.D., Freitas, B.M., Saraiva, A.M., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2015. The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil.

- J. Econ. Entomol. 108, 849–857. <https://doi.org/10.1093/jee/tov093>
- Gill, H.K., Garg, H., 2014. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. Intech open 2, 64. <https://doi.org/10.5772/57399>
- Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D., 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). J. Insect Physiol. 58, 1042–1049. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.03.015>
- Grella, T.C., 2017. EFEITOS DE NANODOSES DO INSETICIDA TIAMETOXAM PARA A ABELHA *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae): DA ABSORÇÃO AO ORGÃO ALVO.
- Hopwood, J., Vaughan, M., Shepherd, M., Biddinger, D., Mader, E., Black, S.H., Mazzacano, C., 2012. ARE NEONICOTINOIDS KILLING BEES? A review of research into the effects of Neonicotinoid insecticides on bees, with recommendations for action, The xerces society for invertebrate conservations.
- Horowitz, M., Robinson, S.D.M., 2007. Heat shock proteins and the heat shock response during hyperthermia and its modulation by altered physiological conditions. Prog. Brain Res. 162, 433–446. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)62021-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)62021-9)
- Hranitz, J.M., Abramson, C.I., Carter, R.P., 2010. Ethanol increases HSP70 concentrations in honeybee (*Apis mellifera* L.) brain tissue. Alcohol 44, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2010.02.003>
- Jäättelä, M., Wissing, D., 1992. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. Ann. Med. 24, 249–258. <https://doi.org/10.3109/07853899209149952>
- Jolly, C., Morimoto, R.I., 2000. Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. J. Natl. Cancer Inst. 92, 1564–1572. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.19.1564>
- Kelly, K.J., Sandoval, R.M., Dunn, K.W., Molitoris, B.A., Dagher, P.C., 2003. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. AJP Cell Physiol. 284, C1309–C1318. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00353.2002>
- Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, James H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2006. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 274, 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., Garrido, C., 2008. Heat shock proteins: Essential proteins for apoptosis regulation: Apoptosis Review Series. J. Cell. Mol. Med. 12, 743–761. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00273.x>
- Lanneau, D., de Thonel, A., Maurel, S., Didelot, C., Garrido, C., 2007. Apoptosis Versus Cell Differentiation. Prion 1, 53–60. <https://doi.org/10.4161/pri.1.1.4059>
- Li, J., Soroka, J., Buchner, J., 2012. The HSP90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1823, 624–635. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.003>
- Lindquist, S., 1986. The heat-shock response. Annu. Rev. Biochem. 55, 1151–91. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.005443>
- Lockshin, R.A., Zakeri, Z.F., 1990. Programmed cell death: New thoughts and relevance to aging. Journals Gerontol. 45, 135–140. <https://doi.org/10.1093/geronj/45.5.B135>
- Maienfisch, P., Rindlisbacher, A., Hofer, D., Kobel, W., Widmer, H., Brandl, F., Fischer, W., Steinemann, A., Kayser, H., Angst, M., Senn, R., 2001. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. Pest Manag. Sci. 57, 906–913. <https://doi.org/10.1002/ps.365>
- Malagoli, D., Abdalla, F.C., Cao, Y., Feng, Q., Fujisaki, K., Gregorc, A., Matsuo, T., Nezis, I.P., Papassideri, I.S., Sass, M., Silva-Zacarin, E.C.M., Tettamanti, G., Umemiya-

- Shirafuji, R., 2010. Autophagy and its physiological relevance in arthropods: Current knowledge and perspectives. *Autophagy* 6, 575–588. <https://doi.org/10.4161/auto.6.5.11962>
- Malaspina, O., Silva-Zacarin, E.C.M., 2006. Cell makers for ecotoxicological studies in target organs of bees. *Brazilian J. Morphol. Sci.* 2006.
- Parcellier, A., Gurbuxani, S., Schmitt, E., Solary, E., Garrido, C., 2003. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 505–512. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00623-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00623-5)
- Pham-Delègue, M.-H., Decourtye, A., Kaiser, L., Devillers, J., 2002. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie* 38, 425–432. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Piano, A., Valbonesi, P., Fabbri, E., Piano, A., Valbonesi, P., Fabbri, E., 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and 9, 134–142.
- Rand, E.E.D., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C.W.W., Nicolson, S.W., 2015. Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Sci. Rep.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep11779>
- Ritossa, F., 1962. New puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 19962.
- Sahebzadeh, N., Lau, W.H., 2017. Expression of heat-shock protein genes in *Apis mellifera* meda (Hymenoptera: Apidae) after exposure to monoterpenoids and infestation by *Varroa destructor* mites (Acari: Varroidae). *Eur. J. Entomol.* 114, 195–202. <https://doi.org/10.14411/eje.2017.024>
- Shi, Y., Thomas, J.O., 1992. The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2186–2192. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.5.2186>
- Silva-Zacarin, E.C.M., Gregorc, A., Moraes, R.L.M.S., 2006. In situ localization of heat-shock proteins and cell death labelling in the salivary gland of acaricide-treated honeybee larvae *. *Apidologie* 37, 507–516. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Smodiš Škerl, M.I., Gregorc, A., 2009. Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. *Apidologie* 41, 73–86. <https://doi.org/10.1051/apido/2009051>
- Soares-Lima, H.M., 2017. Efeitos combinados de *Nosema ceranae* e do inseticida imidacloprido sobre abelhas *Apis mellifera* africanizada. Em, Programa D E Pós-graduação Biológicas, Ciências.
- Sorour, J., 2001. Ultrastructural variations in *Lethocerus niloticum* (Insecta: Hemiptera) caused by pollution in Lake Mariut, Alexandria, Egypt. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48, 268–274. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2003>
- Sreedhar, A.S., Kalmár, É., Csermely, P., Shen, Y.F., 2004. HSP90 isoforms: Functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 562, 11–15. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00229-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00229-7)
- Thiboldeaux, R.L., Lindroth, R.L., Tracy, J.W., 1998. Effects of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) on midgut morphology and glutathione status in Saturniid moth larvae. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 120, 481–487. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10070-1](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10070-1)
- Wegele, H., Müller, L., Buchner, J., 2004. HSP70 and HSP90—a relay team for protein folding. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1–44. <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0021-1>
- Welch, W.J., 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72, 1063–1081.

<https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.4.1063>

- Wiese, H. 2000. Apicultura. Novos tempos. Um livro de uma escola de sucesso. Editora Agropecuária: Guaíba, 421p.
- Wolff, L.F., Reis, V.D.A., Santos, R.S.S., 2008. Abelhas melíferas: bioindicadores de qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica 20.
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S., 2001. Current Concepts in Cell Death. Curr. Protoc. Cell Biol. 18.

5. CAPÍTULO 3

O artigo referente a este capítulo será submetido para publicação na **Insect Biochemistry and Molecular Biology** e, portanto, está editado conforme as normas da revista.

Acute thiamethoxam exposure in *Apis mellifera*: Absence of both stress-induced RNA splicing and synergistic effects of common fungicide and herbicide

Pâmela Decio¹, Pinar Ustaoglu^{2†}, Thaisa C. Roat¹, Osmar Malaspina¹, Jean-Marc Devaud³, Reinhard Stöger⁴ and Matthias Soller²

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Campus de Rio Claro.

² School of Biosciences, College of Life and Environmental Sciences, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, B15 2TT, United Kingdom

³ Research Center on Animal Cognition, Center for Integrative Biology, Toulouse University, CNRS, UPS, Toulouse, France.

