

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 15/04/2020.

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

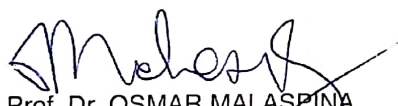
TÍTULO DA TESE: Estresse celular e atividade de enzimas biomarcadoras em abelhas africanizadas *Apis mellifera* Lineu, 1758 (Hymenoptera, Apidae) expostas ao tiametoxam.


AUTORA: PÂMELA DECIO HORST


ORIENTADOR: OSMAR MALASPINA

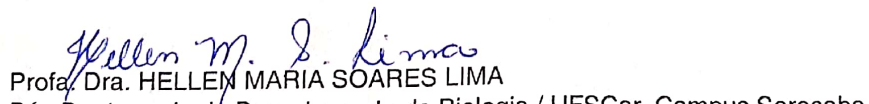
COORIENTADORA: THAISA CRISTINA ROAT

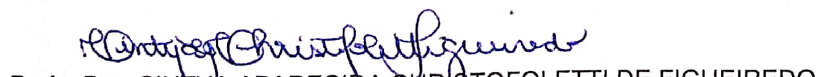
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


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 glutathione s-transferase (GST) aumentou no quinto dia. Por sua vez, as enzimas antioxidantes foram menos atuantes no cérebro, sendo que somente a glutathione 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.

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.