⁴ School of Biosciences, University of Nottingham, LE12 5RD, United Kingdom

Exposição aguda ao tiametoxam em *Apis mellifera*: Ausência de splicing de RNA induzido por estresse e ausência de efeitos sinérgicos de fungicida e herbicida comuns

Resumo

O conhecimento baseado em evidências sobre os efeitos dos pesticidas em polinizadores, como as abelhas, tornou-se obrigatório em muitos países. É importante estabelecer linhas de ação aprovadas internacionalmente para fornecer mais informações aos agricultores sobre as aplicações de pesticidas no controle de pragas. A investigação da interferência de xenobióticos, como o inseticida tiametoxam (TMX), o fungicida carbendazim (CAB) e o herbicida glifosato (GLF) na regulação de splicing alternativo dos genes *elav* e *Dscam* envolvidos na formação da rede de neurônios do sistema nervoso, pode indicar como esses pesticidas podem afetar o cérebro de *Apis mellifera* europeia em nível molecular. Além disso, o gene *Xbp1* pode sofrer um splicing não convencional independente do spliceossomo, que é mediado pela estrutura secundária nos limites íntron-éxon do mRNA. Esse mecanismo de splicing desencadeia a resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês *unfolded protein response*) em situações estressantes, evitando o acúmulo de proteínas com conformação defeituosa no retículo endoplasmático. Os resultados aqui reunidos mostram que não foi possível detectar um padrão diferenciado de splicing alternativo para nenhum desses 3 genes, entre os grupos controle e as abelhas expostas aos pesticidas. As doses subletais utilizadas e o tempo de exposição (1 dia) em nosso estudo não foram suficientes para indicar respostas nesses genes como biomarcadores em *A. mellifera*.

Palavras-chave: neonicotinóide, PCR, pré-mRNA, sistema nervoso, UPR.

Abstract

Evidence-based knowledge on pesticide-effects on pollinators, such as honeybees, has become mandatory in many countries. It is important to establish lines of action approved internationally to provide more information to farmers about the applications of pest management programs. The investigation of xenobiotic interference, like the insecticide thiamethoxam (TMX), the fungicide carbendazim (CAB) and the herbicide glyphosate (GLF) on the regulation of alternative splicing of *elav* and *Dscam* genes, involved in the formation of the nervous systems can indicate how the insecticide can affect the brain of European *Apis mellifera*. In addition, the *Xbp1* gene may undergo non-conventional splicing independent of the spliceosome, which is mediated by the secondary structure at the intron-exon boundaries of the mRNA. This mechanism triggers the unfolded protein response (UPR) in stressful situations, avoiding the accumulation of proteins misfolded in the endoplasmic reticulum. We did not observe a differentiated pattern of splicing for any of these 3 genes, between the control groups and the bees exposed to pesticides. The sublethal dose used and exposure time (1 day) in our study was not sufficient to indicate a response of these genes as biomarkers in *A. mellifera*.

Keywords: neonicotinoid, PCR, pre-mRNA, nervous system, UPR.

1- INTRODUCTION

Increasing use of pesticides has had a negative impact on honeybees and wild bees around the entire world (Johnson et al., 2010; Gill and Garg, 2014; Woodcock et al., 2017). Forager bees may be exposed to insecticide during their foraging activities to collect nectar, pollen and water, being vulnerable to the chemicals products applied in the crops (Thompson, 2003; Desneux et al., 2007). Through the contaminated material collected by bees the entire colony can be exposed to these pesticides (Pham-Delègue et al., 2002). The exposure to sub-lethal doses of insecticides may cause a reduction of the vigor and productivity of the hive (Blacquièrre et al., 2012; Pham-Delègue et al., 2002).

Among the various pesticides applied in agriculture, the neonicotinoids deserves special attention, since they have neurotoxic action, acting as agonists the acetylcholine in synaptic transmission. The thiamethoxam (TMX), a second generation of neonicotinoid, presents systemic action on plants and has wide spectrum of activity against pest insects, but it is considered highly toxic to bees (Iwasa et al., 2004). Moreover, the herbicide glyphosate (GLF) and the fungicide carbendazim (CAB), which presents systemic action on plants as well are widely used in crops and often found in screening studies of pesticide residues in honey, wax, pollen, and nectar (Boily et al., 2013; Calatayud-Vernich et al., 2016; Kasiotis et al., 2014; Mullin et al., 2010) and in studies about the effect of pesticides combination on honeybees (Helmer et al., 2014).

Based on this, the investigation of the mode of action of pesticides, through studies of the cellular and molecular mechanisms, may help clarify the interference of toxic agents in the metabolism of bees. This would enable to infer the consequences of the use of pesticides to these pollinators (Köhler and Triebkorn, 2013). In this context, a molecular mechanism not yet explored is the regulation of alternative splicing. This alternative processing can be constitutive or regulated. In the first case, the gene transcript always generates more than one protein product. In the case of the regulated alternative splicing, various forms are generated at different times, under different conditions or from different types of cells or tissue (Watson et al., 2006). According to Zaharieva et al. (2012) the investigation of interference of xenobiotics on alternative splicing can be an important way to understand the toxic insult in model organisms.

The alternative splicing patterns are found in all kinds of genes, but they are particularly abundant in the nervous system (Grabowski and Black, 2001; Black and Grabowski, 2003), where specific isoforms play roles in the processes of learning, memorizing, neuronal cell recognition, neurotransmission, ion channel function, and receptor specificity (Grabowski and

Black, 2001). The proteins that determine the formation of neural connections during development and the proteins that mediate cell excitation demonstrate a high level of molecular diversity generated by alternative splicing (Black and Grabowski, 2003)

An important family of proteins that has action on post-transcriptional regulation is the family of neuronal proteins ELAV (embryonic lethal abnormal visual system), This class of proteins are RNA binding proteins commonly used as neuronal markers in metazoans (Soller and White, 2004) and it is required for differentiation and maintenance of the nervous system (Yao and White, 1994). Characterized by presenting three RNA recognition motifs (RRMS) it interferes in the regulation of synaptic plasticity because of its ability to bind to specific targets (Quattrone et al., 2001; Soller and White, 2004) with preference for binding to RNA regions rich in adenosine and uracil (Soller et al., 2008).

In *D. melanogaster*, *elav* is expressed only in neuronal tissues (Yao and White, 1994), and its promoter sequence has been widely used to direct expression genetically to the fly brain (Wu et al., 2011). In *A. mellifera*, Ustaoglu (2015) analyzed whether *elav* splicing could change during memory formation in bees, which led us to hypothesize if *elav* splicing could be affected when bees are exposed to pesticides.

On the other hand, the *Dscam* gene (Down syndrome cell adhesion molecule) can suffer alternative splicing from a highly variable region and be able to generate more than 38,000 isoforms (Graveley, 2005; Soller, 2006). The proteins encoded by this gene are cell adhesion molecules involved in axon guidance and are functionally important through its expressions in the immune system and in neural circuit formation. They act on specific cell-cell interactions, recognition of antigens in the immune system and patterning of the neural network of the brain (Hemani and Soller, 2012; Schmucker and Chen, 2009). *Dscam* is important for growth and connection of mushroom bodies, a center of learning and memory, for the expansion of dendritic fields (Zhan et al., 2004; Matthews et al., 2007) and homophilic interaction of their extracellular domains illustrate the potential contribution of the alternative splicing mechanism for the formation of nervous system's complex network (Soller, 2006).

Considering that neurons are rewired during memory formation, bees are a great model to study learning and memory because of their behavioral performance. *Dscam*, and its regulation by *elav* is a candidate pathway for such neuronal remodeling (Ustaoglu, 2015).

Lastly, in eukaryotes animals, the signals from the endoplasmic reticulum induce a transcriptional program that enables cells to survive environmental stress (Hooks and Griffiths-jones, 2016; Sidrauski and Walter, 1997). To avoid proteins to misfold and accumulate in the endoplasmic reticulum, the unfolded protein response (UPR) is highly coordinated and

facilitates the folding, processing, export, and degradation of proteins during stress (Lafleur et al., 2013).

One of the distinct UPR signaling pathways occurs by IRE1 (inositol-requiring enzyme-1), a transmembrane receptor that contains both kinase and endonuclease activity (Johnston et al. 2016). IRE1 promotes unconventional splicing of the mRNA of a transcription factor named Xbp1 (X-box-binding protein 1), which is a key event in the activation of the UPR (Hooks and Griffiths-jones, 2016). This splicing is independent of the spliceosome and takes place in the cytoplasm (Uemura et al., 2009). While intron excision is performed by Ire, the exons are joined by the tRNA ligase Trl1 (Kawahara et al. 1997). In its unspliced form, the protein translated from the Xbp1 mRNA is unable to trigger UPR. However, splicing removes a short sequence, changing the open reading frame, which leads to encode an active transcription factor with the capacity to activate target genes involved with UPR (Johnston et al. 2016).

Honeybees and other Apoidea possess unique features in the Xbp1 mRNA splice site, which could have functional consequences for the IRE1 pathway (Johnston et al. 2016). Based on this, Johnston and collaborators (2016) observed that divergent forms of endoplasmic reticulum stress trigger a robust unfolded protein response in honeybees exposed to tunicamycin and dithiothreitol. In accordance with the above, this was the first study that analyzed if common pesticides, like TMX, CAB and GLF can affect alternative splicing pattern of ELAV and Dscam and if can change Xbp1 expression on bee brains. These experiments could then be possible indicators of the toxicity of these pesticides. The search for biomarkers and information about the effects of pesticides on the neuronal system of bees is of great importance, aiming to contribute to the characterization of exposure to these xenoniotics at the molecular level.

2- MATERIAL AND METHODS

2.1- Toxicity tests

To decide which doses to use, first, bioassays were performed in the laboratory of the NeuroGeneRegulation Group, at School of Biosciences of the University of Birmingham, in England. Forage bees (*Apis mellifera*) were collected from colonies of Winterbourne Garden, in Birmingham, kept in small cages and fed with water and sucrose (1:1). For each experimental group was collected 30 bees (replicates with 10 individuals in each one). To ensure that laboratory conditions were not stressful for bees, 3 control groups were defined. In Control group 1, the bees were dissected immediately after collection. In Control group 2, they were fed and dissected after 24h. For the exposure, 2 μ l of TMX (1 μ M) and 2 μ l of 3 pesticides mixture (2 mM CAB + 47 mM GLF + 1 μ M TMX) was injected into the bees' abdomens, being injected 2 μ l of water for Control group 3.

The bees were kept in an incubator at 32°C and mortality was observed after 24h. For each insecticide, different concentrations were tested until the highest dose capable of killing the minimum number of bees was determined.

2.2- RNA extraction

Brains of bees were dissected and homogenized with a pestle in 500 μ l of Trizol (Sigma-TriReagent). This mixture was vortexed for 2min and it was vortexed again after adding 200 μ l of chloroformisoamyl alcohol (49:1). The mixture was kept on ice for 5min until the phases separated and centrifuged at 16000 rpm for 10min. Then, 250 μ l of the aqueous phase (containing RNA) was transferred into a new eppendorf tube. Total RNA was precipitated with 300 μ L of Isopropanol and 1 μ l of glycogen. This solution was centrifuged at 16000 rpm for 10min. The supernatant was discarded and the pellet was washed with 750 μ l of 70% ethanol at 16000 rpm for 10min. Again, the supernatant was removed and the pellet (RNA) was left to air dry for 10min. The pellet was dissolved in DEPC (diethylpyrocarbonate) treated deionized water (dH₂O) and frozen at minus 20°C. DEPC treated water was made by adding 0.1% (v/v) DEPC to dH₂O.

2.3- Reverse transcription (RT) Polymerase chain reaction (PCR)

To convert the RNA into cDNA, RT reaction was performed. We used a specific protocol with DNA treatment, to avoid contamination. A master mix was prepared for a total volume of 11 μ l. The mix contains isolated RNA (7.4 μ l), 1 μ l of 100 mM DTT, 0.5 μ l of ribonuclease inhibitor (RNAsin-20units), 1.1 μ l of DNase I buffer and 1 μ l of DNase I. This

master mix was added in 7,4 µl of RNA template and the mixture was kept at room temperature for 15min. After this, 1 µl of EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) 25 mM was added and mixed mix well. After 2min at room temperature, the templates was kept for 15min at 70°C using a thermal cycle. Then, before temperature was to 50°C, we added 7 µl of a second master mix contend: 1 µl of Gene specific primer, 1 µl of 10X RT buffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3), 1 µl of dNTPs 10 mM, 1 µl of MgCl₂ 100 mM, 1 µl of DTT 100 mM, 0,5 µl of RNAsin (Plazenta) and 1.5 µl of H₂O. They were kept for 10min at 50°C. We let sit at 46°C for 1min, and lastly 1 µl of Superscript enzyme was added. RT reaction was carried out at 46°C for 1 hour. The final extension was at 70°C for 15min.

2.4- Polymerase chain reaction (PCR)

Total volume of 50 µl of master mix was prepared. The mix contains 1.5 µl of template (cDNA, genomic DNA or plasmid), 5 µl of 10xTaq buffer (including 20 mM MgCl₂), 1 µl of forward and return primers (20 µM), 1µl of dNTPs, (10 mM), 0.25 µl of DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl) and dH₂O was added to make up the volume to a total of 50µl. The samples were placed in a thermal cycler. The reaction program was as following: initial denaturation at 94°C for 30sec, 38 cycles of denaturation step at 94°C for 30sec, annealing step at 56°C for 40sec and synthesis at 72°C for 45sec and a final extension step for 1min (annealing temperature and synthesis time differs with primer type and length of PCR product).

2.5- Agarose gel electrophoresis

PCR products were visualized on 2,5 % agarose gels. 2,5 g of agarose was fully dissolved in 100 ml of 1X TAE buffer (Tris 40mM – EDTA 1mM – glacial acetic acid 20 mM - pH 8.0). 5 µl of ethidium bromide was added and mixed well. The mixture was poured into a gel tank and the combs were placed. The gel was solidified at room temperature. 10 µl of PCR products were mixed with 9x DNA loading buffer containing glycerol (50%), EDTA (10% 0.5 M – pH 8.5), Tris (1% 50 mM - pH 7.5), xylene cyanol (0.05%), bromophenol blue (0.05%). The samples were loaded and run at 150-180 V for 45min.

For Xbp1, we also loaded the PCR products were digested using 0.5 µl of PstI restriction enzyme and 15 µl of PCR products at 37°C for 1h.

2.6- Radioactivity

2.6.1- Primer Radiolabelling (Dscam and Elav)

4 μ l of ^{32}P γ -ATP (1 millicurie/7 μ l) was used for all radioactivity experiments. For a total 20 μ l reaction; 1 μ l of T4 polynucleotide kinase (T4-PNK, 10 units), 10 μ l of primers, 2 μ l of 1X PNK buffer and dH₂O was mixed in an eppendorf tube. This mixture was incubated at 37°C for 1 hour. Then, the enzyme was inactivated in a heatblock at 100°C for 5min. According to the PCR, either the forward or the reverse primer was radiolabeled. 1 μ l of primer per sample was used for PCR.

2.6.2- Phenol-chloroform extraction

The total volume of PCR product was made up to 200 μ L with dH₂O. 200 μ L of phenol/chloroform/isoamylalcohol (50:49:1) was added, vortexed for 2min and centrifuged at 16,000g for 15min. The upper phase was discarded and an equal volume of chloroform/isoamylalcohol (49:1) was added. Then, it was vortexed and centrifuged at 16,000g for 15min. DNA was precipitated with 0.3 M sodium acetate and 2.5 volumes of absolute ethanol (560 μ L) at -80°C for 15min. The mixture was then centrifuged at 16,000g for ten min.

2.6.3- Restriction digests of PCR products

50 μ l PCR product was phenol-chloroform extracted and precipitated using 20 μ l of sodium acetate (0.3 M) and 560 μ l of absolute ethanol (2.5 volumes) -20°C for 1 hour. The samples were centrifuged at 16,000g for 10-15min. The supernatant was discarded and the DNA pellet was washed with 750 ml of 70% ethanol (v/v) at 16,000g for 10min. The pellet was air dried for 10min and resuspended in 50 μ l of dH₂O.

It was used 10 μ l of PCR product for restriction digest using different enzymes and buffer combinations, depending on the amplified gene and the variable cluster. For a total volume of 20 μ l, 0,5 (5 units) of restriction enzymes were used for the restriction digest. The PCR product of Dscam exon variables were separated with the selected enzymes, exon 4 cluster was digested by the combination of HaeIII, MspI, and MboI, which were able cut the variable isoforms at different lengths. For Elav *KpnI* and *FokI* restriction enzymes were used to digest PCR products. Enzymes were inactivated leaving the templates at 100°C for 5min. Then, the isoforms could be resolved as different bands on the sequencing gels.

After digestion, the PCR product was precipitated again and the pellet was dissolved in 20 μ l of denaturing gel loading buffer which consists of 98% de-ionized formamide, 10 mM

EDTA, 0.025% xylenecyanol, 0.025% bromophenol blue. The samples were denatured at 100°C for 2min and placed on ice before loading into the polyacrylamide gel.

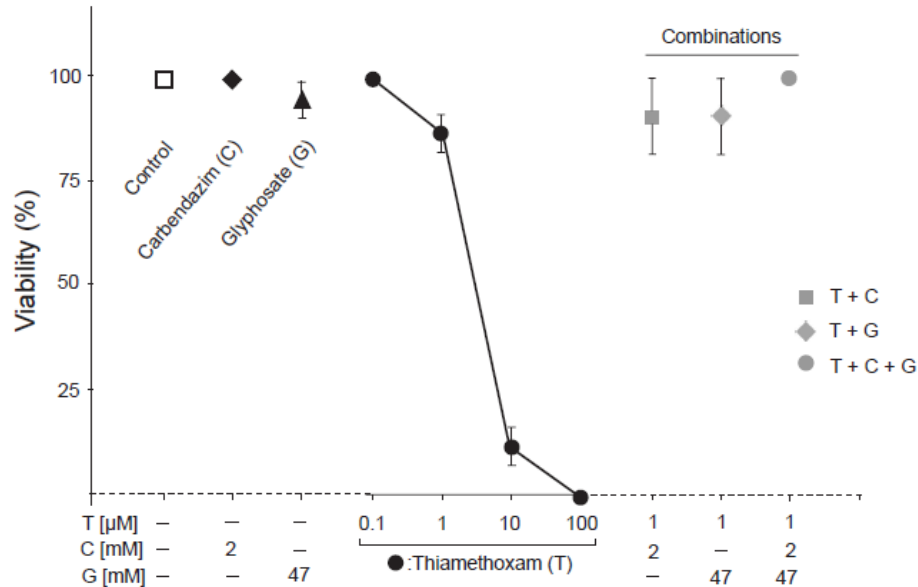
2.6.4- Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

The isoforms were separated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis using the SequaGel System (National Diagnostics). For a total volume of 120 ml of 8% gel, SequaGel concentrate (1.07 M acrylamide, 26 mM methylene bisacrylamide (40:1 acrylamide:bisacrylamide), 2.4 M urea), SequaGel diluent (4.35 M urea) and SequaGel buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.3 and 0.75 M urea) were mixed. 48 µl of TEMED (0.04%), 0.8% ammonium persulfate were added to the urea mixture (concentrate, diluent, buffer) for the polymerization. This solution was immediately cast between two glass plates. 2 combs were inserted at the top part and the gel was left for the polymerization for 1.5-2h. Next, the gel was pre-run at 1200V for 30min. 1X TBE (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.3) buffer was used as running buffer. The gel was run at 1500V for 3h. After the completion of the run the glass plates were separated and the gel was fixed in fixing solution (10% methanol (v/v), 10% glacial acetic acid) for 20min. Then the gel was transferred onto a filter paper and dried with heat vacuum at 85°C for 1.5 hour. An imaging screen (Biorad) was used to expose the gel for 16-18h to visualize the bands. Then, The screen was scanned in a molecular imager (Biorad).

3- RESULTS

First, in our preliminary toxicity test to determine the dose used for the experiments, the results revealed that the laboratory conditions in which bees were kept were not stressful since there was no difference in mortality among the 3 control groups. No mortality was observed in the groups injected with fungicide CAB nor with the GLF herbicide. The only insecticide that was able to observe a survival curve was TMX. The highest dose, with which the bees began to die (our sub-lethal dose), was 1 μM . No pesticide combinations tested caused significant mortality between groups (Fig 1).

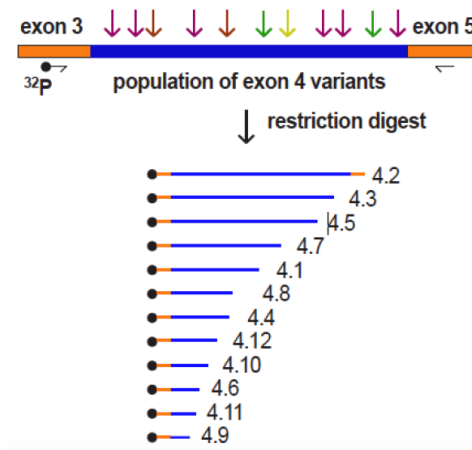
Figure 1. Graphic representation of *Apis mellifera* viability exposed to pesticides. Means with standard error from three experiments are represented. The percentage of bee viability is plotted against the concentration of pesticides. Control: honeybees injected with water; C: Carbendazim (CAB) (2 mM); G: Glyphosate (GLF) (47 mM); T: Thiamethoxam (TMX). For insecticide combinations, the concentration of TMX used was 1 μM .



For this cluster, we used a combination of restriction enzymes HaeIII, MspI, and MboI. Exons 4.1, 4.2, 4.6, 4.7, 4.8 are resolved by MboI, exons 4.3, 4.5 by HaeIII and exon 4.4 by MspI. There is a schematic representation showing the resolution of *Dscam* exon 4 variables in figure 2.

Figure 2: Schematic representation showing the resolution of *Dscam* exon 4 variables.

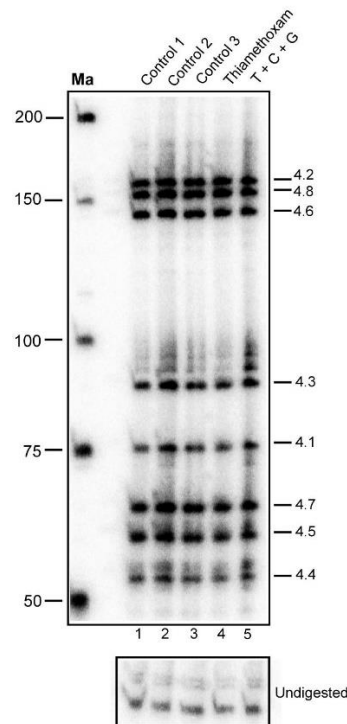
The blue box represents the population of *Dscam* exon 4 variables. Orange boxes represent the constitutive exons flanking the variables. Black arrows indicate 5' radiolabelling of the primer. Colorful arrows indicate different restriction enzymes that digest exon 4 variables at different positions. This digest resulted in different length of the isoforms (from Ustaoglu, 2015).



Our experiment was able to resolve all *Dscam* exon variables. The restriction enzymes were effective to separate exons 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 and 4.8. However, there was no significant difference in splicing pattern between control and bees exposed to pesticides (Fig 3).

Figure 3: *Apis mellifera Dscam exon 4* splicing pattern in control groups and groups exposed to pesticides.

(A) Denaturing polyacrylamide gels showing the splicing pattern of *Dscam* isoforms in Control 1: Bees dissected immediately after collection (line 1); Control 2: Bees fed with water and sucrose (line 2); Control 3: Bees injected with water (line 3), Bees injected with TMX 1 μ M (line 4), Bees injected with TMX 1 μ M (T), 2 CAB 2mM (C) and GLF 47 mM (G) (line 5). Templates were run on 8% polyacrylamide gel. Ma=50bp marker (NEB).



Elav splicing pattern on bee brains were not completely determined by our study. To resolve the isoforms, both forward and reverse primers were radiolabelled. KpnI and FokI restriction enzymes were used to digest PCR products, which were carried out with forward and reverse labeled primers, respectively. The remaining isoforms were not digested and their sizes did not differ enough to resolve all ELAV exon variables on polyacrylamide gels. A scheme showing the structure of the elav gene is shown in figure 4.

Nevertheless, the exons observed, as 3, 3a, 4, 4b, 4c, 4d and 5, as well as *Dscam* variable, they did not present significant difference between the control groups and the contaminated groups (Fig 5).

Figure 4: Gene structure of *elav* in *Apis Mellifera* showing the *KpnI* and *FokI* restriction enzymes used to separate isoforms (Matthias Soller, unpublished data). RRM: RNA Recognition Motif.

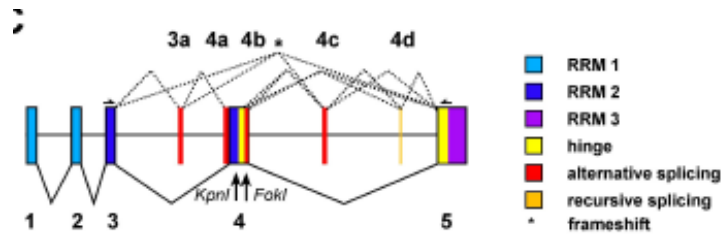
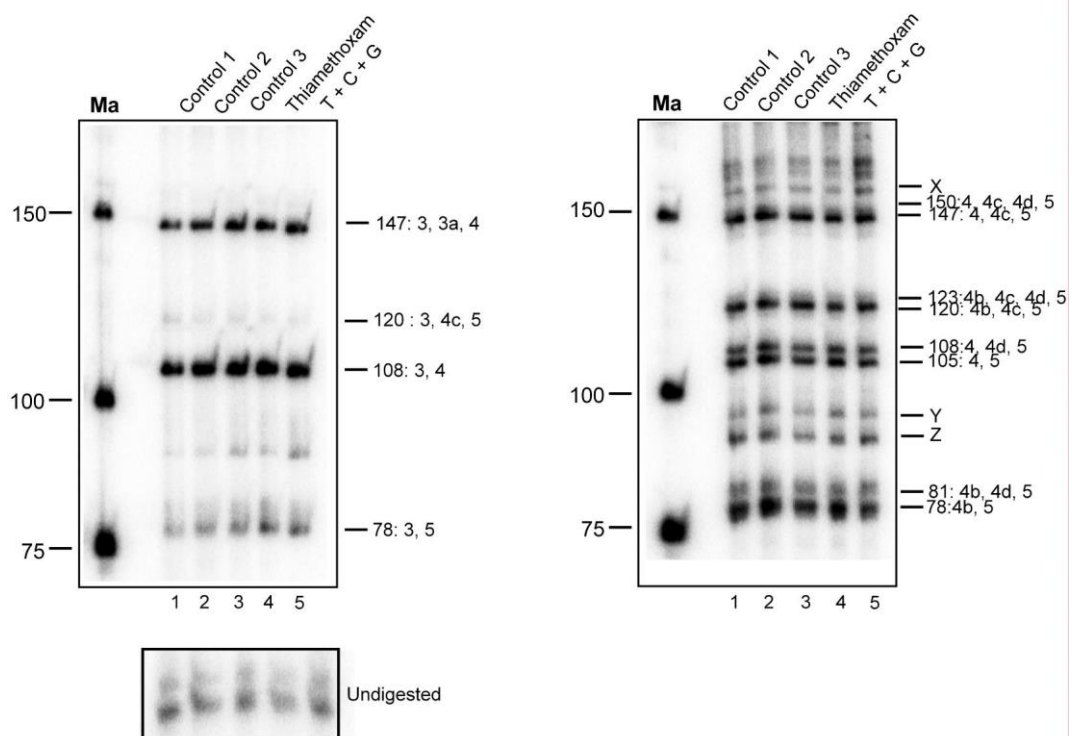


Figure 5: *Apis mellifera* ELAV splicing pattern in control groups and groups exposed to pesticides.

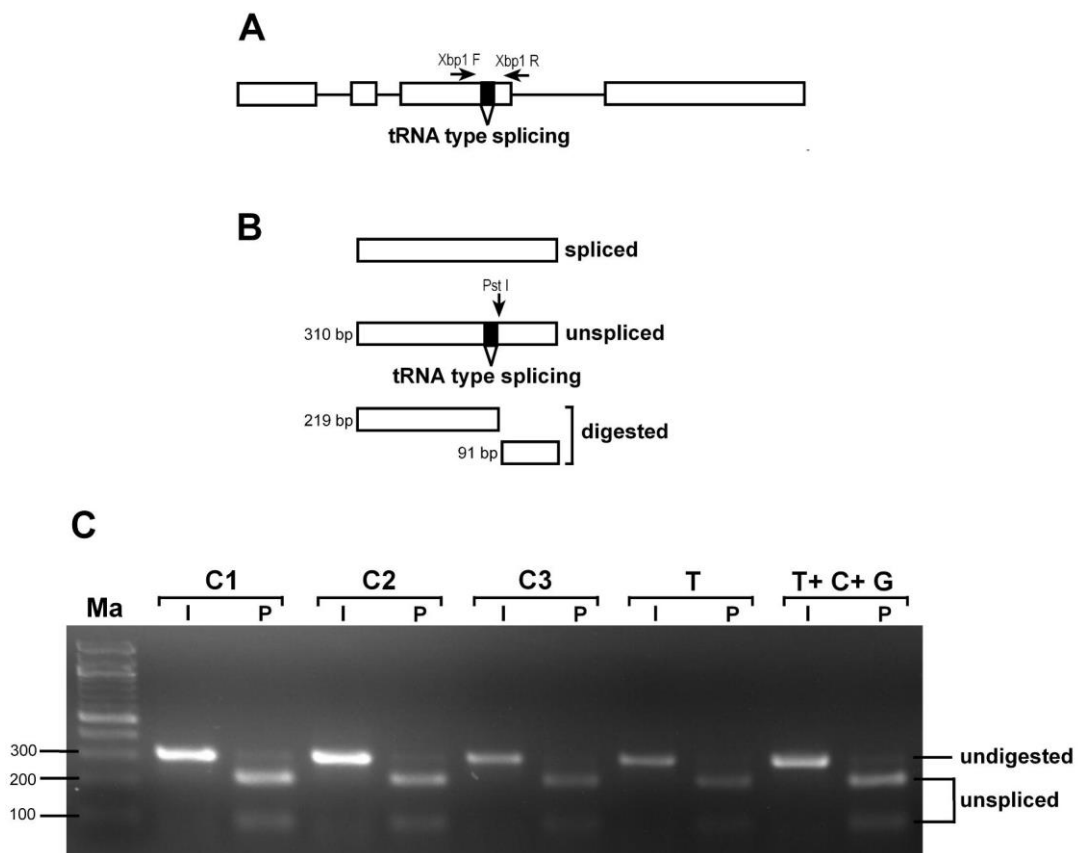
Denaturing polyacrylamide gels showing the splicing pattern of *Dscam* isoforms in Control 1: Bees dissected immediately after collection (line 1); Control 2: Bees fed with water and sucrose (line 2); Control 3: Bees injected with water (line 3), Bees injected with TMX 1 μ M (line 4), Bees injected with TMX 1 μ M (T), 2 CAB 2mM (C) and GLF 47 mM (G) (line 5). Templates were run on 8% polyacrylamide gel. Ma=50bp marker (NEB).



The data from XbpI experiments revealed that after PstI digestion, the band pattern was not significantly different between control and bees exposed to pesticides. The templates were digested by PstI and appears as unspliced band, showing that the unfolded protein response, triggered by Xbp1 splicing, was not activated (Fig 6).

Figure 6. Schematic representation of Xbp1 and PCR amplification of Xbp1 from brains of *Apis mellifera*.

(A) Schematic representation of Xbp1 showing the site where occurs tRNA type splicing. Black arrows indicates the primers used. (B) Schematic representation showing the size (in base pairs) of Xbp1 fragments spliced, unspliced and digested. Black arrow indicates PstI, restriction enzyme used to digestion. (C) PCR amplification of Xbp1 from brains of *Apis mellifera*. I: templates undigested; P: templates digested with PstI. C1: Bees dissected immediately after collection; C2: Bees fed with water and sucrose; C3: Bees injected with water; T: Bees injected with Thiamethoxam 1 μ M; T+C+G: Bees injected with TMX 1 μ M (T), 2 CAB 2mM (C) and GLF 47 mM (G). Templates were run on 2,5% agarose gel. Ma: Marker.



4- DISCUSSION

Elav are proteins has action on post-transcriptional regulation and is required for differentiation and maintenance of the nervous system (Yao and White, 1994). The diversification of elav gene function in bees is achieved through massive increase in alternative splicing (Soller - unpublished data). Given this, Ustaoglu (2015) reasoned that splicing of elav could change during memory formation in honeybees. This study performed classical conditioning, training honeybees to associate an odorant with sucrose presented on the antennae, resulting in the proboscis extension response (PER) to show that elav variable exon can change between fast and slow learners bees. Since neonicotinoids have neurotoxic effects honeybee cognition and behavior (Palmer et al., 2013), our hypothesis was the alternative splicing pattern in elav could be altered in bees exposed to these pesticides. However, the data obtained in this study showed that the exon variables for elav in bees did not change the pattern between the control groups and the groups exposed to the pesticides, at least to these tested doses.

Likewise, no differences were observed in the pattern of Dscam exons in our study. Ustaoglu (2015) also noted that the variable exon pattern of Dscam exon 4 following memory test suffers change, but the elav expression in learning in bees seems to be mediated by transcript levels rather than alternative splicing. The same author tested if elav increases Dscam diversity, revealing no significant change on Dscam exon 4 and exon 10 splicing when elav levels were reduced in bees, meanwhile Dscam splicing clearly changed after learning in bees, improving the performance. Once, alternative splicing is particularly abundant in the brain and learning and memory requires new connections, our hypothesis was that the splicing pattern of Dscam and elav might change in bees affected by neurotoxic insecticides.

A possible explanation for our results is that dose used together with short exposure time (24h) were not sufficient to cause any change in the pattern of alternative splicing of Dscam and elav. According to Sanchez-Bayo and Goka (2014), the majority of risk assessments focus on acute direct exposure to agrochemicals due to spray drift. However, systemic insecticides reach the pollen and nectar, expose bees to toxicity during the whole flowering period (Botías et al., 2015). In this way, it is important that the standard risk assessments and the study of the impact of pesticides on bees be developed taking into account the cumulative effects of chronic exposure, especially with dietary exposures (Sanchez-Bayo and Goka, 2014; Tsvetkov et al., 2017).

The same was observed for the results with Xbp1. The doses of pesticides used were not able to cause differences when compared to the control groups. In response to insults or stressful conditions, may occur the unfolded protein response (UPR), activated by unconventional splicing of the mRNA of transcription factor Xbp1, which occurs independently of the spliceosome. Intron excision is performed by Ire, a kinase with a ribonuclease activity and the exons are joined by the Trna ligase (Kawahara et al., 1997; Hooks and Griffiths-Jones, 2016; Sidrauski and Walter, 1997). Johnston et al. (2016) described a robust UPR activation in the honey bee in response to multiple known activators, like protein glycosylation inhibition (tunicamycin) and reductive stress (DTT). Based on this we reasoned that UPR dependent of Xbp1 may serve as a key molecular link mediating the individual and combined effects of environmental stresses on honeybees. However, the ultimate outcome is dependent on many factors including the mechanism of action of the xenobiotic, concentration of xenobiotic, duration of exposure (acute vs. chronic), cell type affected, nutrient levels, oxidative stress, state of differentiation, and others (Lafleur et al., 2013). The doses used and the exposure time of the pesticides in this study, again were not sufficient to cause difference in the Xbp1 expression of the contaminated groups.

In view of our results, we can affirm that the chosen methods and the genes used, Dscam, Elav and Xbp1, did not indicate significant toxicity of the pesticides in the selected doses.

Acknowledgment

The authors appreciate the Foundation for Research Support of the State of São Paulo, FAPESP (2012 / 13370-8; 2014 / 23197-7) and the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) for financial support in conducting this research.

REFERENCES

- Black, D.L., Grabowski, P.J. 2003. Alternative pre-mRNA splicing and neuronal function. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 31, 187-216.
- Blacquièrre, T., Smaghe, G., Van Gestel, C.A.M., Mommaerts, V., 2012. Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973–992. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>
- Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P., Chagnon, M., 2013. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and GLF: Laboratory and field experiments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 5603–5614. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1568-2>

- Botías, C., David, A., Horwood, J., Abdul-Sada, A., Nicholls, E., Hill, E., Goulson, D., 2015. Neonicotinoid Residues in Wildflowers, a Potential Route of Chronic Exposure for Bees. *Environ. Sci. Technol.* 49, 12731–12740. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03459>
- Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E., Suarez-Varela, M.M., Picó, Y., 2016. Influence of pesticide use in fruit orchards during blooming on honeybee mortality in 4 experimental apiaries. *Sci. Total Environ.* 541, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.131>
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.-M., 2007. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Grabowski, P.J., Black, D.L., 2001. Alternative RNA splicing in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 65, 289–308. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(01\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(01)00007-7)
- Graveley, B.R., 2005. Mutually exclusive splicing of the insect *Dscam* Pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures. *Cell* 123, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.028>
- Helmer, S.H., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., Boily, M., 2014. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 8010–8021. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2879-7>
- Hemani, Y., Soller, M., 2012. Mechanisms of *Drosophila Dscam* mutually exclusive splicing regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 804–809. <https://doi.org/10.1042/BST20120060>
- Hooks, K.B., Griffiths-jones, S., 2016. Conserved RNA structures in the non-canonical *Hac1/Xbp1* intron. *RNA Biol.* 8, 552–556. <https://doi.org/10.4161/rna.8.4.15396>
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., Roe, R.M., 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot.* 23, 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.018>
- Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C.A., Frazier, M., 2010. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* 41, 312–331. <https://doi.org/10.1051/apido/2010018>
- Johnston, B.A. Hooks, K.B., McKinstry, M., Snow, J.W. 2016. Divergent forms of endoplasmic reticulum stress trigger a robust unfolded protein response in honeybees. *Journal of Insect Physiology*, 86, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.004>
- Kasiotis, K.M., Anagnostopoulos, C., Anastasiadou, P., Machera, K., 2014. Science of the Total Environment Pesticide residues in honeybees , honey and bee pollen by LC – MS /

- MS screening : Reported death incidents in honeybees. *Sci. Total Environ.* 485–486, 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.042>
- Kaur Gill, H., Garg, H., 2014. Pesticides : Environmental Impacts and Management Strategies. <https://doi.org/10.5772/57399>
- Kawahara, T., Yura, T., Mori, K. 1997. Endoplasmic reticulum stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor Hac1P/Ern4P that activates the unfolded protein response, *Mol Biol Cell*, 8, 1845–62. PMID: 9348528
- Köhler, H.R., Triebkorn, R., 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: Can we track effects to the population level and beyond? *Science*. 341, 759–765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>
- Lafleur, M.A., Stevens, J.L., Lawrence, J.W., 2013. Xenobiotic perturbation of ER stress and the unfolded protein response. *Toxicol. Pathol.* 41, 235–262. <https://doi.org/10.1177/0192623312470764>
- Matthews, B.J., Kim, M.E., Flanagan, J.J., Hattori, D., Clemens, J.C., Zipursky, S.L., Grueber, W.B. 2007. Dendrite self-avoidance is controlled by Dscam. *Cell*. 129, 593–604. [10.1016/j.cell.2007.04.013](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.013)
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., Pettis, J.S., 2010. High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>
- Palmer, M.J., Moffat, C., Saranzewa, N., Harvey, J., Wright, G.A., Connolly, C.N., 2013. Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nat. Commun.* 4, 1634–1638. <https://doi.org/10.1038/ncomms2648>
- Pham-Delègue, M.-H., Decourtye, A., Kaiser, L., Devillers, J., 2002. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees Minh-Hà. *Apidologie* 33, 425–432. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Quattrone, a, Pascale, a, Nogues, X., Zhao, W., Gusev, P., Pacini, a, Alkon, D.L., 2001. Posttranscriptional regulation of gene expression in learning by the neuronal ELAV-like mRNA-stabilizing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11668–11673. <https://doi.org/10.1073/pnas.191388398>
- Sanchez-Bayo, F., Goka, K., 2014. Pesticide residues and bees - A risk assessment. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>
- Schmucker, D., Chen, B., 2009. Dscam and DSCAM: Complex genes in simple animals, complex animals yet simple genes. *Genes Dev.* 23, 147–156.

- <https://doi.org/10.1101/gad.1752909>
- Sidrauski, C., Walter, P., 1997. The Transmembrane Kinase Ire1p Is a Site-Specific Endonuclease That Initiates mRNA Splicing in the Unfolded Protein Response 90, 1031–1039.
- Soller, M., 2006. Pre-messenger RNA processing and its regulation: A genomic perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 796–819. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5391-x>
- Soller, M., White, K. 2004. ELAV. *Curr. Biol.* 20, 14(2): R53 PMID: 14738746
- Soller, M., Li, M., Haussmann, I.U., 2008. Regulation of the ELAV target ewg: insights from an evolutionary perspective. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 502–4. <https://doi.org/10.1042/BST0360502>
- Thompson, H.M., 2003. Behavioural Effects of Pesticides in Bees - Their Potential for Use in Risk Assessment 1–4.
- Tsvetkov, N., Samson-Robert, O., Fournier, V., Patel, H.S., Zayed, A., Maciukiewicz, P., Sood, K., Malena, D.A., Gajiwala, P.H., 2017. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science* (80-.). 356, 1395–1397. <https://doi.org/10.1126/science.aam7470>
- Uemura, A., Oku, M., Mori, K., Yoshida, H., 2009. Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response. *J. Cell Sci.* 122, 2877–2886. <https://doi.org/10.1242/jcs.040584>
- Ustaoglu, P. 2015. Alternative splicing regulation of *Drosophila* down syndrome cell adhesion molecule gene. 2 University of Birmingham, United Kingdom.
- Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. 20016. *Biologia Molecular do Gene*. fifth ed, Artmedia, Porto Alegre.
- Woodcock, B.A., Bullock, J.M., Shore, R.F., Heard, M.S., Pereira, M.G., Redhead, J., Ridding, L., Dean, H., Sleep, D., Henrys, P., Peyton, J., Hulmes, S., Hulmes, L., Sároszpataki, M., Saure, C., Edwards, M., Genersch, E., Knäbe, S., Pywell, R.F., 2017. Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science*. 356, 1393–1395. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1190>
- Wu, Z., Sweeney, L.B., Ayoob, J.C., Chak, K., Andreone, B.J., Ohyama, T. et al. 2011. A combinatorial semaphorin code instructs the initial steps of sensory circuit assembly in the *Drosophila* CNS. *Neuron* 70: 281-298
- Yao, K., White, K., 1994. Neural Specificity of elav Expression : Defining a *Drosophila* Promoter for Directing Expression to the Nervous System *J Neurochem.* 63(1), 41-51.
- Zaharieva, E., Chipman, J.K., Soller, M., 2012. Alternative splicing interference by

xenobiotics. *Toxicology* 296, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.01.014>

Zhan, X.L.; Clemens, J.C.; Neves, G.; Hattori, D.; Flanagan, J.J.; Hummel, T.; Vasconcelos, M.L.; Chess, A.; Zipursky, S.L. 2004. Analysis of Dscam diversity in regulating axon guidance in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron*. 43, 673-686.

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que:

- O TMX foi capaz de induzir alteração da atividade de parte das enzimas analisadas, dependendo do tempo de exposição e do órgão avaliado.
- Na presença do TMX, as enzimas de exposição foram mais atuantes no cérebro. AChE apresentou aumento de atividade em todos os tempos avaliados, sugerindo que com os receptores nicotínicos ocupados por moléculas do TMX, o qual mimetiza a molécula de acetilcolina, a AChE não consegue agir por não reconhecer o inseticida, provocando um aumento da atividade enzimática na tentativa de compensar e degradar a ligação com o receptor e assim restabelecer o impulso nervoso.
- No cérebro, a CaE diminuiu somente no primeiro dia, demonstrando apenas uma resposta inicial à contaminação, reestabelecendo o equilíbrio posteriormente, enquanto que a GST aumentou apenas no quinto dia, indicando que a resposta dessa enzima é ativada com o efeito da exposição prolongada ao inseticida, provavelmente por ser uma enzima de fase 2, apresentando uma resposta tardia.
- GPX foi a única enzima envolvida com a defesa antioxidante a ter sua atividade modulada no cérebro. Nas primeiras 24h aumenta a resposta via GPX, mas como no quinto dia não há mais diferença entre o grupo controle e o grupo exposto, infere-se que o equilíbrio da defesa antioxidante tenha sido restaurado.
- FAL e GST não responderam à exposição do TMX no intestino.
- CaE foi a única enzima de exposição que teve a atividade afetada pela dose subletal do TMX no intestino, havendo declínio no primeiro e no quinto dia de contaminação, indicando que, embora no terceiro dia tenha havido um aparente reequilíbrio, a exposição oral prolongada volta a causar depleção enzimática da CaE nesse órgão de absorção de nutrientes.
- O sistema antioxidante foi mais ativado no intestino, promovendo o aumento da SOD e da GPX e da determinação do teste de TBARS. O aumento da SOD no intestino, no quinto dia de avaliação, sugere aumento de H₂O₂, o qual pode estar gerando o radical hidroxila, e atacando as membranas biológicas, processo observado na determinação de TBARS.
- É possível inferir que, embora o intestino não seja o órgão alvo do inseticida neonicotinóide, a ativação do sistema antioxidante foi maior nesse órgão do que no

cérebro, uma vez que este é o primeiro órgão a ter contato com o inseticida quando este é ingerido, o que gerou uma resposta mais imediata à exposição.

- O TMX foi capaz de modular a expressão da HSP70 e da HSP90 no cérebro e no intestino das abelhas. No entanto, não foi detectada morte celular pelo método de TUNEL, mostrando que a expressão das HSPs teve efeito protetivo suficiente para evitar a morte celular com quebra de DNA nas abelhas africanizadas expostas a dose subletal do inseticida.

- Apesar do TMX ter induzido uma resposta do sistema antioxidante, ativado enzimas biomarcadoras para detoxificação e as HSPs de maneiras diferentes entre o cérebro e o intestino, a dose subletal utilizada e o tempo de exposição de até 5 dias não foram suficientes para causar danos como o processo de morte celular, por exemplo.

- As doses subletais do TMX e dos pesticidas combinados (TMX, GLF e CAB) utilizados nos experimentos realizados na Inglaterra, não foram suficientes para causar alterações do padrão de regulação de splicing alternativo dos genes Dscam, Elav, bem como induzir o splicing de Xbp1 em resposta a UPR, no período de 1 dia.

- Os dados do presente estudo revelam que, embora a dose subletal de TMX tenha sido avaliada por um tempo de exposição relativamente curto, os sistemas de defesa e os mecanismos biológicos ativados para o reparo de danos, são extremamente importantes para a sobrevivência e manutenção das abelhas expostas à agrotóxicos.

- Esse estudo contribui com diversos dados, por meio de técnicas que incluem ensaios enzimáticos, determinação de TBARS, imunomarcção de HSPs, marcação de morte celular com fragmentação de DNA e técnicas de biologia molecular para detecção de splicing alternativo, que ajudam a caracterizar os efeitos do neonicotinóide TMX nas abelhas *A. mellifera*, fornecendo assim subsídios que podem embasar argumentos para conduzir a discussão sobre as leis que regulamentam o uso de agrotóxicos e o manejo adequado destes polinizadores em áreas agrícolas. Essas ferramentas se configuram como bons biomarcadores para avaliar os efeitos biológicos de diversos agentes tóxicos em abelhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Índice monográfico T48: Tiametoxam. 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c70ae8804745977ca05df43fbc4c6735/Microsoft+Word+-+T48+-+Tiametoxam.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- BADIOU, A.; MELED, M.; BELZUNCES, L. P. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase – a biomarker to detect deltamethrin exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 69, p. 246-253, 2008.
- BADIOU-BÉNÉTEAU, A.; CARVALHO, S. M.; BRUNET, J. L.; CARVALHO, G. A.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; BELZUNCES, L.P. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide Thiamethoxam. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 82, p. 22–31, 2012.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BIERKENS, J.G.E.A. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. **Toxicology** v. 153, p. 61-72, 2000.
- BLACK, D.L.; GRABOWSKI, P.J. Alternative pre-mRNA splicing and neuronal function. **Prog. Mol. Subcell. biol.** v. 31, p. 187-216, 2003.
- BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; van GESTEL C. A.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 21, p. 973-992, 2012.
- BOUNIAS, M.; KRUK, I.; NECTOUX, M.; POPESKOVIC, D. Toxicology of crupic salts on honeybees. V. Gluconate and sulfate action on gut alkaline and acid phosphatase. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v.35, p.67-76, 1996.
- BRODSCHNEIDER, R.; GRAY, A.; ADJLANE, N. et al. Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 3, p. 452–457, 2018.
- BUZZARD, K. A.; GIACCIA, A. J.; KILLENDER, M.; ANDERSON, R. L. Heat shock protein 72 modulates path way sof stress-induced apoptosis, **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 273, p. 17147-17153, 1998.
- CARVALHO, S. M.; BELZUNCES, L. P.; CARVALHO, G. A.; BRUNET, J. L.; BADIOU-BENETEAU, A. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honey bee *Apis mellifera* to insecticides. **Environ. Toxicol. Chem.**, New York, v. 32, n. 9, p. 2117–2124, 2013.
- COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009. Disponível em:

<file:///C:/Users/Pam/Downloads/Cogo%20et%20al.%202009%20-%20Enzima%20dos%20stress%20oxidativo%20como%20biomarcadores.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2009.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, Stanford, v. 52, p. 81-106, 2007.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture - The international response. In: FREITAS, B. M.; PEREIRA, J. O. P. **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004. p. 19-22.

FAROOQUI, T. Oxidative stress and age-related olfactory memory impairment in the honey bee *Apis mellifera*. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 5, p. 1-4, 2014.

FIRPO, M. et al. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Rev. bras. Saúde ocup.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://orgprints.org/22026/1/Porto_Modelo.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2019.

FORD, K. A.; CASIDA, J. E. Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 56, n. 21, p. 10168-10175, 2008.

GARRIDO, C.; GURBUXANI, S.; RAVAGNAN, L.; KROEMER, G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 286, p. 433-442, 2001.

GIANNINI, T.C.; CORDEIRO, G.D.; FREITAS, B.M.; SARAIVA, A.M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.108, p.1-9, 2015.

GILL, H. K.; GARG, H. Pesticides: Environmental impacts and management strategies. In: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Ed.). **Pesticides - Toxic Aspects**, [S.I]: Intech. 2014. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/pesticides-toxic-aspects/pesticides-environmental-impacts-and-management-strategies>> Acesso em: 22 ago. 2014.

GRABOWSKI, P.J.; BLACK, D.L. Alternative RNA splicing in the nervous system. **Prog. Neurobiol.** v. 65, p. 289-308, 2001.

GREGORC, A.; BOWEN, I. D. 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.**, London, v.22, n.2, p.137-44, 1998.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, London, v. 142, p. 231-255, 2004.

HOPWOOD J.; VAUGHAN, M.; SHEPHERD, M.; BIDDINGER, D.; MADER, E.; BLACK, S. H.; MAZZACANO, C. **Are neonicotinoids killing bees?:** A Review of research into the effects of neonicotinoids insecticides on bees, with recommendations for action. Portland: The Xerces Society for Invertebrate Conservation, 2012. 32 f.

HYNE, R.V., MAHER, W.A. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis is that predict population decline. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v.54, p.366–374, 2003.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>. Accessed 01 March 2018.

ISHAAYA, I.; BARAZANI, A.; KONTSEDALOV, S.; HOROWITZ, A. R. Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance. **Entomological Research**, [S.I.], v. 37, p. 148-152, 2007.

JACOB, C. R. O. Efeitos **do inseticida fipronil sobre os corpos pedunculados de operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)** 2012, 85 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio claro, 2012.

JOHNSON, R. M. Honey Bee Toxicology. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 415–434, 2015.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; SILVA, A. C.; ASSIS, M. G. P. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estrateg**, Brasília, n. 12, p. 20-41, 2001.

LAFLEUR, M.A.; STEVENS, J.L.; LAWRENCE, J.W. Xenobiotic perturbation of ER stress and the unfolded protein response. **Toxicol. Pathol.** 41, 235–262, 2013.

LIMA, M. C.; ROCHA, S. A. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil:** Proposta metodológica de acompanhamento. Brasília: Ibama, 2012. 88 p. : il. color. ; 28 cm.
LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat shock proteins. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 22, p. 631-677, 1988.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Braz. J. Morphol. Sci.**, São Paulo, v. 23, n. 3-4, p. 303-309, 2006.

MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; SOUZA, T. F. Defesa de apiários e meliponários contra agrotóxicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 18, 2010, Cuiabá, **Anais...** Cuiabá: Confederação Brasileira de Apicultura, 2010. 1 CD-ROM.

MATTHEWS, B.J., KIM, M.E., FLANAGAN, J.J., HATTORI, D., CLEMENS, J.C., ZIPURSKY, S.L., GRUEBER, W.B. 2007. Dendrite self-avoidance is controlled by Dscam. **Cell**. v. 129, p. 593-604, 2007.

- MOSS, D.W. Perspectives in alkaline phosphatase research. **Clin.Chem.**, Baltimore, v. 38, p. 2486–2492, 1992.
- OLDROYD, B. P. What's killing American honey bees? **Plos Biol**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1195-1199, 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). **Environ. Toxicol.**, New York, p.1-12, 2013.
- PARCELLIER, A.; GURBUXANI, S.; SCHMITT, E.; SOLARY, E.; GARRIDO, C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 304 p. 505–512, 2003.
- PHAM-DELÈGUE, M. H.; DECOURTYE, A.; KAISER, L.; DEVILLERS, J. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, Versailles, v. 33, n. 5, p. 425-432, 2002.
- PIRES, C. S. S. et al. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422–442, 2016.
- ROSA, J. M. DA et al. Desaparecimento de abelhas polinizadoras nos sistemas naturais e agrícolas: Existe uma explicação? **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 18, n. 1, p. 154–162, 2019.
- SGOLASTRA, F.; BLASIOLIA, S.; RENZIA, T.; TOSI, S.; MEDRZYCKIC, P.; MOLOWNY-HORAS, R.; PORRINI, C.; BRASCHIA, I. Lethal effects of Cr(III) alone and in combination with propiconazole and clothianidin in honey bees. **Chemosphere** v. 191, p. 365-372, 2018.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R; ALMEIDA, E. A. B. Origem, filogenia e biogeografia. In: SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, 2002. p. 29–41.
- SOROUR, J. Ultrastructural variations in *Lethocerus niloticum* (Insecta: Hemiptera) caused by pollution in Lake Mariut, Alexandria, Egypt. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 48, p. 268-274, 2001.
- STONE, D.; JEPSON, P.; LASKOWSKI, R. Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. **Comp. Biochem. Physiol.**, New York, v. 132, p. 105–112, 2002.
- THIBOLDEAUX, R. L., LINDROTH, R. L., TRACOY, J. W. Effects of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) on midgut morphology and glutathione status in *Saturniid moth* larvae. **Comp. Biochem. Physiol., Part C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, Oxford, v. 120, p. 481-87, 1998.
- THOMPSON, H. M. Behavioural effects of pesticides in bees: their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 12, p. 317-330, 2003.

TOSI, S.; NIEH, J. C. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivantow), on honeybees. **Proc. R. Soc. B** v. 286, p. 1-9, 2019

VLAHOVIC, M.; LAZAREVIC, J.; PERIC-MATARUGA, V.; ILIJIN, L.; MRDAKOVIC, M. Plastic responses of larval mass and alkaline phosphatase to cadmium in the gypsy moth larvae. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 72, p.1148-1155, 2009.

WOLFF, L. F.; REIS, V. D. A.; SANTOS, R. S. S. **Abelhas melíferas**: Bioindicadores de qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documentos 244, 2008, 38 p.

YAO, K.; WHITE, K. Neural Specificity of elav Expression : Defining a Drosophila Promoter for Directing Expression to the Nervous System, **J Neurochem.** v. 63, n. 1, p. 41-51. 1994.

ZHAN, X.L.; CLEMENS, J.C.; NEVES, G.; HATTORI, D.; FLANAGAN, J.J.; HUMMEL, T.; VASCONCELOS, M.L.; CHESS, A.; ZIPURSKY, S.L. Analysis of Dscam diversity in regulating axon guidance in *Drosophila* mushroom bodies. **Neuron.** v. 43, p. 673-686, 2004.

ZHU, Y. C.; YAO, J.; ADAMCZYK, J.; LUTTRELL, R. Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). **PLoS ONE** v. 12, n. 5, p. 1-16, 2017.